



THÈSE Présentée à



L'Université Abdelmalek Essaadi
Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc

En cotutelle

Avec L'Université de Strasbourg
Faculté des Sciences de la Vie

*En collaboration et avec le soutien de l'Institut Agronomique
et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc*

En vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Discipline : *Sciences du vivant*, Spécialité : *Neurosciences*

Par Khalid EL ALLALI

**Mélatonine, Rythme de la Température Corporelle et
Organisation de l'Hypothalamus et des Noyaux
Suprachiasmatiques chez le Dromadaire (*Camelus dromedarius*) :
Démonstration de l'Entraînement de l'Horloge Circadienne par la
Photopériode et par la Température Ambiante.**

Soutenance le 23 novembre 2009 à la Faculté des Sciences-Université Abdelmalek
Essaâdi, Tétouan-Maroc, devant la commission d'examen :

Pr. Paul Pévet (DR CNRS, UDS, Strasbourg)	Directeur de thèse
Pr. Mohammed Errami (Professeur à l'UAE, Tétouan)	Directeur de thèse
Pr. Nouria Lakhdar-Ghazal (Professeur à l'UM5, Rabat)	Directeur de thèse
Pr. Marie-José Freund-Mercier (Professeur à l'UDS)	Rapporteur
Pr. Ali Ouarour (Professeur à l'UAE, Tétouan)	Rapporteur
Pr. Mohamed Ouassat (Professeur à l'IAV, Rabat)	Rapporteur
Pr. André Calas (Professeur à l'U-Bordeaux 2)	Examineur

Khalid El Allali est membre du Collège Doctoral Européen de l'Université de Strasbourg depuis 2008, promotion "Rosa Parks". A ce titre, Il a bénéficié des supports financiers spécifiques offerts par le Collège et a pu utiliser les facilités offertes par la structure. En plus de ses activités scientifiques, il a ainsi pu suivre des exposés spécifiques sur la politique et les priorités européennes pour le développement, par les meilleurs experts internationaux.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au sein des laboratoires et institutions suivantes :

- Département de Neurobiologie des Rythmes de l'Institut de Neurosciences Cellulaire et Intégrative, Université de Strasbourg, France.
- Laboratoire de Neurobiologie des Signaux Intercellulaires, Université Pierre et Marie Curie Jussieu-Paris, France.
- Unité d'Anatomie Comparée, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat Maroc,
- Laboratoire de Biologie et Santé, Département de Biologie de la Faculté des Sciences de l'Université Abdelmalek Essaâdi de Tétouan, Maroc.
- Groupe de Recherche sur les Rythmes Biologiques et Environnement, Faculté des Sciences de Rabat-Université Mohamed V, Maroc).

Certaines expérimentations animales ont eu lieu dans les organismes suivants :

- Les étables de l'unité de Physiologie Animale, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat Maroc,
- Station de la recherche sur les camelins, Direction Provinciale de l'Agriculture, Lâayoune-Maroc.
- Centre d'Insémination Artificielle Ain Jamaa, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

Les prélèvements des cerveaux de dromadaires ont été effectués avec l'aide et le concours des Services Vétérinaires civils et militaires des abattoirs suivants :

- Abattoirs de Dakhla
- Abattoirs de Souk sebt Témara

Ce travail de thèse à été financé par :

- Le Projet Recherches en Agronomie et Développement : PRAD 05-10 de 2003-2006 et PRAD 03-07 de 2007 à 2010, soutenu par le Ministère de l'Agriculture au Maroc et le Ministère des Affaires Etrangères de France.
- Le Projet de Recherche et Formation intégrées, soutenu par l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat, Maroc 2003-2006.
- Le Projet Fédérateur de Recherche et Dévidement, PROFERD de 2006-2009.
- La bourse Doctorale de la Coopération technique Belge à Rabat en 2003 et 2007.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement **Dr. Mireille Masson-Pévet, Directrice du laboratoire de Neurobiologie des Rythmes à Strasbourg**, de m'avoir accueilli dans ce laboratoire pendant ces longues années. Son soutien constant, les discussions scientifiques et le contact humain chaleureux m'ont été d'une grande utilité.

Mes vifs remerciements vont également au **Dr. Valérie Simonneaux** qui, en prenant la relève de la direction du laboratoire, m'a aimablement facilité la tâche en m'accueillant dans ce même laboratoire. Un grand merci pour les discussions scientifiques, l'encadrement technique durant le travail que nous avons mené ensemble sur l'Aa-nat et pour le contact humain facile et très chaleureux.

A Mr. LE DOCTEUR **PAUL PEVET** (DR CNRS, UDS, Strasbourg)

Que dire !!!! Tout a commencé par un simple courriel envoyé en février 2003 portant une proposition de thématique de recherche pour un éventuel encadrement de thèse. J'ai accueilli votre accord avec joie et satisfaction de telle sorte que malgré les difficultés et les entraves qui s'en sont suivies, nous voilà arrivés au bout. Cher Professeur, comme je vous ai toujours appelé, vous avez toujours su me guider par vos précieux conseils et m'inculquer le sens de la recherche scientifique. Je voudrais vous exprimer tous mes sincères remerciements pour vos encouragements incessants et vos conseils précieux. Merci également, cher Professeur, d'avoir su trouver du temps pour suivre de loin (de France), mais en réalité de tout près, mes travaux au Maroc, mon encadrement scientifique et ce malgré vos multiples occupations. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements, de ma reconnaissance ainsi que l'expression de toute mon admiration pour vos qualités professionnelles et humaines et le témoignage de ma très haute considération.

Je tiens à remercier et à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Pr. **Nouria Lakhdar-Ghazal** (Professeur à l'UM5, Rabat) pour tout l'effort que vous avez fourni pour la réalisation de ce travail, pour votre disponibilité et l'aide que vous m'avez apporté. Vous avez d'abord dirigé et défendu mon travail de DESS, vous m'avez facilité l'intégration administrative et scientifique au niveau de la Faculté des Sciences de Rabat. Par la suite vous m'avez donné progressivement des responsabilités (enseignement DESA, participation aux congrès, travail associatif ...), pour cette confiance, votre soutien et pour vos qualités humaines je vous en sais gré. Merci Nouria !

Au Pr. Mohammed Errami (Professeur à l'UAE, Tétouan), Mon directeur de Thèse à Tétouan : Vous m'avez accueilli dans votre UFR et laboratoire, merci d'avoir eu confiance en moi et dans mon travail, vous avez été toujours présent et malgré l'éloignement vous m'avez toujours aidé et facilité les tâches. Merci pour tout le travail que vous avez fourni pour la réalisation de cette Thèse. Je tiens également à vous remercier pour vos qualités humaines et pour votre accueil toujours chaleureux ; merci Si Errami !

Mes vifs remerciements vont aux **Pr. Marie-José Freund-Mercier** (Professeur à l'UDS), **Pr. Ali Ouarour** (Professeur à l'UAE, Tétouan) et **Pr. Mohamed Ouassat** (Professeur à l'IAV, Rabat) qui ont eu l'obligeance de s'intéresser à ce travail et de prendre la peine de le juger et de nous avoir fait l'honneur de siéger parmi cette commission de thèse. Hommage respectueux.

Pr. André Calas (Professeur à l'U-Bordeaux 2), vous avez d'abord accepté de m'accueillir dans votre laboratoire de Neurobiologie des Signaux Intercellulaires de l'université Pierre et Marie Curie de Paris. Monsieur le Professeur, tout ce grand chapitre sur l'hypothalamus c'est grâce à vous que je l'ai réalisé. Vous m'avez d'abord appris la technique, la paillasse en immunofluorescence. Vous m'avez appris l'anatomie de l'hypothalamus, l'approche

expérimentale et scientifique pour l'interprétation de mes résultats et malgré les conditions difficiles parfois rencontrées, vous avez pu me rendre la tâche facile par votre présence continue. Et comment se focaliser sur le technique et le scientifique et oublier vos qualités humaines, votre soutien, votre accueil toujours chaleureux Pour tout cela, pour avoir eu l'honneur de travailler avec vous et pour avoir accepté de faire partie de ce jury, Veuillez trouver l'expression de ma sincère gratitude.

En France :

Je pense particulièrement à remercier **Dr. André Malan** pour ses conseils pédagogiques, pour sa disponibilité et son aide précieuse en analyse des données et les statistiques. Nos discussions scientifiques ont été pour moi une source d'inspiration.

Dr. Vivien-Roels, vous avez été la première personne avec qui j'ai travaillé « à la paillasse » au laboratoire de Strasbourg. Malgré les problèmes de dosage, et "la poisse" qui me suivait nous avons pu réaliser un très bon travail, je vous en sais gré. Malgré votre départ en retraite vous avez continué à suivre mon travail, à demander de mes nouvelles, pour vos qualités humaines incomparables, merci Berthe !

Dr. Béatrice Bothorel, Vous êtes associée aux grands chapitres de ce travail, votre participation a été d'une grande aide, merci pour le dosage, la régression non linéaire, les corrections...Après le Départ de Berthe j'ai trouvé en vous mon repère dans le nouveau laboratoire, pour votre énergie et pour les moments que nous avons partagés pendant ce long parcours je vous réserve une grande estime et un grand Merci Béatrice.

Je tiens également, à remercier **Christiane Calgari** qui a beaucoup aidé au dosage de la mélatonine et protéines, d'ailleurs, toujours fait avec bonne humeur, merci Christiane pour l'aide et ton contact humain chaleureux !

Mes remerciements vont également à **Natalia Sinitskaya** qui m'a appris le dosage des protéines, la western-blot et qui en plus a participé activement à mon travail sur l'Aa-nat.

Je voudrais également remercier **Dominique Ciocca** de m'avoir initié à la technique des Ibutton et pour les multiples discussions scientifiques enrichissantes.

Je pense particulièrement à certaines personnes qui, à un moment donné, m'ont aidé et qui peut être sans le savoir ont participé activement à ce travail par les discussions et le contact humain que j'ai trouvé auprès d'eux : Un grand merci à **Michel Saboureau** pour ses conseils et son soutien, merci Michel. Merci également à **Etienne Challet, Jorge Mendoza** et **Patrick Vuillez** pour les discussions scientifiques et les remarques constructives.

Un grand merci à **Johann Egginger, Caroline Parmentier** et **Hélène Hardin-pouzet** pour leur aide précieuse.

Merci aux anciens doctorants du laboratoire, je pense particulièrement à **Mohammed Lahmam, Zeina Malek, Florent Revel, Laurent Tritschler, Céline Feillet, Laurence Agez**....et Bon courage et bonne chance aux futurs doctorants et là je pense particulièrement à : **Laura, Ouafa, Matei et Jeff**....

Merci à **Dominique Streicher** et **Fafa Gheddab**, pour votre disponibilité !

Merci enfin à tous les membres du **Département de Neurobiologie des Rythmes à Strasbourg** et du **Laboratoire de Neurobiologie des Signaux Intercellulaires de Paris** que j'ai peut être omis de citer et qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Au Maroc :

Comment ne pas remercier mon Collègue, le **Professeur Vétérinaire. Mohamed Rachid Achaaban**, qui m'a pris en main et qui m'a orienté vers la thématique des Rythmes Biologiques et de la Mélatonine. Vous m'avez surpris par votre endurance sur le terrain tout le long des expérimentations sur le Dromadaire, les prélèvements sanguins en série...pour avoir toujours trouvé les solutions aux problèmes techniques et pour avoir participé de près et très activement à ce travail, merci Rachid !

A Mon collègue **Docteur vétérinaire, Mohamed Piro** (enseignant-chercheur), vous avez répondu présent à chaque fois que j'ai fait appel à vous, vous avez participé à la chirurgie pour l'implantation des Ibuttons. Souvent vous avez fourni le matériel nécessaire et répondu présent pour les urgences médicales des chamelles... pour votre aide précieuse et vos qualités humaines, merci Mohamed !

Mes remerciements vont au **Docteur Vétérinaire, Mourad El Allouchi**, qui sans lui, une grande partie de cette thèse ne pouvait être réalisé, vous avez su me faire profiter de votre influence professionnelle dans votre zone d'action, merci pour avoir tout organisé pour rendre possible tous ces prélèvements d'hypothalamus et de pinéale, ainsi que pour les premiers essais avec les Ibuttons, pour avoir pu autoriser un abattage de dromadaire la nuit à l'abattoir municipal et pleins d'actions.....pour votre aide, votre soutien.. Tu as été d'un grand secours Mourad ! Merci !

Comment ne pas remercier notre jeune stagiaire à l'Unité d'Anatomie Comparée **Docteur Vétérinaire Hanan Bouaouda** dont l'aide a été précieuse pour certaines expérimentations et pour l'organisation du document de la thèse, Merci Hanan Tu as été toi aussi d'un grand secours!

Je pense particulièrement à certaines personnes qui m'ont beaucoup aidé pour la réalisation de ce travail de Thèse: **Professeurs Vétérinaires, Mohamed oukessou, Ahmed Ouhsine, Noursaid Tligui, Mohamed Bengoumi...**

A la Direction de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, qui a soutenu ce travail notamment l'ancien **Directeur Pr Fouad Guessous** et par la suite l'actuel **Directeur, le Pr. Mohamed Sadiki** et à tous les collègues professeurs de la filière vétérinaire de l'IAV Hassan II qui m'ont apporté de loin ou de près de l'aide, veuillez trouver dans ces quelques mots ma profonde gratitude.

Grands remerciements aux vétérinaires des services du Ministère d'Agriculture, au niveau de la DPA de Laayoune et de Dakhla ainsi que pour ceux qui sont aux abattoirs de Témara et de Rabat et au Centre d'Insémination de Ain Jamaa, mes vifs remerciements également pour : **Mr. Mohcine Hadaoui, Dr.Lahcen Boukbir, Dr. Hakim Chaabi, Dr. Belakhal, Dr J. Malik, Dr. Aziz Marhaban...**

Mes remerciements vont au personnel de l'Unité d'Anatomie Comparée de l'IAV Hassan II de Rabat: l'Animalier (chamelier!) **Mohamed Essaady** et aux techniciens **Hassan Mounakhil** et **Lahsen Rguig** ainsi que pour notre secrétaire **Saadia Chichi** et notre femme de ménage **Amina Bouguern**. Mes remerciements vont également au personnel des services des projets, de comptabilité et des bons de commandes de l'IAV Hassan II, qui ont assuré le bon fonctionnement des projets de financement de cette thèse.

Mes remerciements vont à tous ceux qui ont aidé à la réalisation de ce travail et que j'ai oublié de citer.

LISTE DES PUBLICATIONS

EN RELATION AVEC LE TRAVAIL DE THESE

ARTICLES Publiés Dans Un Journal à Comité De Lecture

- **K. El Allali**, M.R. Achaaban, B. Vivien-Roels, B. Bothorel, N.S. Tligui and P. Pévet (2005). Seasonal Variations in Nycthemeral Rhythm of Plasma Melatonin in the camel (*Camelus dromedarius*). Journal of Pineal Research; 39: 121-128. Erratum J. pineal Res. 2006: 40:194 (voir annexe).
- **K. El Allali**, Sinitskaya Natalia, Bothorel Béatrice, Rachid Achaaban, Pévet Paul, Simonneaux Valérie (2008). Daily Aa-nat gene expression in the camel (*Camelus dromedaries*) pineal gland. Chronobiology International, 25(5): 800–807 (voir annexe).

COMMUNICATIONS ORALES

- **K. El Allali**. Pineal gland, melatonin and adaptation to the photoperiodic environment in the camel (*Camelus dromedarius*). Communication orale, Workshop on 'Chronobiology in Africa'. Johannesburg, Republic of South Africa, April 2005.
- **K. El Allali**, M.R. Achaaban, M. Piro, J.-G. Egginger, C. Parmentier, P. Pévet et A. Calas (2006). Immunohistochemical cartography of different neuropeptides in the hypothalamus of the camel (*Camelus dromedarius*). First conference of the International Society of Camelids Research and Development (ISOCARD) Al-Ain, United Arab Emirates Avril, 16 – 18, 2006.
- Achaaban MR., **El Allali K.**, Vivien-Roels B., Bothorel B., Tligui NS. And Pévet P (2006). Seasonal plasma melatonin profiles in the camel (*Camelus dromedarius*). The international Scientific Conference on Camels Qassim city, Kingdom of Saudi Arabia.

POSTERS

- **K. EL Allali**, M.R. Achaaban et P. Pévet. Rythme journalier de la température rectale chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*). Communivcation écrite au XXème Edition du Congrès Vétérinaire Maghrébin. Fès, Mai 2003.
- **K. El Allali**, M.R. Achaâban, B. Vivien-Roels, B. Bothorel et P. Pévet. Variations saisonnières du rythme nyctéméral des concentrations de mélatonine plasmatique chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*). 36^{ème} Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Rennes- France, Mai 2004
- **K. El Allali**, M.R. Achaâban, A. Malan et P. Pévet. Démonstration de la nature endogène du rythme de la température corporelle chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*). Communication écrite. Réunion PRAD, ENA Meknes- Mai 2004.
- **K. El Allali**, M.R. Achaaban, M. Piro, J.-G. Egginger, C. Parmentier, P. Pévet et A. Calas. Cartographie immunohistochimique de neuropeptides dans l'hypothalamus du dromadaire (*Camelus dromedarius*). 23ème Congrès Vétérinaire Maghrébin. 14-15 April 2006. Hammamet Tunisie.
- **K. El Allali**, M.R. Achaâban, B. Vivien-Roels, B. Bothorel et P. Pévet. Variations saisonnières du rythme nyctéméral des concentrations de mélatonine plasmatique chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*). Communication écrite. 1^{ère} Réunion Scientifique du Groupement de Recherche International de Neurosciences (GDRI) France- Maroc, 29-30 novembre 2007. Rabat Maroc.
- **El Allali K**, Achaaban M R, Piro M, Bothorel B, Lakhdar-Ghazal N, Errami M, Calas A and Pévet P. (2009). Histological organization and distribution of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus of the camel (*Camelus dromedarius*). XI Congress of the European Biological Rhythms Society (EBRS), 22-28 Août, Strasbourg, France

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES PUBLICATIONS	v
TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES TABLEAUX	6
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	16
I. LES NOYAUX SUPRACHIASMATIQUES DE L'HYPOTHALAMUS : HORLOGE CIRCADIENNE PRINCIPALE.....	17
1. Genèse des oscillations circadiennes dans les SCN	17
2. Neuroanatomie et fonctionnement des SCN	19
3. La synchronisation à 24 h de l'horloge circadienne.....	23
3.1. Synchroniseur photique	25
3.2. Synchronisateurs non-photiques	26
4. Les sorties nerveuses et endocrines de l'horloge et la distribution des signaux circadiens	28
II. LA GLANDE PINEALE ET LE ROLE SPECIFIQUE DE LA MELATONINE	32
1. La glande pinéale	32
2. La Mélatonine	33
2.1. Synthèse et production	34
2.2. Rôle physiologiques.....	35
2.2.1. MEL et rythmes circadiens	36
2.2.2. MEL et rythmes saisonniers	38
2.3. Sites et mécanismes d'action	39
2.3.1. Récepteurs	39
2.3.2. Autres modes d'action	42
III. PARS TUBERALIS, MELATONINE ET REPONSE PHOTOPERIODIQUE	43
1. Morphologie et anatomie fonctionnelle de la Pars Tuberalis.....	43
2. Les récepteurs de la Mélatonine dans la Pars Tuberalis.....	44
3. La Pars Tuberalis : Horloge ? Circadienne et/ou Saisonnière ?	45
IV. L'HYPOTHALAMUS : ORGANE CIBLE ET ACTEUR DU CONTROLE PHOTOPERIODIQUE	46
1. L'Hypothalamus antérieur.....	48
1.1. Noyau suprachiasmatique.....	48
1.2. Noyau supra-optique	48
1.3. Noyau paraventriculaire.....	50
2. L'Hypothalamus Médiobasal	52
2.1. Noyau arqué.....	52
2.2. Noyau ventromédian.....	54
2.3. Noyau dorsomédian.....	54
3. Les autres noyaux et subdivisions de l'hypothalamus	56
3.1. Noyaux et Aire préoptiques.....	56
3.2. Noyaux de la subdivision hypothalamique postérieure	57
OBJET DU TRAVAIL	59
MATERIEL & METHODES	65
I. ANIMAUX.....	66
II. ETUDE DU RYTHME DE LA TEMPERATURE CORPORELLE.....	66
1. Capteur électronique de la température : lbutton	67

1.1.Descriptif	67
1.2.Programmation des capteurs	67
1.3.Choix du site d'implantation du capteur électronique	68
1.4.Chirurgie.....	68
2.Étable à contrôle photopériodique et thermique	69
III.DECEREBRATION ET PRELEVEMENTS DES CERVEAUX	69
IV.PRELEVEMENTS SANGUINS.....	70
V. DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE LA MELATONINE.....	70
1.Principe	70
2.Protocole.....	71
3.Validation du dosage chez le Dromadaire	72
VI. HYBRIDATION IN SITU	72
1.Principe	72
2.Protocole.....	73
VII.HISTOLOGIE CLASSIQUE	75
1.Principe	75
2.Coloration de Nissl	75
3.Technique.....	75
VIII.IMMUNOFLUORESCENCE.....	77
1.Principe	77
2.Protocole.....	78
2.1.Immunomarquage simple	78
2.2.Immunomarquage double.....	80
IX.DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE LOWRY.....	80
X.ANALYSES STATISTIQUES.....	81
RESULTATS	82
Chapitre I : Anatomie de l'hypothalamus et distribution de certains neuropeptides	83
I. INTRODUCTION	83
II.PROTOCOLE EXPERIMENTAL	86
III.RESULTATS	87
1.Hypothalamus préoptique	95
1.1.Description anatomique.....	95
1.1.1.Aires préoptiques	95
1.1.2.Noyaux préoptiques	95
1.1.3.Autres Noyaux	95
1.2.Contenu en neurones peptidergiques.....	96
2.Hypothalamus antérieur	99
2.1.Noyaux suprachiasmatiques	99
2.1.1.Description anatomique.....	99
2.1.2.Contenu en neuropeptides	100
2.2.Noyaux supra-optiques	117
2.2.1.Description anatomique.....	117
2.2.2.Contenu neuropeptidergique.....	117
2.3.Noyaux paraventriculaires	126
2.3.1.Description anatomique.....	126
2.3.2.Contenu neuropeptidergique.....	127
3.Hypothalamus médiobasal ou tubéral	137
3.1.Noyaux dorsomédians.....	137
3.1.1.Description anatomique.....	137

3.1.2.Contenu neuropeptidergique.....	138
3.2.Noyaux ventromédians	146
3.2.1.Description anatomique.....	146
3.2.2.Contenu neuropeptidergique.....	147
3.3.Noyau arqué.....	155
3.3.1.Description anatomique.....	155
3.3.2.Contenu neuropeptidergique.....	155
3.4.Noyau tubéral	156
3.4.1.Description anatomique.....	156
3.4.2.Contenu neuropeptidergique.....	157
4.Hypothalamus postérieur.....	166
4.1.Description anatomique.....	166
4.1.1.Noyau pré-mamillaire dorsal.....	166
4.1.2.Noyau pré-mamillaire ventral	166
4.1.3.Pars caudalis du noyau tubéro-mamillaire	166
4.1.4.Pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire.....	167
4.1.5.Noyau mamillaire médian	167
4.1.6.Noyau mamillaire latéral	167
4.2.Contenu neuropeptidergique.....	167
IV.DISCUSION	171
1.Anatomie.....	171
2.Contenu neuropeptidergique.....	175
2.1.Noyaux suprachiasmatiques	175
2.2.Noyaux paraventriculaires	182
2.3.Noyaux supraoptiques	184
2.4.Hypothalamus médiobasal.....	184
2.5.Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire	187
2.6.Autres régions hypothalamiques.....	190
2.6.1.Hypothalamus préoptique	190
2.6.2.Hypothalamus postérieur.....	191
2.6.3.Régions limitrophes de l'hypothalamus	192
Chapitre II : Variations saisonnières du rythme de la mélatonine chez le Dromadaire.....	193
I.PROTOCOLE EXPERIMENTAL	193
1.Animaux	194
2.Prélèvements et conditions expérimentales	194
2.1.Étude des variations saisonnières du profil plasmatique de la mélatonine.....	195
2.2.Étude de l'effet d'un créneau de lumière durant la nuit	195
3.Analyses statistiques	197
II.RESULTATS	198
III.DISCUSION.....	204
Chapitre III : Expression journalière du gène Aa-nat dans la glande pinéale du Dromadaire.....	207
I.PROTOCOLE EXPERIMENTAL	207
1.Animaux	207
2.Prélèvement des tissus.....	208
3.Hybridation in situ	208
4.Dosage de la mélatonine dans la glande pinéale.....	209
5.Analyse statistique	209
II.RESULTATS ET DISCUSSION	209

Chapitre IV : Rythme circadien de la température corporelle chez le Dromadaire	213
Introduction	213
I. IMPLICATION DE L'ACTIVITE LOCOMOTRICE DANS LA GENESE DU RYTHME DE LA TEMPERATURE: EXPERIENCE 1.....	216
1. Animaux	216
2. Protocole expérimental.....	216
3. Résultats.....	217
II. DEMONSTRATION DE L'EXISTENCE D'UNE HORLOGE BIOLOGIQUE	218
1. Suivi du rythme de la température corporelle avec un thermomètre digital : Expérience 2.....	218
1.1. Animaux	218
1.2. Protocole expérimental.....	219
1.3. Résultats.....	221
2. Suivi du rythme de la température corporelle avec un capteur électronique.....	221
III. DEMONSTRATION DE L'ENTRAINEMENT PAR LE CYCLE LUMIERE-OBSCURITE.....	225
1. Suivi du rythme de la température corporelle avec un thermomètre digital : Expérience 3.....	225
1.1. Animaux	225
1.2. Protocole expérimental.....	225
1.3. Résultats.....	225
2. Suivi du rythme de la température corporelle avec un capteur électronique : expérience 4.....	226
2.1. Animaux	226
2.2. Protocole expérimental.....	227
2.3. Résultats.....	227
IV. DEMONSTRATION DE L'ENTRAINEMENT DU RYTHME PAR LE CYCLE DE LA TEMPERATURE AMBIANTE	239
1. Suivi du rythme de la température corporelle avec un thermomètre digital : Expérience 5.....	239
1.1. Animaux	239
1.2. Protocole expérimental.....	239
1.3. Résultats.....	240
2. Suivi du rythme de la température corporelle avec un capteur électronique.....	241
2.1. Entraînement par le cycle de température ambiante en lumière constante LL : Expérience 6	241
2.1.1 Protocole expérimental.....	241
2.1.2. Résultats.....	242
2.2. Entraînement par le cycle de température ambiante en obscurité constante DD : Expérience 7	254
2.2.1. Protocole expérimental.....	254
2.2.2. Résultats.....	255
V. PUISSANCE D'ENTRAINEMENT DU CYCLE LD VERSUS LE CYCLE DE TEMPERATURE AMBIANTE : EXPERIENCE 8.....	267
1. Animaux	267
2. Protocole expérimental.....	267
3. Résultats.....	268
3.1. Rythme de la température corporelle.....	268
3.2. Rythme de la mélatonine	269
1. La nature circadienne du rythme	279
2. Facteurs internes influençant le rythme : Activité locomotrice et prise alimentaire.....	280
3. Facteurs externes influençant le rythme.....	281
3.1. Entraînement du rythme par le cycle lumière-obscurité.....	281
3.2. Température ambiante : thermorégulation	282
3.3. Le cycle de température ambiante comme un zeitgeber.....	285

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	289
I.SCN : DONNEES MORPHOLOGIQUES.....	289
II.ENTRAINEMENT PAR LE CYCLE LUMIERE OBSCURITE.....	293
1.Le rythme de mélatonine	293
2.Rythme de la température corporelle.....	294
III.ENTRAINEMENT NON PHOTIQUE PAR LE CYCLE DE LA TEMPERATURE AMBIANTE	294
IV.SAISONNALITE DE REPRODUCTION ET INTEGRATION DU MESSAGE PHOTOPERIODIQUE	296
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	299
ANNEXE	318

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Moments de lever et de coucher du soleil aux équinoxes et aux solstices des quatre saisons d'investigation à la station expérimentale de Lâayoune.
- Tableau 2** Valeurs moyennes \pm E.S.M. de ϕ_1 et ϕ_2 , calculées par la régression non linéaire en solstice d'hiver et d'été.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 Schéma représentant les mécanismes moléculaires de l'Horloge circadienne.
- Figure 2 Anatomie des SCN et localisation histologique des principaux neuropeptides chez le rat.
- Figure 3 Principales afférences nerveuses responsables de la synchronisation photique et non photique de l'horloge.
- Figure 4 Représentation des principales voies nerveuses efférentes des SCN.
- Figure 5 Représentation schématique de la voie polynuronale rétino-hypothalamo-pinéale, impliquée dans la synthèse de la mélatonine chez les Mammifères.
- Figure 6 Voie de biosynthèse de la mélatonine dans la glande pinéale des Mammifères.
- Figure 7 Anatomie et rapports de la pars tuberalis avec les autres lobes de l'hypophyse chez différentes espèces.
- Figure 8 Schéma de l'anatomie fonctionnelle de l'axe hypothalamo hypophysaire.
- Figure 9 Photographie de 3 thermochron Ibutton® DS1922L.
- Figure 10 Courbes de l'inhibition parallèle obtenues en variant des quantités de la mélatonine des standards et par dilution en série des échantillons de plasma de nuit.
- Figure 11 Cartographie rostro-caudale des noyaux et aires hypothalamiques du Dromadaire.
- Figure 12 Schéma synthétisant la distribution de l'enzyme TH et des neuropeptides étudiés dans l'hypothalamus préoptique du Dromadaire.
- Figure 13 Représentation schématique de l'évolution rostro-caudale du noyau suprachiasmatique chez le Dromadaire.
- Figure 14 Photomicrographie d'une coupe sagittale de l'hypothalamus du Dromadaire,
- Figure 15 Photomicrographies du SCN rostral après une immunofluorescence à la TH.
- Figure 16 Photomicrographies du SCN rostral après immunomarquage à la TH.
- Figure 17 Photomicrographies des SCN après marquage de la TH.
- Figure 18 Photomicrographies montrant les 2 populations de neurones à TH identifiées dans le SCN nu.
- Figure 19 Photomicrographie du SCN rétrochiasmatique après marquage de la TH et du VIP.
- Figure 20 Photomicrographies des parvoneurones du SCN rostral après un double -marquage de la TH et du VIP.
- Figure 21 Photomicrographies du tubercule du SCN rostral après un double-marquage pour la TH et pour l'AVP.
- Figure 22 Photomicrographies du SCN nu droit après un double marquage TH et OT.
- Figure 23 Photomicrographies du SCN nu gauche après un double marquage d'AVP et TH.
- Figure 24 Photomicrographies de la région suprachiasmatique latérale après un double marquage VIP et TH.

- Figure 25 Photomicrographies des SCN nus après un immunomarquage pour le VIP.
- Figure 26 Schéma synthétisant la distribution de la TH et des neuropeptides étudiés dans le SCN du dromadaire.
- Figure 27 Photomicrographies du SON nu et SONr après colorations histologiques.
- Figure 28 Photomicrographies du SON nu après un double marquage AVP et OT.
- Figure 29 Photomicrographies du SON après un double marquage AVP et OT.
- Figure 30 Photomicrographies du SON rétrochiasmatisque sur coupes parasagittales après un double marquage AVP et OT.
- Figure 31 Photomicrographies du SONr et du SON nu après un double marquage AVP et OT.
- Figure 32 Photomicrographies du SONr après un immunomarquage de la TH.
- Figure 33 Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le SON du Dromadaire.
- Figure 34 Photomicrographies des différentes subdivisions du PVN moyen chez le Dromadaire.
- Figure 35 Photomicrographie des noyaux de l'hypothalamus antérieur après un double marquage AVP et OT.
- Figure 36 Photomicrographies du PVN après un double marquage AVP et OT.
- Figure 37 Photomicrographies d'un double marquage montrant les fibres à AVP et à OT originaires des PVN.
- Figure 38 Photomicrographies de la subdivision PanPO du PVN caudal après un immunomarquage pour l'OT.
- Figure 39 Photomicrographies du PVN après un immunomarquage de la TH.
- Figure 40 Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le PVN du Dromadaire.
- Figure 41 Photomicrographies illustrant la position et la cytologie du DMH.
- Figure 42 Photomicrographies du DMH après un double marquage AVP et OT.
- Figure 43 Photomicrographies due DMH après un double marquage AVP et OT.
- Figure 44 Photomicrographie du DMH après un double marquage OT et TH.
- Figure 45 Photomicrographie du DMH après un immunomarquage de TH.
- Figure 46 Photomicrographie du DMH après un immunomarquage du VIP.
- Figure 47 Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le DMH du Dromadaire.
- Figure 48 Photomicrographies du début du VMH avec l'apparition de la partie ventrolatérale.
- Figure 49 Photomicrographies du VMH après un double marquage AVP et OT.
- Figure 50 Photomicrographie des neurones du VMHnC après un double marquage AVP et OT.
- Figure 51 Photomicrographies de la subdivision VMHnVL du noyau ventromédian après un double marquage AVP et OT.

- Figure 52 Photomicrographies du VMH après un double marquage TH et VIP.
- Figure 53 Photomicrographies du VMH après un immuno-marquage de la TH.
- Figure 54 Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le VMH du Dromadaire.
- Figure 55 Photomicrographies du noyau arqué après des colorations histologiques.
- Figure 56 Photomicrographie de la région latéro-médiane de l'aire rétrochiasmatique, après un double marquage OT et TH.
- Figure 57 Photomicrographies montrant les noyaux de la région infundibulaire après un double marquage AVP et OT.
- Figure 58 Photomicrographies du noyau arqué et tubéral après un immunomarquage de la TH.
- Figure 59 Photomicrographies du noyau arqué et tubéral sur un niveau de coupe caudale, après un immunomarquage pour la TH.
- Figure 60 Photomicrographie du noyau arqué après un immunomarquage du NPY.
- Figure 61 Schéma résumant la distribution de la TH et des neuropeptides étudiés dans le noyau arqué et tubéral du Dromadaire.
- Figure 62 Photomicrographie représentant les noyaux mamillaires après coloration histologique au bleu Toluidine.
- Figure 63 Photomicrographies montrant les neurones de la pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire (SM) après une coloration histologique au bleu de toluidine.
- Figure 64 Schéma résumant la distribution de la TH et des neuropeptides étudiés dans les noyaux de la région mamillaire du Dromadaire.
- Figure 65 Moments des prélèvements sanguins pour l'étude des variations saisonnières de la sécrétion de la mélatonine
- Figure 66 Moments des prélèvements sanguins pour l'étude de l'effet d'un créneau de lumière pendant la nuit.
- Figure 67 Profil de sécrétion de la mélatonine chez deux chèvres sur une période de trois nuits consécutives.
- Figure 68 Variations saisonnières du rythme de sécrétion de la mélatonine chez les dromadaires adultes durant les deux solstices d'hiver et d'été.
- Figure 69 Variations saisonnières du rythme de sécrétion de la mélatonine chez les dromadaires jeunes durant les deux solstices d'hiver et d'été.
- Figure 70 Concentrations plasmatiques de la mélatonine chez cinq chèvres exposées durant la nuit à un créneau de lumière d'une période d'une heure et 45 minutes.
- Figure 71 Comparaison du rythme de la sécrétion plasmatique de la mélatonine entre les Dromadaires jeunes (n=6) et adultes (n=11) aux moments des équinoxes du printemps et de l'automne et des solstices de l'hiver et de l'été.
- Figure 72 Exemples de tissus de glande pinéale et du cortex d'un dromadaire, hybridés avec une oligosonde antisens et radioactive d'*Aa-nat*.

- Figure 73 Variations entre le jour et la nuit des niveaux moyens des ARNm du gène *Aa-nat* (A) et de la concentration de la mélatonine (B) dans la glande pinéale du Dromadaire.
- Figure 74 Rythme moyen de la température rectale de 6 chameilles maintenues sous des conditions naturelles de photopériode et de température ambiante et sous une activité locomotrice restreinte par un décubitus sternal forcé.
- Figure 75 Mesure de l'activité locomotrice d'une chameille par un actimètre placé sur le membre thoracique.
- Figure 76 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des huit chameilles du groupe 2, sous les différentes conditions expérimentales des 3 phases de l'expérience 2.
- Figure 77 Représentation des points de références de la phase ascendante chez les huit chameilles du groupe 2 durant la phase I de l'expérience 2.
- Figure 78 Courbe moyenne de 24 heures de la température corporelle des huit chameilles du groupe 2, calculée pour la phase I de l'expérience 2.
- Figure 79 Courbes moyennes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des huit chameilles du groupe 2 durant l'expérience 3.
- Figure 80 Evolution de la température corporelle chez représentative, sous les conditions de l'expérience 4
- Figure 81 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chameilles du groupe 3 sous les conditions de l'expérience 4.
- Figure 82 Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chameille durant l'expérience 4.
- Figure 83 Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chameilles durant l'expérience 4.
- Figure 84 Régression par la méthode du Cosinor, effectué sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 4.
- Figure 85 Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées dans chaque phase de l'expérience 4.
- Figure 86 Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 4.
- Figure 87 Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 8 chameilles (groupe 2) pendant chacune des deux phases de l'expérience 5.
- Figure 88 Evolution de la température corporelle chez une chameille représentative, dans les conditions de l'expérience 6.
- Figure 89 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chameilles du groupe 3, dans les conditions de l'expérience 6.
- Figure 90 Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chameille durant l'expérience 6.
- Figure 91 Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chameilles durant l'expérience 6.
- Figure 92 Régression par la méthode du Cosinor, effectuée sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 6.

- Figure 93** Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées dans chaque phase de l'expérience 6.
- Figure 94** Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 6.
- Figure 95** Evolution de la température corporelle chez une chamelle représentative, sous les conditions de l'expérience 7.
- Figure 96** Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chameles du groupe 3, sous les conditions de l'expérience 7.
- Figure 97** Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle durant l'expérience 7.
- Figure 98** Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle des 7 chameles durant l'expérience 7.
- Figure 99** Courbes de 24 heures de la température corporelle de deux chameles durant l'expérience 7.
- Figure 100** Régression par la méthode du Cosinor, effectué sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 7.
- Figure 101** Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées dans chaque phase de l'expérience 7.
- Figure 102** Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 7.
- Figure 103** Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chameles sous les conditions de l'expérience 7.
- Figure 104** Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chameles du groupe 3, dans les conditions de l'expérience 8.
- Figure 105** Evolution de la température corporelle chez une chamelle dans les conditions de l'expérience 8
- Figure 106** Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle durant l'expérience 8.
- Figure 107** Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chameles durant l'expérience 8.
- Figure 108** Régression par la méthode du Cosinor, effectuée sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 8.
- Figure 109** Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées durant les deux phases expérimentales de l'expérience 8.
- Figure 110** Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 7.
- Figure 111** Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chameles du groupe 3 sous les conditions de l'expérience 8.

LISTE DES ABREVIATIONS

α -MSH	Melanocyte-Stimulating Hormone.
β -LPH	β -lipotropin.
3V	3 ^{ème} ventricule.
5-HIAA	5-hydroxyindoleacetic acide.
5-HT	5 hydroxy-tryptamine ou sérotonine.
5-htp	5-hydroxy-L-tryptophane.
AADC	Aminoacide aromatique décarboxylase.
<i>Aa-nat</i> /AA-NAT	Gène/protéine : Arylalkylamine-N-acétyltransférase.
ac	Commissure antérieure.
Ac	Noyau accumbens.
ACTH	Adreno CorticoTropic Hormone.
AD	Noyau antéro-dorsal du thalamus.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
ADNc	ADN complémentaire.
AgRP	Agouti-related protein.
AHA	Aire hypothalamique antérieure.
AM	Noyau antéro-médial du thalamus.
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique.
POA	Aire préoptique.
APUD	Amine precursor uptake decarboxylase cell.
AR	Neurones arrondis.
Arc	Noyau arqué.
ARN	Acide ribonucléique.
ARNm	Acide ribonucléique messenger.
AV	Noyau antéro-ventral du thalamus.
AVP	Arginine-vasopressine.
Bmal/BMAL	Gène/protéine : Brain and muscle ARNt-like protein 1
BSA	Sérum albumine bovin.
CART	Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript.
CGR	Cellules ganglionnaires de la rétine.
<i>clock</i> /CLOCK	Gène/proteine "Circadian Locomotor Output Cycles Caput".
CP	<i>Pars caudalis</i> du noyau tubéro-mamillaire.
Cp	Pédoncule cérébral.
cpPVN	Colonne périventriculaire du PVN.
CRE	Elément de réponse à l'AMPc.
CREB	Protéine se liant à l'élément de réponse génique à l'AMPc (CRE).
CRF	Corticotropin-releasing factor.
CRH	Corticotropin-releasing hormone.
<i>cry</i> /CRY	Gène/ protéine cryptochrome.
DB	Bande diagonale de Broca,
DBh	Noyau de la bande diagonale de Broca.
DCX	Doublecortin.
DD	Obscurité constante.
DDTC	Obscurité constante et température ambiante constante.

DDTI	Obscurité constante et cycle de température ambiante inversé (chaud la nuit et froid le jour)
DDTNI	Obscurité constante et cycle de température ambiante non inversé (chaud le jour et froid la nuit).
DMH	Noyau dorsomédian,
DPM	Noyau prémamillaire dorsal.
ES	Erreur standard.
ESM	Erreur standard moyenne.
FF	Neurones fusiformes.
FSH	Folicule-stimulating hormone.
Fx	Fornix.
GABA	Acide gamma amino-butérique.
GAD	Glutamic acid decarboxylase.
GAL	Galanine.
GH	Hormone de croissance ou Growth Hormone.
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique.
GP	<i>Globus pallidus</i> .
GPCRs	Récepteurs couplés la protéine G.
GRP	Gastrin Releasing Peptide.
HIOMT	Hydroxyindole-0-méthyltransférase.
ic	Capsule interne.
ICj	Îlots de <i>Calleja</i> .
IF	Inhibiting factor.
IGL	Feuillet intergénéral latéral du thalamus.
LC	<i>Locus coeruleus</i> .
LD	Cycle lumière-obscurité.
L-DOPA	Di-hydroxy-Phényl-Alanine.
LDTI	Cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante inversé (chaud la nuit et froid le jour)
LDTNI	Cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante non inversé (chaud le jour et froid la nuit).
LH	Hypothalamus latéral.
LH (police gras)	Luteinizing hormone.
LHRH	Luteinizing hormone Releasing Hormone.
LL	Lumière constante.
LLTC	Lumière constante et température ambiante constante.
LLTI	Lumière constante et cycle de température ambiante inversé (chaud la nuit et froid le jour)
LLTNI	Lumière constante et cycle de température ambiante non inversé (chaud le jour et froid la nuit).
LM	Noyau mamillaire latéral.
LPOA	Aire préoptique latérale.
LV	Ventricule latéral.
MAN	Noyau accessoire magnocellulaire de l'hypothalamus latéral.
MC	Commissure supra-mamillaire.
MD	Noyau médiodorsal du thalamus.

ME	Eminence médiane.
MEL	Mélatonine.
Met-enk	Methionine-enképhaline.
MHA	Aire hypothalamique médiale.
MM	Noyau mamillaire médian,
MPOA	Aire préoptique médiane.
MRe	Récessus mamillaire du 3V.
mt	Tronc mamillo-thalamique.
NA	Noradrénaline.
Nep	Noyau préoptique périventriculaire.
NOS	Nitric oxide Synthase.
NPY	Neuropeptide Y.
on	Nerf optique.
ot	Tronc optique.
OT	Ocytocine.
OVLT	<i>Organum vasculosum de la lamina terminalis.</i>
OVLT-V	Partie ventrale de l'OVLT.
OVLTvl	Partie ventrolatérale de l'OVLT.
ox	Chiasma optique.
PA	Aire caudale (Hypothalamic Posterior Area)
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide.
PAF	Paraformaldéhyde.
PanDC	Subdivision dorsale du PVN.
PanLM	Subdivision latérale des magnoneurones du PVN.
PanMP	Subdivision des parvoneurones médiaux du PVN.
PanPO	Subdivision postérieure du PVN.
PanPV	Pars accessoire du PVN.
PanV	Subdivision ventrale du PVN.
paPVN	Pars accessoire du PVN.
PBS	Tampon phosphate salin.
PC	Photopériode courte.
PD	<i>Pars distalis</i> de l'adénohypophyse.
Pe	Noyau périventriculaire.
Pea	Noyau périventriculaire antérieur.
PeF	Noyau périfornical.
Pep	Noyau préoptique périventriculaire.
per/PER	Gène/ protéine « <i>period</i> »
PKA	Protéine Kinase dépendante de l'AMPc.
PKC	Protéine Kinase dépendante de Ca ²⁺ et /du Diacylglycérol.
PL	Photopériode longue.
POMC	Pro-OpioMelanoCortin.
PRL	Prolactine.
PT	<i>Pars Tuberalis</i> de l'adénohypophyse.
PTn	Noyau paratenial du thalamus.
PVA	Noyau paraventriculaire antérieure thalamique.
PVN	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus.

SCN	Noyau suprachiasmatique.
SH	Noyau sépto-hypothalamique ou septal.
SHI	Noyau sépto-hypothalamique latéral,
SHm	Noyau sépto-hypothalamique médial.
SM	Pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire.
Smt	Noyau submamillo-thalamique.
SOM	Somatostatine.
SON	Noyau supra-optique.
SONnu	Partie antéro-chiasmatique du SON.
SONr	Partie rétrochiasmatique du SON.
SoR	Récessus supra-optique.
SP	Substance P.
ST	Noyau de la stria terminalis.
STh	Noyau subthalamique.
TC	Aire du tuber cinereum.
TC	Température ambiante constante.
TGF- α	Transforming Growth Factor Alpha.
TH	Tyrosine hydroxylase.
TIS	Sulcus tubéro-infundibulaire.
TRH	Tractus rétino-hypothalamique.
TSH	Thyroid stimulating hormone.
Tu	Noyau tubéral.
V	Vaisseau sanguin.
VIP	Peptide Intestinal Vasoactif
vISCN	Partie ventrolatérale du SCN.
VMH	Noyau ventromédian.
VMHnC	Partie intermédiaire ou centrale du VMH.
VMHnDM	Partie dorso-médiane du VMH.
VMHnVL	Partie ventrolatérale du VMH.
VP	Vasopressine
VPm	Noyau pré-mamillaire ventrale.
ZI	<i>Zona incerta.</i>

INTRODUCTION

Les rythmes journaliers et saisonniers observés dans les processus biologiques, physiologiques et comportementaux sont une donnée fondamentale de tous les êtres vivants, de l'organisme unicellulaire à l'Homme. Pour survivre, les êtres vivants doivent s'adapter et anticiper les changements physiques de l'environnement (cycle jour-nuit, variations climatiques associées aux saisons). Les rythmes biologiques (circadiens et saisonniers) reflètent ainsi la nécessité que certains événements se produisent de façon optimale à un moment précis du jour ou de l'année. Le cycle veille-sommeil, le cycle d'activité locomotrice (diurne ou nocturne selon les espèces), l'involution et la reprise de l'activité sexuelle au cours de l'année, le cycle d'hibernation, les cycles métaboliques, sont des exemples précis de ces processus physiologiques adaptatifs (« *predictive homeostasis* »).

La nécessité qu'un processus biologique se déclenche à un moment précis, implique que les êtres vivants puissent se situer dans le temps. La plupart des espèces utilisent à cette fin la photopériode, un facteur externe prédictif et stable au cours des années. La rotation de la terre autour d'elle-même induit, en effet l'alternance jour/nuit dont la durée est toujours égale à 24 heures, quelque soit la saison et la latitude. Comme l'axe de rotation est de $23,5^\circ$ et que la terre tourne aussi autour du soleil, la surface d'exposition au rayonnement solaire varie au cours de l'année, ce qui définit les variations annuelles de la longueur du jour (photopériode) associées aux variations climatiques saisonnières. De ce fait, la température ambiante, la disponibilité alimentaire, les précipitations et le degré de l'hygrométrie présentent aussi des variations annuelles qui, dans des biotopes particuliers (exemples : zones équatoriales, tropicales ou désertiques), peuvent également être utilisées comme synchroniseurs, seuls ou en synergie avec la photopériode.

Chez les Mammifères, les mécanismes fonctionnels impliqués dépendent d'un réseau qui comprend une horloge circadienne principale, de multiples structures périphériques capables elles-mêmes de générer des rythmes (oscillateurs périphériques), des synchronisateurs de l'horloge, des voies nerveuses afférentes de l'horloge et efférentes de celle-ci pour distribuer le signal circadien, et des effecteurs neuroendocrines qui transforment le signal en une réponse endocrine. La glande pinéale est l'un de ces effecteurs qui joue un rôle fondamental dans le contrôle des fonctions saisonnières.

I. Les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus : horloge circadienne principale

Moore et Eichler ont montré en 1972, que la lésion électrolytique de l'hypothalamus ventral entraînait chez le Rat une disparition de la rythmicité du profil plasmatique de la corticostérone. La même année, Stephan et Zucker (1972) démontrèrent que d'autres rythmes, notamment l'activité locomotrice et la prise d'eau disparaissent également après lésion des noyaux suprachiasmatiques (SCN). Plus tard, la greffe des SCN fœtaux qui rétablit le rythme de l'activité locomotrice et de la prise d'eau chez des animaux préalablement rendus arythmiques par lésions des SCN (Lehman et al., 1987), a permis de valider le rôle des SCN dans la genèse des rythmes et leur contrôle rythmique des fonctions physiologiques. Les premiers travaux réalisés *in vivo* chez le Rat ont démontré que les neurones des SCN présentent une activité électrique rythmique avec une acrophase diurne (Inouye et Kawamura, 1979). La même étude a montré que cette rythmicité était maintenue lorsque les SCN étaient expérimentalement isolés des structures environnantes. Quelques années plus tard, la mise en évidence d'une activité électrique rythmique des neurones enregistrée *in vitro* a pu confirmer le caractère intrinsèque des oscillations observées et la nature endogène de l'horloge (Green et Gillette, 1982 ; Groos et Hendricks, 1982).

1. Genèse des oscillations circadiennes dans les SCN

L'avancée opérée ces dernières années dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire a permis l'identification et la caractérisation d'un grand nombre de gènes horloges (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1*, *Dec2*, *Rev-erba*, *Caséine kinase I ϵ* et *I*, etc.) et progressivement, un modèle moléculaire responsable de la genèse d'un rythme circadien a été construit (Figure 1). Il est fondé sur des rétrocontrôles positifs et négatifs impliquant l'expression rythmique d'ARN codant pour des protéines, qui elles-mêmes en interagissant, régulent la transcription de leurs propres gènes à l'échelle de 24 heures.

CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Caput) et **BMAL1** (Brain and muscle ARNt-like protein 1) **sont deux régulateurs positifs** de la boucle de rétroaction car ces deux facteurs de transcription s'associent en un dimère capable d'activer la transcription des gènes : "*period*" (*Per*), "cryptochrome" (*Cry*), "*deleted in esophageal cancer*" (*Dec*) et *Rev-erba*. La protéine REV-ERB α , quant à elle, inhibe la transcription du gène *Bmal1*. Les protéines CRY et DEC inhibent en retour l'activation de la transcription de *Per*, *Cry* et *Rev-erba* par l'hétérodimère CLOCK/BMAL. Une fois que la protéine BMAL1 est synthétisée, elle peut dimériser avec CLOCK pour activer

de nouveau la transcription des gènes *Per*, *Cry* et *Rev-erba*. D'autres gènes appelés « gènes contrôlés par l'horloge » ont une transcription dépendante des « gènes-horloges » et forment la voie de sortie des messages rythmiques.

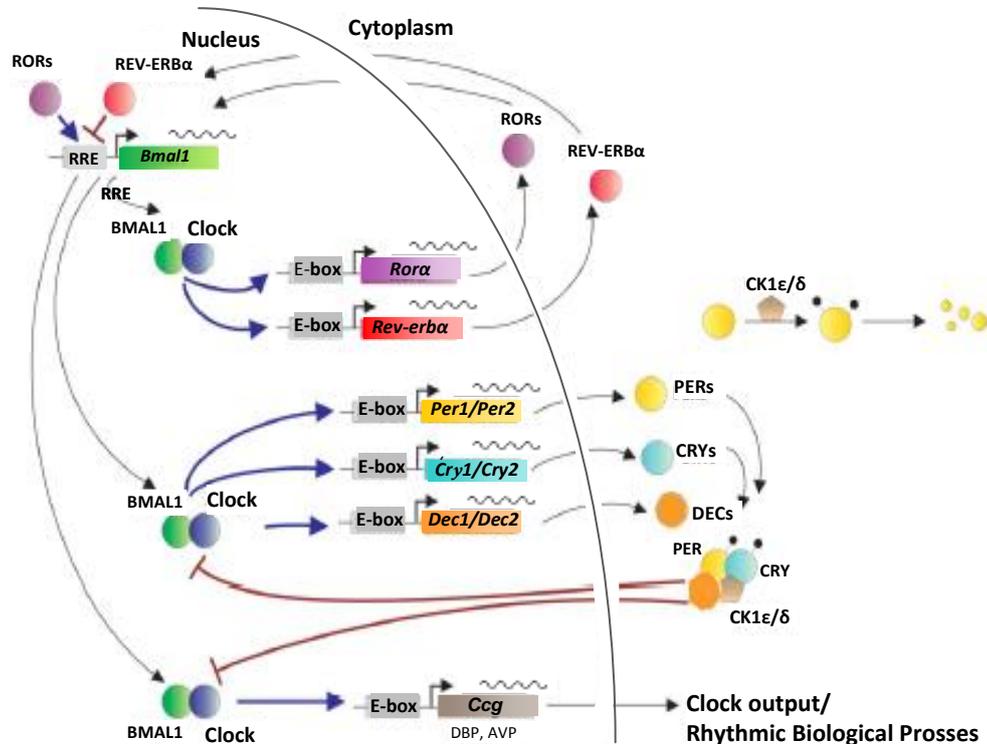


Figure 1 : Schéma représentant les mécanismes moléculaires de l'Horloge circadienne. D'après Ko et Takahashi (2006)

L'horloge circadienne est toutefois une structure complexe. Elle est composée de plusieurs populations neuronales qui possèdent des afférences et des efférences distinctes. Les analyses électrophysiologiques montrent que la majorité de ces neurones présentent des propriétés d'horloge et que chacun d'entre eux oscille à son propre rythme. Si les données moléculaires permettent de comprendre comment l'horloge est capable d'engendrer un rythme, elles doivent maintenant être replacées dans le contexte d'une horloge constituée d'un ensemble cohérent d'unités fonctionnelles distinctes et interconnectées. Comment, de ces éléments dispersés, résulte un signal ou des signaux qui sont eux-mêmes distribués à l'organisme, restent encore la question principale. Le couplage intercellulaire serait déterminant et même si l'implication de l'acide gamma amino-butyrique (GABA), de récepteurs GABA, de jonctions gap et de neuropeptides a été suggérée (Albus et al., 2005 ; Long et al., 2005), il est probable que cette construction du signal soit le résultat de l'organisation fonctionnelle complexe du SCN.

Il faut noter que la présence et l'expression rythmique de gènes « horloge » n'est pas exclusive des SCN. De nombreuses régions du cerveau, ainsi que des tissus non neuronaux à la périphérie, expriment ces gènes de façon rythmique. Ces oscillateurs sont entraînaables à 24h par des facteurs externes (par exemple, la nourriture dans le foie) ou par les signaux nerveux et/ou endocrines en provenance des SCN. La lésion des SCN qui entraîne au niveau physiologique une arythmie pratiquement totale, provoque également une disparition des rythmes dans certains oscillateurs périphériques. Les SCN, s'ils ne sont pas les seuls à exprimer une rythmicité, apparaissent donc nécessaires au bon fonctionnement de l'ensemble. En entraînant directement ou indirectement les autres oscillateurs du système circadien, ils joueraient bien un rôle d'horloge principale assurant ainsi, sans de grandes dépenses énergétiques, la coordination temporelle des fonctions d'un individu. Même si dans le présent travail nous n'avons pas abordé ce point, le rôle de ces oscillateurs « périphériques » dans l'homéostasie temporelle des fonctions devra dans l'avenir être considéré.

2. Neuroanatomie et fonctionnement des SCN

Le SCN est une structure hypothalamique paire et symétrique (Figure 2). De forme ovoïde, il peut être clairement distingué dans les régions rostrale et médiale, et selon les espèces moins différencié au niveau de la région caudale. Chez le Rat, le SCN est constitué d'environ 20 000 neurones. Il contient également de très nombreux astrocytes dont le rôle, du moins dans la rythmicité est encore mal connu. Différentes populations de neurones aux localisations bien précises et identifiables par leur contenu ont été identifiées (Figure 2). La région dorsomédiane du SCN (ou « Shell ») par exemple, est riche en vasopressine (VP) alors que des neurones synthétisant le VIP (Vasoactif Intestinal Peptide) caractérisent la région ventrale et ventrolatérale, « Core ». D'autres neurones synthétisent du GRP (Gastrin Releasing peptide) dans la région ventrolatérale ou de la somatostatine dans la région dorsale, mais aussi l'angiotensine II, la neurotensine, la thyrostimuline et la substance P. Quasi tous les neurones du SCN synthétisent le GABA, un transmetteur inhibiteur, et on sait actuellement que d'autres molécules peuvent être exprimées dans le SCN, particulièrement le cas de la calbindine, une protéine liant le Ca^{2+} , qui présente une distribution variable en fonction de l'espèce considérée. Deux médiateurs sont particulièrement présents dans le SCN en terme d'afférences : le glutamate qui provient des cellules ganglionnaires rétiniennes (CGR) à mélanopsine, et le NPY originaire du feuillet intergénéculé latéral (IGL). Ce descriptif montre que les neuromédiateurs ou neurotransmetteurs du SCN susceptibles de distribuer une information circadienne synchronisée, sont multiples et suggère fortement des fonctions différentes pour ces diverses populations de neurones. Il s'avère ainsi important d'explicitier le rôle que chaque population neuronale du SCN joue dans les processus de synchronisation de l'horloge et celles responsables

de la construction et de la transmission du message circadien aux structures cérébrales et *in fine* à l'organisme tout entier. Les travaux actuels effectués chez le Rat sur l'expression de la protéine du gène *c-Fos* et la distribution des ARNm des gènes *Per1* et *Per2* dans les SCN après une stimulation lumineuse, montrent que les neurones à VIP localisés dans la partie ventrolatérale seraient plus particulièrement impliqués dans la synchronisation par la lumière, alors que les neurones à VP localisés dans la partie dorsomédiane joueraient un rôle crucial dans l'élaboration et la distribution des signaux circadiens synchronisés ou non. La preuve en a été donnée par le fait que l'ARNm de la VP présente des variations journalières avec une acrophase diurne (Rat : (Larsen et *al.*, 1994 ; Kalsbeek et *al.*, 1995), Souris : (Smith et Carter, 1996), hamster sibérien : (Duncan et *al.*, 1995), hamster doré : (Duncan et *al.*, 2001)) qui se maintient en conditions constantes, (Cagampang et *al.*, 1994) comme la protéine codée par cet ARNm (Yamase et *al.*, 1991), prouvant son caractère endogène.

Il serait hasardeux toutefois de généraliser ces résultats obtenus chez le Rat et les autres rongeurs de laboratoire. L'importance dans ce domaine d'une approche comparée n'est pas à démontrer, ne serait ce que parce que chez le vison par exemple, les rythmes circadiens et saisonniers s'expriment normalement alors que son SCN est dépourvu de vasopressine (Larsen et Mikkelsen, 1993). Cette observation met en exergue que selon les espèces, leurs conditions environnementales de vie, et les processus adaptatifs dont ils doivent se munir, d'autres neurotransmetteurs pourraient être responsables du transfert des signaux circadiens. Les travaux effectués chez la Souris et l'*Arvicanthis ansorgei* (un rongeur diurne) suggèrent l'implication du VIP dans la régulation des oscillations circadiennes. Chez le Rat cependant, des variations rythmiques nycthémerales du VIP (peptide et ARNm) sont observées, mais ce rythme n'est pas endogène et son induction dépend de l'alternance jour/nuit (Albers et *al.*, 1990 ; Shinohara et *al.*, 1993 ; Yang et *al.*, 1993 ; Ibata et *al.*, 1993 ; Larsen et *al.*, 1994). A l'heure actuelle il est admis que les neurones à VIP jouent un rôle clé dans les mécanismes de synchronisation par la lumière du fait que les afférences aux SCN originaires des CGR et celles en provenance de l'IGL, structure qui elle-même est innervée par les CGR, les contactent synaptiquement. Le rôle exact de ces neurones à VIP dans les SCN est encore peu clair. En outre, le fait que l'absence du VIP et/ou de ses récepteurs VPAC(2) (Souris déficiente en *Vipr2*) entraîne une incapacité à ces souris à entraîner et à maintenir les rythmes circadiens, tant sur un plan moléculaire (gènes horloge *mPer1*, *mPer2*, *mCry1* et gène de la VP) que comportemental (activité locomotrice perturbée) (Harmar et *al.*, 2002) est un argument fort au rôle que cette population neuronale joue dans les mécanismes de synchronisation par la lumière. Cette hypothèse est renforcée du fait qu'*in vitro* l'application journalière

Une très forte population de neurones GABAergiques existe dans les SCN (Moore et *al.*, 2002) mais encore une fois avec des variations inter-espèces importantes. Chez le Mouton, le GABA semble être co-localisé uniquement avec le VIP (Jensen et *al.*, 1994). Chez le Rat le marquage est réparti sur tout le SCN. Il est présent dans 66% des neurones à VIP et 32% des neurones à VP (Castel et Morris, 2000). L'hétérogénéité de la distribution des récepteurs GABA_B et du GABA lui-même à travers son enzyme Glutamate décarboxylase, entre la région dorsale à VP et ventrale à VIP, confère à ce neurotransmetteur des effets différents selon la sub-région du SCN (Belenky et *al.*, 2008).

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur, très répandu dans le système nerveux central. Dans le SCN, des neurones à glutamate ont été observés dans la région dorso-médiane (Csáki et *al.*, 2000). Ces neurones auraient un rôle dans la distribution du signal circadien (voir après).

Nous ne pouvons pas passer sous silence les autres populations décrites dans le SCN, car la grande variabilité observée entre les différentes espèces, suggère des rôles différents. Chez le Rat, des neurones à Somatostatine (SOM) sont détectés par hybridation *in situ* aux niveaux intermédiaires, entre la population de VIP et de la VP (Tanaka et *al.*, 1996). Des interconnexions axo-somatiques ont été relevées entre la somatostatine avec la VP, le VIP et le GRP (Romijn et *al.*, 1997). L'immunoréactivité des neurones à SOM diminue avec l'âge chez le Rat (Biemans et *al.*, 2002) mais pas chez le hamster syrien (Duncan et *al.*, 2001). L'immunoréactivité de la SOM montre des variations circadiennes (Fukuhara et *al.*, 1993). De même, la quantification de l'ARNm de SOM dans le SCN montre l'existence d'un rythme circadien (Nishiwaki et *al.*, 1995) alors que chez le Hamster un tel rythme n'existe pas (Duncan et *al.*, 2001). Chez le Rat, les neurones à Substance P (SP) dans le SCN sont observés entre les portions dorso-latérale et ventro-médiane (Mikkelsen et Larsen, 1993). Chez le hamster Sibérien, ces neurones sont latéraux (Reuss et Bürger, 1994) alors que chez le Singe, ils sont situés dorsalement (Mick et *al.*, 1992). Dans le SCN, le GRP est exprimé dans 14% des neurones, se trouvant dans la partie ventrolatérale (vlSCN) (Mikkelsen et *al.*, 1991 ; Moore et *al.*, 2002). Les ARNm du GRP ont été beaucoup plus détectés dans la zone latérale du vlSCN, où quelques neurones co-expriment aussi des ARNm à VIP (Kawamoto et *al.*, 2003). La co-localisation des deux neuropeptides a été également observée dans certains neurones de cette partie ventrolatérale du SCN (Romijn et *al.*, 1998). Contrairement aux neurones à VIP, ceux qui sont uniquement à GRP montrent une expression forte en une protéine associée au microtubule (doublecortin : DCX) (Geoghegan et Carter, 2008). Les neurones à GRP comme ceux à VIP sont en contact avec les afférences rétiniennes (tractus rétino-hypothalamique :

TRH) aux SCN (Earnest *et al.*, 1993 ; Tanaka *et al.*, 1997 ; Kawamoto *et al.*, 2003). Le contenu en GRP comme l'expression de son ARNm présente des variations journalières, mais contrairement au VIP, le pic est observé pendant la journée (Zoeller *et al.*, 1992 ; Okamura et Ibata, 1994). Comme pour le VIP, ce rythme n'est pas circadien et dépend de l'alternance jour/nuit (Shinohara *et al.*, 1993).

La calbindine-D28K est une protéine cytosolique de très forte affinité pour le calcium qu'elle fixe. Les neurones à calbindine dans le SCN sont localisés chez le Hamster, dans une sous-région qui est centrale (Silver *et al.*, 1996) à ventro-latérale (Menet *et al.*, 2003). Elle est centrale chez l'Arvicanthis (*Arvicanthis niloticus*) (Mahoney *et al.*, 2000), et ventrale chez le Microcèbe (Cayetanot *et al.*, 2007). Chez le Rat, ces neurones contenant de la calbindine D28K sont dispersés dans tout le SCN (Mahoney *et al.* 2000 ; Erhardt *et al.* 2004). Il ne semble pas y avoir chez le Rat, de variations journalières dans le nombre de ces neurones ou dans leur densité (Jobst et Allen, 2002 ; Cayetanot *et al.*, 2007), bien qu'un pic de nuit a été rapporté (LeSauter *et al.*, 1999). Par contre, chez le Hamster, le nombre de ces neurones (à la fois protéine et ARNm), présente des variations photopériodiques avec une augmentation en photopériode courte (Menet *et al.*, 2003).

3. La synchronisation à 24 h de l'horloge circadienne

En plus de sa capacité à générer des rythmes avec une période proche de 24 h, l'horloge circadienne présente dans le SCN se caractérise par sa capacité à être entraînée à 24 h (remise à l'heure) par divers synchroniseurs externes. L'alternance quotidienne du cycle lumière / obscurité est le plus puissante de ces synchroniseurs. Toutefois, le SCN n'est sensible à l'effet synchroniseur de la lumière que durant la période nocturne, c'est-à-dire pendant la période de veille chez les espèces nocturnes et de sommeil chez les espèces diurnes comme l'Homme. La phase de l'horloge peut être avancée (avance de phase) ou retardée (retard de phase) de 1 à 2 h par jour en fonction de l'heure de la stimulation lumineuse, en fin et au début de la nuit respectivement. L'amplitude des déphasages induits par la lumière dépend également des caractéristiques (durée et intensité) du stimulus lumineux.

D'autres facteurs, dits non-photiques, notamment sociaux, environnementaux, comportementaux, nutritionnels et pharmacologiques, peuvent également synchroniser l'horloge circadienne. La principale caractéristique des facteurs non-photiques est de provoquer des avances de phase (remise à l'heure) lorsqu'ils sont appliqués pendant le jour (subjectif). Il a été aussi démontré que ces facteurs non-photiques pouvaient modifier la réponse circadienne à un signal lumineux. Ceci implique des interactions fortes entre ces différents synchroniseurs photiques et non-photiques. Ce qui est fondamental

c'est que l'on se souvient que les êtres vivants vivent dans un environnement ouvert. Déterminer les mécanismes nerveux qui permettent au SCN d'intégrer ces diverses informations environnementales est donc d'une grande importance en terme de physiologie et de clinique.

De très nombreuses afférences au SCN en provenance de différentes structures cérébrales ont été identifiées (Figure 3). Les fibres glutamaergiques en provenance de la rétine (tractus rétino-hypothalamique), les fibres à Neuropeptide Y (NPY) en provenance de l'IGL (tractus géniculo-hypothalamique) et les fibres sérotoninergiques en provenance du noyau du raphé médian, représentent les 3 afférences majeures au SCN. Elles sont impliquées dans les mécanismes d'entraînement de l'horloge. Ces projections sont observées massivement dans la partie ventrale du SCN où elles forment des plexus denses. Les neurotransmetteurs libérés agissent ainsi sur les neurones du SCN par l'intermédiaire de récepteurs (glutamate, GABA, sérotonine (5-HT), catécholamine, acétylcholine, NPY, met-enképhaline, PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide), etc.) dont le nombre, la localisation et les sous-types varient en fonction des espèces animales considérées.

L'importance relative de ces 3 afférences est variable selon le synchroniseur considéré (photique ou non-photique).

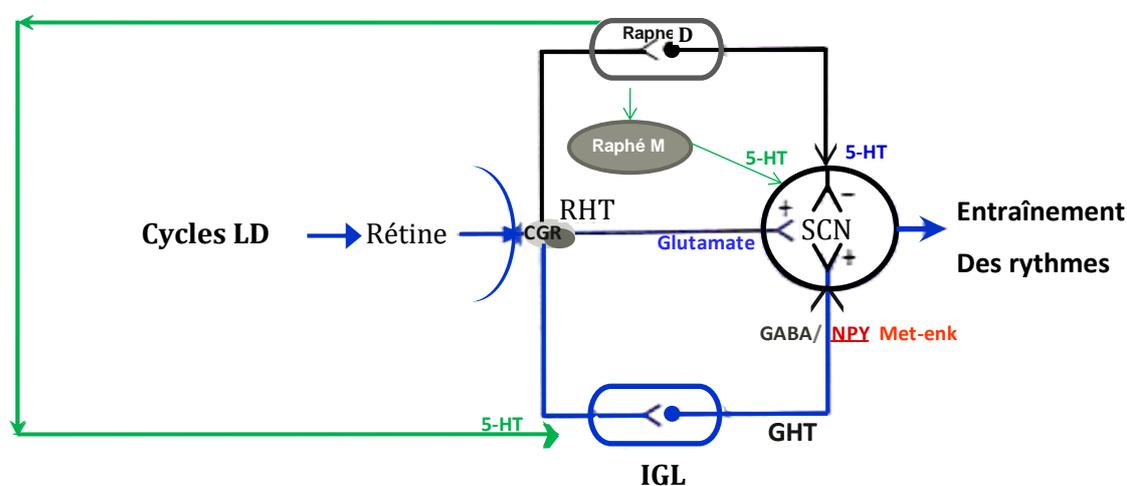


Figure 3 : Principales afférences nerveuses responsables de la synchronisation photique et non photique de l'horloge.

5-HT: sérotonine, CGR: Cellules ganglionnaires de la rétine, GABA: acide γ -aminobutyrique, GHT: tractus géniculohypothalamique, IGL: feuillet intergénéral thalamique, Met-enk : méthionine enképhaline, NPY: neuropeptide Y, Raphé D: noyau du raphé dorsal, RHT: tractus rétinohypothalamique, Raphé M: noyau du raphé médian.

Modifié d'après Meijer (1991).

3.1. *Synchroniseur photique*

Comme indiqué précédemment, le cycle lumière/obscurité de 24 h (alternance jour/nuit) est le synchroniseur le plus puissant. Chez les Mammifères, la rétine est responsable à la fois de la détection, de la traduction et du traitement primaire de la lumière. Elle est composée de plusieurs types de neurones (photorécepteurs, cellules ganglionnaires) et de cellules gliales organisées dans des couches parfaitement ordonnées. La lumière active deux systèmes parallèles : d'une part le système visuel « classique », où l'énergie lumineuse est décryptée pour permettre la formation de l'image et une représentation spatiale de l'environnement, et d'autre part le système circadien, dit « non-visuel », où l'information photique synchronise les fonctions de l'organisme avec l'environnement en entraînant l'horloge biologique. Il existe une séparation anatomique et fonctionnelle entre les deux systèmes pour le traitement de l'information lumineuse. Dans le système visuel classique, l'acheminement de l'information visuelle est assuré par les CGR, qui projettent sur le noyau géniculé latéral. L'information lumineuse « non-visuelle » est transmise par une sous-population de CGR qui projettent principalement sur la région ventrolatérale du SCN via le tractus rétino-hypothalamique (Hattar et *al.*, 2006). Un pigment visuel spécifique qui absorbe la lumière dans une gamme proche des 484 nm, la mélanopsine, s'exprime dans cette sous population de CGR (Gooley et *al.*, 2001 ; Berson et *al.*, 2002 ; Warren et *al.*, 2003). C'est cette organisation spécifique qui permet d'expliquer chez certains patients aveugles et chez les modèles animaux à dégénérescence rétinienne, la persistance d'une détection « photique » (entraînement des rythmes circadiens). Cette sous-population spécifique de CGR (qui contient de la mélanopsine) libère dans le SCN du glutamate (Ibata et *al.*, 1989 ; De Vries, 1993) qui est reconnu comme le neurotransmetteur principal véhiculant les signaux photiques vers le SCN. D'autres neurotransmetteurs comme l'aspartate, la substance P et le PACAP semblent aussi jouer un rôle. L'intégrité de cette voie rétino-hypothalamique est nécessaire à la synchronisation photique.

Le SCN perçoit aussi l'information lumineuse par une voie indirecte. En effet, les CGR à mélanopsine qui projettent sur le SCN émettent des collatérales sur l'IGL. Les fréquences de décharge électrique des neurones de cette structure thalamique varient en fonction de l'intensité lumineuse, démontrant ainsi la fonctionnalité de cette voie. Dans le IGL, le contenu en neurotransmetteurs (GABA, neuropeptide Y, enképhaline), définit des populations neuronales fonctionnelles différentes et chez le Rat, une projection majeure NPY-ergique rejoint le SCN (tractus géniculohypothalamique) (Card et Moore, 1989 ; Moore et Speh, 1993). L'information photique arrivée directement à l'IGL par voie rétinienne est ainsi transmise au SCN (nota : chez le

hamster Syrien, une projection à Methionine-enképhaline (Met-enk) est aussi impliquée) (Morin et Blanchard, 1995). Les fibres à NPY provenant de l'IGL se mettent en contact principalement avec les neurones à VIP (Ibata et *al.*, 1988 ; François-Bellan et Bosler, 1992) et le contenu du NPY dans le SCN présente un pic aux transitions jour-nuit et nuit-jour (Shinohara et *al.*, 1993). En terme fonctionnel, il a été montré que cette voie indirecte n'est pas indispensable à la synchronisation photique mais qu'elle module les effets de la lumière sur le SCN. Par exemple, des lésions électrolytiques des IGL réduisent l'amplitude des déphasages produites par la lumière chez le Hamster.

Le rôle des fibres 5-HT, la troisième afférence majeure au SCN, doit être aussi considéré. Les noyaux mesencéphaliques du raphé émettent des projections rostrales libérant de la 5-HT, entre autre dans le SCN et l'IGL (Azmitia et Segal, 1978 ; Hay-Schmidt et *al.*, 2003 ; Meyer-Bernstein et Morin, 1996 ; Vrang et *al.*, 2003). De plus chez certaines espèces (Chat, Rat), des projections rétiniennes directes ont été identifiées dans les noyaux du raphé. Les informations lumineuses pourraient donc aussi atteindre le SCN indirectement par l'intermédiaire de fibres 5-HT-ergiques. Les analyses expérimentales suggèrent que le rôle de ces voies sérotoninergiques ne serait que de moduler aux niveaux de l'horloge les effets de la lumière. Comme les afférences au SCN en provenance des noyaux du raphé ou des IGL jouent un rôle important dans la synchronisation de l'horloge par les facteurs non-photiques (voir ci-dessous), nous avons là, probablement, les voies nerveuses impliquées dans les interactions photique/non photique.

Il doit être aussi noté ici que les CGR à mélanopsine projettent sur d'autres structures hypothalamiques (aires latérale, préoptique, paraventriculaire, rétrochiasmatique, ventro-médiale, dorsomédiale) et thalamiques (noyau de la bande diagonale de Broca et noyau paraventriculaire). La fonction circadienne de ces afférences rétiniennes a été très peu étudiée, mais dans la mesure où toutes ces structures cibles innervent à leur tour le SCN, elles pourraient, comme cela a été démontré pour les IGL et les raphés, contribuer ou influencer la synchronisation photique.

3.2. Synchronisateurs non-photiques

Plusieurs facteurs non-photiques peuvent synchroniser l'horloge circadienne des Mammifères. Ces stimuli peuvent être des facteurs comportementaux, des facteurs alimentaires ou d'autres facteurs environnementaux comme la température ambiante, d'ailleurs peu étudiée jusqu'ici. Ils peuvent être également des facteurs pharmacologiques (drogues chronobiotiques). Cette diversité implique des mécanismes d'action différents mais qui tous *in fine* doivent être perçus par le SCN.

Les fibres 5-HTergiques constituent des voies importantes dans la transmission des stimuli non-photiques vers le SCN. Bien caractérisée chez le hamster syrien, la modulation sérotoninergique provient d'une part d'une projection directe des noyaux du raphé médian vers le SCN et d'autre part d'une projection directe des noyaux du raphé dorsal vers l'IGL (Azmitia et Segal, 1978 ; Meyer-Bernstein et Morin, 1996 ; Hay-Schmidt et *al.*, 2003 ; Vrang et *al.*, 2003). La libération de 5-HT dans le SCN présente des fluctuations circadiennes avec des maxima en début de nuit et il a été démontré qu'elle stimule l'expression des deux neuropeptides majeurs des SCN, le VIP et la VP (Vacher et *al.*, 2003). Chez le Hamster et chez d'autres rongeurs, des injections intra-péritonéales ou intra-ventriculaires d'agonistes sérotoninergiques (exemple : 8-OHDPAT) induisent, via des récepteurs 5-HTergiques post-synaptiques sur les neurones du SCN (5-HT₇, 5-HT_{1a}), des avances de phase de type non-photique (Edgar et *al.*, 1993; Cutrera et *al.*, 1994 ; Bobrzynska et *al.*, 1996 ; Mendoza et *al.*, 2008) : c'est-à-dire effectives durant le jour subjectif. L'utilisation de toxines qui provoquent une lésion spécifique des terminaisons 5-HTergiques a permis de démontrer, à côté de la voie raphé-SCN, que les fibres sérotoninergiques du noyau du raphé dorsale qui innervent l'IGL jouent également un rôle important dans la modulation sérotoninergique du SCN. Ceci probablement en activant (ou en « désinhibant ») les fibres géniculo-hypothalamiques libérant du NPY. Toutefois, Les résultats obtenus sont différents en fonctions des espèces étudiées, et ceci s'explique probablement par une expression variable dans la nature et/ou l'affinité et par une localisation différente (nature post-synaptique ou présynaptique) des divers sous-types de récepteurs de la 5-HT (5-HT_{1A,B}, 5-HT_{2c}, 5-HT₃, 5-HT₇).

L'IGL a également une fonction très importante dans l'intégration et la transmission de ces stimuli non-photiques. De nombreuses études montrent qu'une lésion électrolytique bilatérale de l'IGL réduit ou inhibe totalement les déphasages provoqués par les facteurs non-photiques (Johnson et *al.*, 1988 ; Biello et *al.*, 1991; Janik et Mrosovsky, 1994 ; Wickland et Turek, 1994 ; Challet et *al.*, 1996). L'implication des afférences NPY-ergiques est bien caractérisée. *In vivo* des micro-injections de NPY dans les SCN ou des stimulations électriques des projections géniculo-hypothalamiques induisent des déphasages, tandis que l'administration d'un anticorps dirigé contre le NPY inhibe les avances de phase induites par une hyperactivité forcée (Biello et *al.*, 1994 ; Huhman et Albers, 1994). Enfin, une activation des neurones dans l'IGL (déterminée par l'expression de la protéine FOS) a été notée juste avant l'heure du nourrissage lors d'une restriction alimentaire avec une ration hypocalorique journalière, un stimulus non-photique très puissant.

En conclusion à ce niveau, il apparaît que le système sérotoninergique comme l'IGL qui intègre diverses informations (il reçoit des afférences nerveuses de très nombreuses structures cérébrales) et module les effets de la lumière sur l'horloge circadienne, est une structure clé du système circadien. C'est l'existence de ce réseau SCN, IGL, système sérotoninergique qui permet les interactions permanentes entre les différents synchroniseurs (photique et non-photique) nécessaires à la bonne synchronisation avec l'environnement. Toutefois, cette conclusion ne doit pas faire oublier que les mécanismes de régulation sont probablement encore plus complexes et multiples. Par exemple, l'observation que la réduction de la disponibilité en glucose cérébral modulait la synchronisation photique du SCN permet de suggérer aussi l'implication de facteurs nutritionnels dans la réponse physiologique associée au nourrissage hypocalorique diurne (Mendoza et *al.*, 2005).

4. Les sorties nerveuses et endocrines de l'horloge et la distribution des signaux circadiens

Deux questions se posent : 1) comment, une fois construit (et éventuellement synchronisé à 24 h) le/les signaux circadiens est/sont-il(s) distribué(s) ? Et 2) comment ce signal est-il intégré et interprété aux divers niveaux d'organisation de l'organisme ?

L'idée de départ qui sous-tend nos réflexions est que le SCN distribuerait les signaux circadiens aux autres structures de l'organisme par voie nerveuse, hormonale et humorale, via la libération rythmique de divers neurotransmetteurs à partir des terminaisons des voies nerveuses efférentes. Ceci pose le problème de l'identification des structures cibles du SCN et des neurotransmetteurs impliqués.

Une transmission humorale existe. Chez des rongeurs dont l'horloge (SCN) a été détruite, la greffe dans le 3^{ème} ventricule (3V) de SCN ensaché dans une membrane perméable permet de restaurer un rythme circadien d'activité locomotrice (homologue au cycle veille sommeil chez l'Homme) (Silver et *al.*, 1996). Cette observation indique que la diffusion d'un composé à partir du greffon dans le 3V, serait suffisante pour induire le rythme d'activité. Bien qu'ils apparaissent apparentés au TGF- α (Transforming Growth Factor Alpha), la nature exacte de ce(s) facteur(s) diffusible(s) n'est pas encore connue, comme ne sont pas déterminés les neurones et les structures cibles impliqués. La zone subparaventriculaire de l'hypothalamus semble toutefois être un site privilégié d'action. Dans ce protocole où aucune connexion nerveuse entre le greffon et l'hôte ne peut s'établir, les autres rythmes (exemple : corticostérone et mélatonine) ne sont pas rétablis ; ce qui, *a contrario*, démontre l'importance majeur des circuits nerveux.

Les données anatomiques de ces dernières années montrent que les neurones du SCN, à l'exception notable des noyaux paraventriculaires du thalamus et des IGL, projettent presque exclusivement sur des structures hypothalamiques (revue : Moore et Leak (2001) ; Kalsbeek et Buijs (2002)) : voir figure 4. Sur la base de ce qui est connu du rôle de ces structures cibles hypothalamiques, il est possible de définir les fonctions qui pourraient être influencées par le SCN à ces différents niveaux. Quels sont les neurotransmetteurs impliqués ? Un grand nombre des axones du SCN contiennent du GABA et des neuropeptides (VIP, VP, GRP et somatostatine). La présence de glutamate dans certaines cellules du SCN a été aussi mise en évidence. La présence de tous ces neurotransmetteurs dans l'horloge implique un grand nombre de combinaisons possibles pour transmettre son/ses signaux.

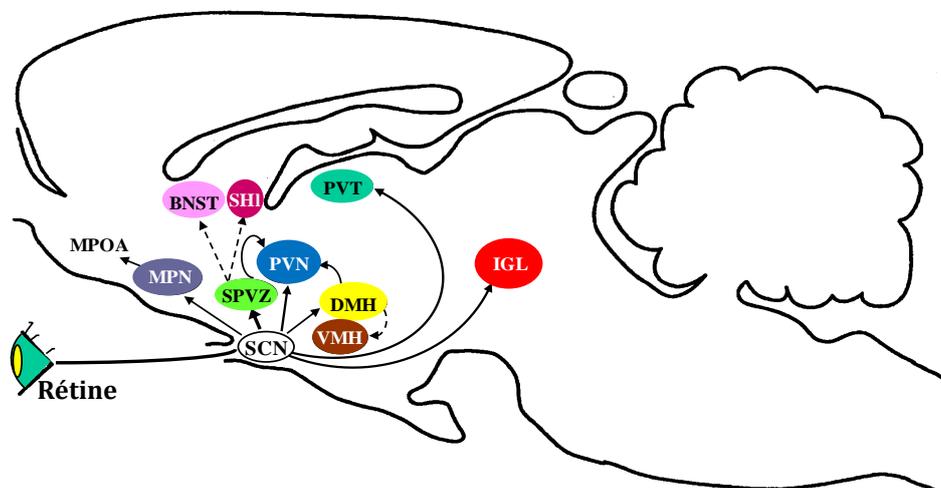


Figure 4 : Représentation des principales voies nerveuses efférentes des SCN.

BNST: noyaux du lit de la strie terminale, DMH: noyaux dorsomédians hypothalamiques, IGL: feuilletes intergénéculées thalamiques, SHI : noyaux séptal latéral, MPN: noyaux préoptiques médians, MPOA: aire préoptique médiane, PVN: noyaux paraventriculaires hypothalamiques, PVT: noyaux paraventriculaires thalamiques, SPVZ: zone sub-paraventriculaire, VMH: noyaux ventromédians hypothalamiques. *Modifié d'après Buijs, 1996.*

Les circuits et mécanismes utilisés pour entraîner à 24 h la sécrétion de la mélatonine, une hormone clef dans l'homéostasie temporelle, ont été les plus étudiés et de fait sont les plus connus. Le contrôle par le SCN de la libération nocturne et rythmique de mélatonine par la glande pinéale (revue : Pévet, 1988 ; Simonneaux et Ribelayga, 2003), se fait par une voie polyneurone impliquant les neurones «autonomes» des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), des neurones préganglionnaires dans la corne intermédialolatérale de la moelle épinière et les ganglions cervicaux supérieurs (Korf et Moller, 1984 ; Kalsbeek et *al.*, 1993) : figure 5. A partir de ces ganglions, des fibres sympathiques rejoignent la glande pinéale

(Kappers, 1960). Quels sont alors les neurones et les neurotransmetteurs impliqués aux différents niveaux du circuit? A l'heure actuelle, il a été démontré que 1) les projections GABAergiques du SCN sur les PVN sont directement impliquées dans l'effet inhibiteur de la lumière sur la synthèse de mélatonine et 2) l'administration d'agonistes GABAergiques la nuit dans les PVN diminue l'activité des fibres sympathiques. Récemment, il a été aussi montré que la transmission GABAergique du SCN aux PVN était également impliquée dans l'inhibition circadienne (indépendamment de la lumière) de la synthèse de mélatonine pendant le jour. La synthèse de mélatonine pendant le jour est, en effet, augmentée après le blocage de la transmission GABAergique dans les PVN. Ces résultats conduisent à penser que le SCN contrôle le rythme de synthèse de mélatonine par une inhibition directe de cette synthèse via la libération circadienne de GABA le jour. Toutefois, les données récentes démontrent que le SCN contrôle le rythme de mélatonine par une combinaison de signaux stimulateurs (la nuit) et inhibiteurs (le jour) (Perreau-Lenz et al., 2004, 2005). Le SCN utiliserait au moins deux types de neurotransmetteurs avec différents rythmes de libération au cours du cycle jour/nuit pour contrôler la synthèse de mélatonine. Des résultats récents suggèrent que la transmission glutamatergique du SCN aux PVN serait impliquée dans cette stimulation nocturne de la mélatonine.

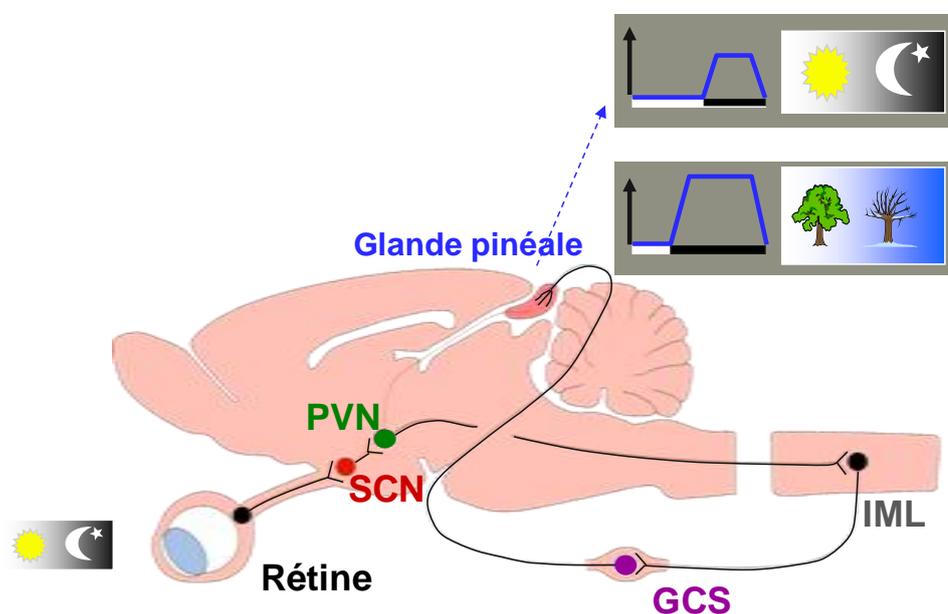


Figure 5 : Représentation schématique de la voie polyneurone rétinohypothalamo-pinéale, impliquée dans la synthèse de la mélatonine chez les Mammifères. GCS : ganglions cervicaux supérieurs, IML : colonne intermédiaire latérale, PVN : noyaux paraventriculaires hypothalamiques, SCN : noyaux suprachiasmatiques. Modifié d'après Korf et al., 1998.

Cet exemple montre le rôle primordial du système autonome dans la sécrétion de mélatonine, rôle qui se retrouve également dans le contrôle de la libération rythmique d'une autre hormone nécessaire à l'homéostasie temporelle, la corticostérone. Pour cette hormone, le contrôle implique deux mécanismes. La libération de la VP le jour, à partir des terminaisons des neurones à VP du SCN, inhibe la sécrétion de corticostérone en agissant sur les neurones endocrines des PVN qui contiennent du CRH (corticotropin-releasing hormone, anciennement appelé corticotropin-releasing factor: CRF) et règlent la sécrétion par l'hypophyse de l'adenocorticotropine 'Adreno Cortico Tropic Hormone': ACTH. Par une action directe sur les neurones « autonomes » des PVN, le SCN induit aussi, via le système nerveux autonome, une modification rythmique de la sensibilité du cortex surrénalien à l'ACTH. L'implication du système autonome ne semble pas spécifique au contrôle par l'horloge du rythme de synthèse de ces 2 hormones. Au contraire, il semble relever d'un phénomène plus général du contrôle des activités autonomes par l'horloge et une telle influence de l'horloge sur le système autonome permet d'expliquer l'organisation circadienne de nombreuses fonctions (exemple : l'homéostasie du glucose, la pression artérielle, le système immunitaire etc.) ; d'où son importance en terme clinique.

Comme juste exposé, le SCN contrôle la libération rythmique d'hormones et en particulier de corticostérone et de mélatonine. Ces hormones qui sont distribuées dans tout l'organisme par l'intermédiaire de la circulation sanguine ont donc la capacité de distribuer aussi le message circadien à tout l'organisme (Balsalobre, 2002 ; Le Minh et *al.*, 2001), du moins aux structures cibles capables de lire le message (structures qui contiennent les récepteurs correspondants). Ces deux hormones sont donc fondamentales dans le fonctionnement du système de mesure du temps. Les messages qu'elles distribuent, toutefois, ne sont pas totalement comparables. Le rythme de sécrétion de corticostérone est dépendant du SCN mais pas exclusivement. La régulation de sa synthèse et de sa libération est complexe et contrôlée par de nombreux systèmes physiologiques et joue un rôle important dans des fonctions autres que rythmiques (exemple : stress, système immunitaire, réponse inflammatoire etc..). Le rythme de synthèse de mélatonine, lui, dépend exclusivement de l'horloge circadienne et le rôle de cette hormone est très particulier dans le sens où elle ne distribue qu'une information temporelle, le signal et la durée de la nuit. En ce sens, la mélatonine joue un rôle central dans le système circadien.

II. La glande pinéale et le rôle spécifique de la mélatonine

1. La glande pinéale

La glande pinéale est connue depuis la plus haute antiquité. Sa forme caractéristique de pomme de pin chez l'Homme est à l'origine de son nom (*Corpus pinealis*). C'est une structure neuroendocrine provenant d'une évagination du toit du diencephale. Sa morphologie et son volume sont très variables selon les espèces. Important dans le contexte du présent travail, il doit être noté qu'une corrélation en volume et biotope a pu être faite : le volume est d'autant plus élevé que les conditions climatiques sont drastiques (Pévet, 1982). Chez les Mammifères, elle forme une structure impaire et compacte, de forme pyramidale, située entre les commissures habénuaire et postérieure (Vollrath, 1981) à l'exception des rongeurs chez lesquels elle migre en position dorsale pendant le développement postnatal (Kappers, 1969). Chez ces derniers, la glande pinéale est divisée en trois parties : la glande pinéale superficielle, la plus importante en terme de volume, située entre les hémisphères cérébraux et le cervelet, la pinéale profonde (ou *lamina intercallis*) en contact avec les commissures habénuaire et postérieure et enfin la tige épiphysaire qui relie ces deux parties. Cette glande possède une vascularisation riche qui permet une diffusion rapide des produits de sécrétion. La glande pinéale est constituée majoritairement de pinéalocytes (90% chez le Rat), des cellules qui dérivent phylogénétiquement des photorécepteurs (Collin, 1979). Chez les poissons, les amphibiens et les reptiles ces cellules de la pinéale sont des photorécepteurs qui convertissent l'information lumineuse en influx nerveux (Collin, 1971 ; Falcón, 1984). Les pinéalocytes chez les Mammifères ont perdu cette capacité de photo-détection directe et se sont spécialisées en cellules neuroendocrines réagissant indirectement à la lumière. La glande pinéale contient également des cellules gliales (10% chez le Rat, majoritairement des astrocytes), mais le nombre est variable selon les espèces ; elle contient aussi quelques rares neurones (Møller et Baeres, 2002).

La glande pinéale est connectée aux autres structures cérébrales par une innervation complexe. Il existe des variations considérables de cette innervation entre les espèces. Celle-ci recoupe les différences morphologiques : entre par exemple les rongeurs d'une part et les ovins, bovins et primates d'autre part.

Toutefois, chez tous les Mammifères sans exception, la majorité des fibres afférentes sont des fibres sympathiques, originaires des péricaryons localisés dans les ganglions cervicaux supérieurs (Kappers, 1960). Ces fibres noradrénergiques sont fonctionnellement les plus importantes puisqu'elles sont directement impliquées dans le contrôle de la synthèse de la mélatonine. Un certain nombre de neuropeptides,

par exemple le NPY (Shiotani et *al.*, 1986 ; Zhang et *al.*, 1991 ; Cozzi et *al.*, 1992 ; Mikkelsen et Møller, 1999), sont également présents dans ces fibres sympathiques. Le rôle modulateur de ces neuropeptides dans la synthèse de mélatonine a d'ailleurs été démontré (Simonneaux et *al.*, 1990, 1993 ; Simonneaux, 1995). Si pendant longtemps il a été affirmé que la pinéale n'était innervée que par le système orthosympathique, ce qui aurait fait de cette glande un cas unique, la réalité d'une innervation parasympathique a depuis été établie (originaire des ganglions sphéno-palatin et otique chez le Rat). Son rôle n'est pas encore clairement établi.

Depuis longtemps l'existence d'une innervation centrale en provenance du tronc cérébral et du mésencéphale est connue. Les fibres pénètrent la glande à partir des commissures habénulaires et postérieures. Chez les rongeurs, les fibres se terminent au niveau de la pinéale profonde et de la tige pinéale (Matsushima et *al.*, 1999 ; Møller, 1999). Cette observation explique que des études sur le rôle de cette innervation sont pratiquement inexistantes. Ceci est regrettable car chez les autres Mammifères, et chez l'Homme en particulier où la pinéale compacte est profonde, cette innervation est importante.

2. La Mélatonine

La Mélatonine (MEL) est produite principalement par la glande pinéale. Toutefois, de nombreuses autres glandes, organes ou tissus sont également capables de synthétiser l'hormone. C'est le cas de la rétine, où elle est aussi synthétisée rythmiquement. Par contre, dans la glande de Harder, les glandes lacrymales, le tractus gastro-intestinal, les globules rouges, les plaquettes sanguines ou encore les cellules mononucléaires, tissus où la synthèse de MEL a été démontrée, la production n'est pas rythmique et, dans les conditions physiologiques normales, cette MEL ne semble pas être libérée dans la circulation générale. Il faut aussi préciser que l'on retrouve de la MEL chez les invertébrés (œil et lobes optiques) et chez de nombreuses plantes et algues (Vivien-Roels et Pévet, 1993 ; Pévet, 2002). La mélatonine circulante chez les Mammifères provient exclusivement de la glande pinéale. La synthèse de MEL dans cette glande est dépendante des variations journalières et saisonnières de l'environnement lumineux. Chez toutes les espèces, qu'elles soient diurnes ou nocturnes, elle est toujours sécrétée la nuit et la durée de cette sécrétion est dépendante de la durée de la nuit. La MEL est donc une hormone « donneuse de temps » qui joue un rôle fondamental dans le fonctionnement coordonné des processus biologiques (Pévet, 2003 ; 2005).

2.1. *Synthèse et production*

En 1917, McCord et Allen montrèrent que des extraits de glandes pinéales de bovins avaient la capacité d'éclaircir la peau de grenouille. En 1958, Lerner et ses collaborateurs isolèrent l'agent responsable de cet effet (la N-Acetyl-5-Methoxytryptamine). L'éclaircissement étant la conséquence de l'agrégation des grains de mélanine dans les mélanocytes de la peau de grenouille, ils le baptisèrent «mélatonine». La MEL dérive donc de la sérotonine (5-HT) qui est elle-même produite en grande quantité par la glande pinéale à partir du tryptophane circulant. La conversion de la 5-HT en MEL se fait en deux étapes successives : une acétylation suivie d'une méthylation de la N-acétyl-5-HT formée (enzymes impliquées : l'arylalkylamine-N-acétyltransférase (AA-NAT) et l'hydroxyindole-0-méthyltransférase - HIOMT - respectivement) (Ganguly et *al.*, 2002 ; Simonneaux et Ribelayga, 2003) : figure 6. Cette synthèse de la MEL est sous la dépendance de l'horloge circadienne localisée dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus. Comme on l'a expliqué précédemment, les signaux de l'horloge sont transférés à la glande pinéale par une voie polyneuronale se terminant par des fibres sympathiques. La libération nocturne de la noradrénaline (dépendante d'un signal de l'horloge) va induire la synthèse et l'activation nocturne de la AA-NAT (Simonneaux et Ribelayga, 2003), d'où une synthèse rythmique de MEL. L'élévation des taux de la mélatonine nocturne est très rapide chez les ongulés et les primates (Hedlund et *al.*, 1977 ; Namboodiri et *al.* 1985 ; Skrzypczak, 1998) et relativement lente chez les rongeurs. Ceci est la résultante d'une régulation différentielle de la AA-NAT. Chez les rongeurs, l'expression du gène *Aa-nat* est très basse, voire indétectable de jour et augmente fortement (entre 100 et 150 fois) de nuit ou après stimulation noradrénergique (Garidou et *al.*, 2003a ; 2002, Roseboom et *al.*, 1996). Le délai (2-6 heures) entre stimulation (ou début de nuit) et libération de mélatonine s'explique par la transcription de l'*Aa-nat* et la traduction de la protéine AA-NAT. Chez les ongulés, les niveaux d'expression de l'ARNm sont constants jour et nuit (Coon et *al.*, 1995 ; Craft et *al.*, 1999 ; Privat et *al.*, 1999), ce qui permet une traduction continue de la protéine. De jour, celle-ci est dégradée par le protéasome, d'où les faibles niveaux de protéine et d'activité enzymatique. En revanche la nuit, suite à la stimulation par la noradrénaline, la PKA (Protéine Kinase dépendante de l'AMPc) phosphoryle l'AA-NAT, ce qui lui assure une protection de la dégradation par le protéasome (Ganguly et *al.*, 2001). La synthèse de mélatonine est donc régulée majoritairement par un mécanisme post-traductionnel, sans transcription de l'AA-NAT. De ce mécanisme résulte une activation rapide (quelques minutes) de l'activité de l'AA-NAT et, par conséquent, la synthèse de la mélatonine.

La mélatonine n'est pas stockée dans la glande pinéale. Elle est libérée immédiatement après sa synthèse dans la circulation générale et, pour certaines espèces (Mouton), également dans le 3V. Elle est très rapidement métabolisée dans le foie (6-hydroxylation), d'où une durée de vie très courte (environ 20 minutes). Par conséquent, le rythme de la concentration de MEL circulante reflète précisément le rythme de sa synthèse dans la pinéale. Le rythme de mélatonine est donc généré par le SCN (lui-même synchronisé à 24 heures par le cycle jour/nuit) et représente un signal hormonal efférent de l'horloge qui définit la « nuit biologique » (Pévet, 2007).

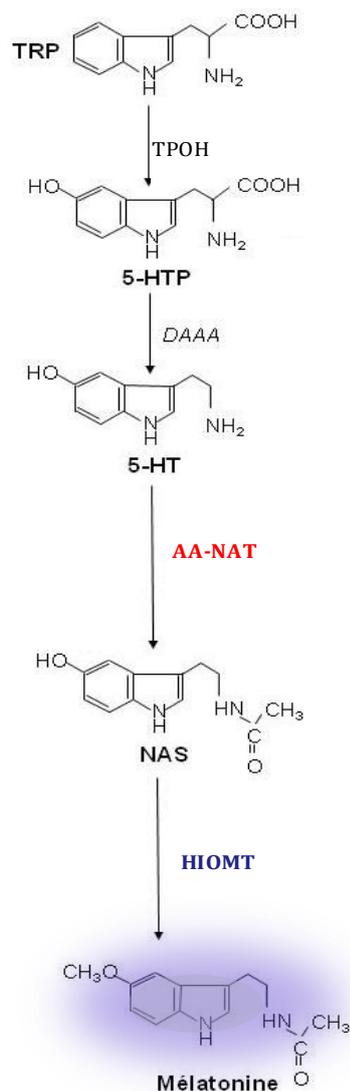


Figure 6 : Voie de biosynthèse de la mélatonine dans la glande pinéale des Mammifères.

5-HT: sérotonine, 5-HTP: 5-hydroxytryptophane, AA-NAT: arylalkylamine-N-acétyltransférase, DAAA: décarboxylase des acides aminés aromatiques, HIOMT: hydroxyindole-O-méthyltransférase, NAS: N-acétyl-sérotinine, TPOH: tryptophane hydroxylase, TRP: tryptophane.

Modifié d'après Balemans, 1979.

2.2. Rôle physiologiques

D'abord il faut dire que de nombreuses publications dans la littérature mentionnent que la MEL à haute dose (doses non-physiologiques), présente des propriétés de type antioxydant (revue : Reiter et *al.*, 2003). Cet effet peut être attribué à un piégeage direct des radicaux libres ou à une interaction avec des enzymes

qui améliorent les défenses anti-oxydantes naturelles. Ceci étant en dehors de nos préoccupations, nous ne développerons pas plus cet aspect, mais pour ceux qui s'intéressent aux potentialités thérapeutiques de la mélatonine, cet effet « antioxydant » ne peut être négligé.

Plusieurs autres rôles ont été attribués à la MEL. Toutefois, nos connaissances concernent presque exclusivement le rôle de la MEL comme hormone donneuse de temps. C'est sur cet aspect précis que nous concentrerons notre attention.

2.2.1. MEL et rythmes circadiens

Le rythme de MEL est généré par le SCN, et représente un signal hormonal efférent de l'horloge. De ce simple fait, la MEL est d'une grande importance pour les analyses des rythmes biologiques chez l'animal comme chez l'Homme. En effet, le profil rythmique de la MEL dans le plasma (ou dans la salive) est un excellent indicateur du bon fonctionnement de l'horloge. Le métabolite majeur de l'hormone, la 6-sulphatoxy-mélatonine est également un paramètre stable et facile à mesurer dans les urines. Sa détermination permet donc des suivis à long terme des rythmes dans des conditions de vie où les rythmes peuvent être perturbés (travail posté par exemple chez l'Homme) et dans des situations cliniques où des procédures invasives ne peuvent être utilisés (Arendt, 2005). Ces approches sont actuellement utilisées en routine pour déterminer le profil temporel normal ou perturbé de patients, mais pourrait facilement être étendu pour des analyses chez des animaux de rente.

Toutefois, la MEL n'est pas juste une sortie hormonale du SCN, utile pour analyser le fonctionnement de l'horloge ; elle agit par elle-même en « renforçant » le fonctionnement du système circadien, en un mot, en participant à l'homéostasie temporelle des fonctions. Pour bien comprendre ce rôle de la MEL et définir les modes d'actions, quelques mots sur la nature complexe du système circadien sont nécessaires :

Le système circadien est globalement constitué d'un réseau qui comprend une horloge circadienne principale, des synchronisateurs de l'horloge, des sorties de l'horloge et de multiples structures périphériques capables de générer des rythmes, les oscillateurs périphériques (Voir plus haut). Dans ce système, le rôle exact des oscillations moléculaires pour la fonction des organes périphériques n'est pas encore déterminé. Ne sont-ils que des oscillateurs qui permettent à un tissu ou à un organe d'être synchronisé à un moment précis par un signal en provenance de l'horloge, ou possèdent-ils eux-mêmes des propriétés d'horloge, c'est à dire capables d'exporter un message rythmique ? La question reste ouverte. Le SCN, toutefois, s'il n'est pas le seul à exprimer une rythmicité, apparaît néanmoins nécessaire au bon fonctionnement de l'ensemble. Le SCN, en entraînant directement ou indirectement les autres

oscillateurs du système circadien, jouerait bien un rôle d'horloge principale, assurant ainsi, sans de grandes dépenses énergétiques, la coordination temporelle des fonctions d'un individu (Buijs et Kalsbeek, 2001 ; Davidson et *al.*, 2003 ; Pévet, 2005). L'identification précise des signaux de sortie utilisés par l'horloge circadienne pour distribuer le message est donc primordiale. Aujourd'hui, il est connu que le SCN utilise différentes voies : des connections nerveuses (système autonome), des signaux hormonaux (par exemple : corticostérone, hormone de croissance, mélatonine, etc.) et des signaux comportementaux (Buijs et *al.*, 2003 ; Kalsbeek et Buijs, 2002). Le SCN agit sur chaque fonction spécifique en utilisant plusieurs signaux de sortie. Des rétrocontrôles de différentes natures sont aussi présents et ceci à tous les niveaux d'organisation du système circadien. C'est dans ce contexte d'un système complexe et redondant que se place l'action circadienne de la mélatonine.

La mélatonine a un rôle très particulier car contrairement aux autres signaux hormonaux efférents de l'horloge (Perreau-Lentz et *al.*, 2004), elle ne dépend pas de paramètres physiologiques (exemple, stress) et suit exclusivement l'environnement lumineux, donnant ainsi une perception précise du temps. L'horloge peut donc utiliser le signal mélatoninergique pour distribuer, via la circulation générale, le message circadien dans tout l'organisme, du moins à toutes les structures capables de lire ce message, par exemple, les structures contenant des récepteurs de la mélatonine. Potentiellement ces sites sont très nombreux (voir le paragraphe suivant) mais il est probable que beaucoup de ces sites soient impliqués, non dans le contrôle du système circadien lui-même, mais dans les réponses photopériodiques (voir paragraphe suivant). Néanmoins, c'est quand même par ces structures que peut être abordée l'étude du rôle exact de la MEL dans l'organisation journalière des fonctions. Au niveau expérimental nous devons faire face aux redondances du système. Pour une fonction donnée, même sans la présence de MEL (par exemple après pinéalectomie), le signal circadien peut être toujours distribué par les autres efférences de l'horloge (endocrines ou nerveuses). C'est ceci qui explique que seules quelques modifications mineures dans l'organisation circadienne des fonctions soient observées après pinéalectomie. Pour pouvoir analyser plus en avant le rôle de la MEL à ce niveau il est nécessaire d'identifier des structures dans lesquelles l'organisation temporelle d'une réponse dépend exclusivement du signal mélatoninergique.

Dans la *Pars Tuberalis* (PT), il a été démontré que le signal mélatoninergique est indispensable à l'expression journalière de plusieurs gènes « horloge ». En effet, des gènes « horloge » sont aussi exprimés dans la PT, mais, à la différence du SCN ou des oscillateurs périphériques, le rythme observé est directement dépendant de la MEL. Il disparaît après pinéalectomie (exemple, *Per1*) et est rétabli après

administration de MEL (exemple, *Cry1*) (Messenger et *al.*, 2001 ; Stehle et *al.*, 2002 ; Dardente et *al.*, 2003 ; Von Gall et *al.*, 2005). Ce résultat est très important puisqu'il démontre : 1) que la présence de gènes «horloge» n'implique pas forcément l'existence d'oscillation endogène et 2) que c'est le rythme de MEL qui impose l'oscillation à cette machinerie moléculaire. Cette régulation par la MEL de l'expression d'un rythme dans un tissu, qui par ailleurs n'a pas de connections nerveuses avec le SCN, est-elle spécifique à la PT ? Ou bien, est-elle un mécanisme général présent dans un grand nombre de structures ? De nombreux autres travaux sont nécessaires pour répondre à cette question (voir Pévet, 2005).

Une autre structure cible de la MEL joue un rôle particulier dans le fonctionnement du système circadien. Il s'agit du SCN (l'horloge circadienne) qui chez de nombreux Mammifères (Vaněček et *al.*, 1987 ; Duncan et *al.*, 1989 ; Weaver et *al.*, 1989 ; Williams, 1989 ; Gauer et *al.*, 1993 ; Masson-Pévet et *al.*, 1994...) contient des récepteurs de MEL. La mélatonine, dont la synthèse rythmique en dépend, a donc un effet de rétrocontrôle sur le fonctionnement même de cette horloge. Le rôle exact de ce rétrocontrôle n'est pas encore exactement connu mais il est évident que les perturbations du rythme de MEL observées dans certaines conditions (exemple durant le processus du vieillissement) ne peuvent pas être sans conséquence et, actuellement, les recherches sur cet axe sont nombreuses. La présence de récepteurs de la MEL dans le SCN implique que la MEL exogène ou tout agoniste sélectif de ses récepteurs a la capacité d'agir sur le fonctionnement même de l'horloge. L'horloge, comme expliqué précédemment, étant au centre d'un système multi-oscillant complexe et étant responsable de la coordination temporelle nécessaire à l'intégrité fonctionnelle, la possibilité d'agir directement sur l'horloge ouvre de très nombreuses perspectives.

2.2.2. MEL et rythmes saisonniers

Si la synthèse de MEL est rythmique, la durée de sa sécrétion est proportionnelle à la longueur de la nuit qui change au cours de l'année. La sécrétion de MEL, par son expression rythmique, est donc à la fois un message circadien et saisonnier (Pévet, 2003). La MEL, est un acteur impliqué dans l'organisation temporelle des fonctions et l'hormone agit sur le système lui-même en imposant la rythmicité (circadienne ou saisonnière) à certaines structures cibles (des structures qui contiennent des récepteurs de la MEL). Expérimentalement, il a été démontré que le cerveau "lit" et mesure la photopériode (durée d'éclairement par 24 h) par l'intermédiaire des changements de la durée de sécrétion nocturne de MEL (Malpoux et *al.*, 2002 ; Pévet, 2003). Ces résultats – ce qui nous intéresse ici

directement- ont d'ailleurs déjà des applications directes en matière d'élevage où l'hormone peut être utilisée pour « manipuler » certains rythmes saisonniers (fourrure chez le Vison, laine et reproduction chez le Mouton, lait chez la Chèvre, etc.). La question qui se pose est de savoir si réellement c'est la durée du signal *per se* qui est importante ou la présence de la mélatonine à un moment précis du cycle lumière-obscure (LD) qui est déterminante (modèle de coïncidence externe décrit dans le cas du SCN) ? La question est toujours ouverte et il a été démontré que chez le hamster Syrien, des perfusions quotidiennes de mélatonine de courte durée (2h30) séparées de 5h30 induisent une atrophie des gonades similaire à celle observée avec un signal de longue durée. L'existence d'une période de sensibilité circadienne à la mélatonine est donc probable. En fait, l'effet est observé quand le premier signal avec le moment où débute la synthèse de mélatonine (qui est constant quelque soit la photopériode) et le deuxième coïncide avec la fin de la nuit en photopériode courte. Ceci suggère que la période de sensibilité à la mélatonine serait entraînée à 24 h par la mélatonine elle-même (Pitrosky et al., 1995).

Dans tous les cas, en terme de physiologie c'est par les variations de la durée de sécrétion de mélatonine que l'information photopériodique est intégrée au niveau du cerveau et c'est à ce niveau que l'étude sur les mécanismes d'action de la mélatonine a connu plus de progrès.

2.3. Sites et mécanismes d'action

Comme pour de nombreuses hormones, la MEL agit principalement et classiquement par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

2.3.1. Récepteurs

2.3.1.1. Types

L'utilisation de la 2-[¹²⁵I]-iodo-MEL (¹²⁵I-MEL) (Vakkuri et al., 1984) date le début des travaux modernes sur les récepteurs de la MEL. Cet agoniste puissant, le premier outil pharmacologique mis à disposition, a permis la détection de sites de liaison à haute affinité de la mélatonine, d'abord sur des fractions membranaires du cerveau, puis par radioautographie sur des sections de cerveaux (Vaněcek et al., 1987).

Le clonage du premier récepteur de la MEL, à partir de peau de Xénope date de 1994 (Ebisawa et al., 1994). L'ADNc de ce récepteur code une protéine avec 7 domaines transmembranaires, ce qui a permis de classer ce récepteur dans la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) (Ebisawa et al., 1994). A partir de cette première séquence chez le Xénope, 3 types de récepteurs

de la MEL ont été clonés chez les vertébrés. Deux sous-types de ces récepteurs présentant une haute affinité pour la MEL appelés MT₁ et MT₂, sont présents chez les Mammifères (Reppert et *al.*, 1994, 1995). Le récepteur originellement cloné chez le Xénope (maintenant appelé Mel_{1c}) a été retrouvé chez d'autres vertébrés, mais pas chez les Mammifères. Il est très probable qu'à ces 3 sous-types, d'autres récepteurs de la MEL s'ajouteront progressivement à la liste. Un récepteur structurellement proche des récepteurs de la MEL a été isolé. Cependant, le ligand naturel n'ayant pas encore été identifié les travaux restent limités, mais sa distribution dans le tissu cérébral suggère un rôle important (Drew et *al.*, 2001). La MEL étant une hormone liposoluble, l'existence d'un récepteur nucléaire est probable, même si aujourd'hui il n'a pas encore été caractérisé.

2.3.1.2. *Distribution*

L'utilisation de la 2-[¹²⁵I] iodomélatonine a permis d'étudier la distribution des récepteurs. Chez les Mammifères, le nombre de structures cérébrales qui expriment ces récepteurs est important (plus de 110 structures) mais une très grande variabilité entre espèces a été notée dans le nombre de structures marquées et dans la nature de ces structures. Seul, un très petit nombre de structures contiennent des récepteurs dans la majorité des espèces (Masson-Pévet et *al.*, 1994). La présence de récepteurs a été également détectée dans de nombreux organes ou tissus périphériques mais, là aussi, une grande variabilité inter-espèces existe. C'est probablement ce grand nombre de structures contenant des récepteurs de la MEL qui explique la pléthore d'effets de l'hormone rapportés dans la littérature, sur des processus physiologiques variés. La disponibilité des outils moléculaires consécutive au clonage des différents sous-types de récepteurs de la MEL a permis une analyse plus précise de leur localisation. Les 2 récepteurs (MT₁ et MT₂) sont présents ensemble dans un certain nombre de structures du système nerveux central (SCN, le cervelet, le cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et les artères cérébrales) et de la périphérie (rétine, rein, adipocyte, surrénale etc.) (Pour une liste plus complète voir : Pévet et *al.*, 2002) mais, là aussi, la part respective de ces 2 types de récepteurs dans les diverses structures varie d'une espèce à l'autre. L'absence de MT₂ fonctionnel a été même démontrée chez certaines espèces (ovins, hamster doré et hamster sibérien).

Les structures-cibles répondant aux effets de la MEL dans le contrôle des fonctions saisonnières ne sont pas toutes identifiées, mais la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse qui exprime une très forte densité en récepteurs de la MEL et l'hypothalamus médiobasal qui contient également des récepteurs, jouent un rôle majeur (Voir plus loin).

2.3.1.3. Voies de Signalisation

La PT de part sa forte densité en récepteurs a servi de modèle pour déterminer les voies de signalisations impliquées :

Les récepteurs de la MEL sont couplés négativement à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gi/o sensible à la toxine pertussique. L'effet inhibiteur de la MEL sur la voie de l'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique) conduit à une diminution de l'activité de la PKA et de la phosphorylation de la protéine se liant à l'Elément de Réponse Génique de l'AMPc (CREB). La résultante de cette cascade d'évènements est une inhibition de l'expression des gènes précoces tels que *c-fos* et *junB*. De la même façon, la MEL inhibe, par un mécanisme dépendant de l'AMPc, la phosphorylation des protéine-kinases et des facteurs de transcription activés par les facteurs mitogènes (MEK1/2, MAP kinases, ERK1/2). L'étude des voies de signalisation dans des préparations exprimant de manière endogène les récepteurs MT₁ (culture primaire de cellules de *pars tuberalis*) ou MT₁ et MT₂ (tranches de SCN en culture) ou dans des systèmes cellulaires hétérologues (cellules transfectées MT₁ ou MT₂ ou MT₁ et MT₂) a permis de montrer que parallèlement à la voie de l'AMPc, d'autres voies de signalisation, qui diffèrent selon les structures et les types cellulaires étudiés, étaient présentes. L'activation des récepteurs MT₁, par exemple, conduit à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et à la stimulation de la PKC (Protéine Kinase dépendante de Ca²⁺ et /du Diacylglycérol) suite à l'activation de la phospholipase C par les sous-unités βγ de la protéine Gi. Le recrutement de calcium intracellulaire par les récepteurs MT₁ résulte également du couplage de ces récepteurs avec une protéine G de type Gq. L'activation de ces récepteurs conduit également à la stimulation de courants potassiques hyperpolarisants de type Kir3 (canaux couplés aux protéines Gi) impliqués dans l'inhibition de l'activité électrique spontanée du SCN). L'existence de couplages fonctionnels entre ces récepteurs et des canaux potassiques activés par le calcium (BKCa²⁺) ou des protéines G de type Gs, Gz et G16 a été démontrée. Les récepteurs MT₂ sont (comme les MT₁) couplés au métabolisme des phosphoinositides qui conduit à une activation de la PKC et à une augmentation du calcium intracellulaire et sont capable d'inhiber l'accumulation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (pour plus de détails voir : Barrett et *al.*, 2003 ; Boutin et *al.*, 2005 ; Guardiola-Lemaitre, 2005).

Que représente cette multiplicité de voies de transduction et donc d'effets pour les récepteurs *in vivo* ? Il faut se souvenir ici que l'expression ou la sur-expression hétérologue de récepteurs de la MEL (MT₁ ou MT₂) ne permet de révéler que les potentialités à se coupler à une voie de signalisation particulière préexistante

dans la cellule hôte. Pour le physiologiste, l'interprétation ne peut être faite que dans le contexte des voies spécifiques de signalisation identifiées dans les différents tissus. La disponibilité d'agonistes et d'antagonistes spécifiques pour les différents types de récepteurs permet d'agir sur ces différents niveaux. De très nombreuses études ont été déjà faites en utilisant des préparations membranaires de *Mycobacterium tuberculosis* de Mouton ou de mélanophores d'amphibien. L'expression recombinante de récepteurs de la MEL (humain ou ovin) dans différentes lignées cellulaires (COS-7, NIH-3T3 and CHO) a permis une caractérisation rapide des ligands synthétisés et une analyse rapide de leurs réponses fonctionnelles (Audinot et al., 2003 ; Mailliet et al., 2004). A ce jour, environ 300 molécules différentes avec des propriétés agonistes ou plus rarement antagonistes des différents type de récepteurs ont été présentés dans différentes publications et aujourd'hui un certain nombre d'agonistes et d'antagonistes sont disponibles (voir liste dans : Pévet et al., 2002). Certains sont mêmes actuellement en phase de développement clinique (Fitzgerald et Reed, 2004 ; Guardiola-lemaitre, 2005).

L'ensemble de ces données souligne, l'existence d'une importante diversité de réponses cellulaires, liée notamment aux différentes voies de signalisation couplées aux sous-types de récepteurs de la MEL et à la répartition différentielle des différents sous-types de récepteurs, suivant les structures. Le message MEL peut donc être lu différemment aux différents niveaux de l'organisme et ceci est important en terme de rôle physiologique et de potentialités thérapeutiques.

2.3.2. Autres modes d'action

2.3.2.1. *Autocrine/ paracrine*

Un effet autocrine ou paracrine de la MEL doit être aussi considéré. En effet, il n'est pas possible d'exclure que la MEL puisse agir localement sur les tissus, même où elle est produite ou sur les tissus voisins. Par exemple, dans la rétine, la MEL est connue pour inhiber la libération de dopamine (Dubocovich, 1983). Il serait donc possible d'imaginer que le rôle premier de la MEL ait été celui d'un modulateur local dans la cellule ou sur les tissus voisins (par exemple : adaptation au cycle jour/nuit de la rétine, adaptation à la nourriture dans l'intestin etc.). Ensuite, au cours de l'évolution, pour contrôler un certain nombre de fonctions, une utilisation comme hormone de la MEL s'est mise en place.

2.3.2.2. *Liposolubilité (Récepteurs Cytosoliques)*

La MEL est une molécule liposoluble. C'est-à-dire qu'elle est capable de pénétrer dans tous les organes, dans toutes les structures cérébrales, dans toutes les cellules ainsi que dans tous les compartiments cellulaires. Toutes interactions avec des protéines à l'intérieur des cellules peuvent représenter un mécanisme d'action

possible de l'hormone. Nos connaissances sont encore très fragmentaires mais des interactions ont été déjà décrites avec la tubuline ou la calmoduline (Cardinali et *al.*, 1997 ; Turjanski et *al.*, 2004 ; Benitez-King, 2006). Récemment, la liaison de la MEL à la quinone réductase (Nosjean et *al.*, 2000 ; Mailliet et *al.*, 2005) une enzyme de détoxification, a été également établie.

III. Pars tuberalis, mélatonine et réponse photopériodique : site d'action et voie de réception de l'information photopériodique

1. Morphologie et anatomie fonctionnelle de la *Pars Tuberalis*

La *pars tuberalis* (PT) représente le lobe proximale de l'adénohypophyse (Gross, 1984). L'hypophyse est une neuro-glande, formée de deux portions différentes : l'**adénohypophyse** et la **neurohypophyse**. L'adénohypophyse est constituée de 3 parties : *pars distalis* (lobe antérieur), la *pars intermedia* (lobe intermédiaire) et la *pars tuberalis* (lobe tubéral). La neurohypophyse regroupe aussi trois structures : L'éminence médiane, l'infundibulum tubérin et le lobe neural (Dellman et Eurell, 1998).

La *pars tuberalis* entretient des rapports anatomiques avec la *pars distalis* mais aussi de façon variable et interspécifique avec la *pars intermedia* (Figure 7). Chez certaines espèces, la PT est séparée de la *pars distalis* (PD) par une fente hypophysaire ou récessus d'Atwell, lequel est pénétré par des vaisseaux afférents du système porte hypothalamo-hypophysaire destinés au PD (Stoeckel et *al.*, 1979). Les vaisseaux portes proviennent des lits capillaires dans l'éminence médiane et la partie proximale de la tige pituitaire, pénètrent la PT et vascularisent l'antéhypophyse (Stoeckel et *al.*, 1979 ; Kollias et *al.*, 1995 ; Dellman et Eurell, 1998) : voir Figure 8.

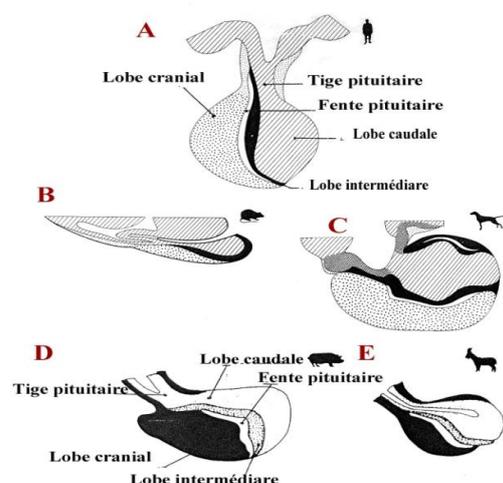


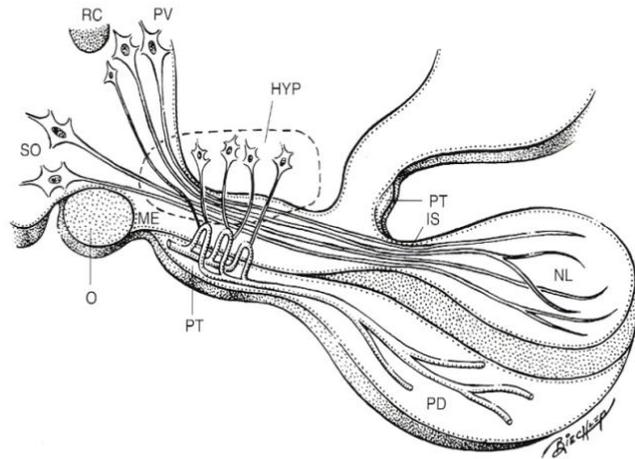
Figure 7 : Anatomie et rapports de la *pars tuberalis* avec les autres lobes de l'hypophyse chez différentes espèces : représentation sur une coupe sagittale.

A : Homme, **B** : Rat et **C** : Chien, d'après **Thierry Roger (1985)** ; **D** : Porc et **E** : Chèvre, d'après **Dellman et Eurell (1998)**.

La PT et l'hypophyse présentent une conformation différente selon l'espèce. Chez les rongeurs dont le crâne est allongé et où la selle turcique est peu creusée, l'hypophyse est aplatie et fortement inclinée suivant une direction ventro-caudale. Elle est appendue par une tige pituitaire longue. Chez les primates dont la selle turcique est profonde, l'hypophyse est globuleuse avec une tige pituitaire verticale longue. Chez le chien, le porc et la chèvre, l'hypophyse est globuleuse avec une tige pituitaire courte.

Figure 8 : Anatomie fonctionnelle de l'axe hypothalamo hypophysaire d'après Dellmann et Eurell (1998).

O : chiasma optique. **RC** : commissure rostrale. **HYP** : Aire hypophysiotrope de l'hypothalamus délimitée par des points ; les axones des parvoneurones de cette région se terminent en contact des capillaires primaires du système porte hypophysaire situé dans la partie externe de l'éminence médiane (ME). A ce niveau là il y a libération des 'Releasing' et 'Inhibitory' Hormones. Ces dernières sont acheminées au pars distalis (PD) dans les veinules du système porte et arrivent aux cellules de ce pars par des capillaires secondaires. Pars intermedia (PI), Pars tuberalis (PT). Les axones provenant des magnoneurones des noyaux supra-optiques (SO) et des paraventriculaires (PV) passent dans ME et la tige infundibulaire (IS) pour se terminer dans le lobe nerveux (NL) où se fait le stockage et la libération de l'ocytocine et de la vasopressine.



Les cellules constituant la *pars tuberalis* sécrètent plusieurs hormones : hormone de croissance (GH), prolactine (PRL), thyrotropine (TSH), 'follicule-stimulating hormone' (FSH), 'luteinizing hormone' (LH), ACTH, 'β-lipotropin' (β-LPH) et hormone mélano-stimulante (MSH) (Brook et Marshall, 1998 ; Dellman et Eurell, 1998 ; Rhodin, 1974).

2. Les récepteurs de la Mélatonine dans la *Pars Tuberalis*

La PT est la structure qui représente la densité la plus élevée en MT1, ceci a été vérifié chez différents Mammifères (voir chapitre récepteurs). Ces récepteurs, dans le PT sont proches du plexus portal primaire de l'éminence médiane où sont relargués les 'releasing factors' destinés à la régulation de la sécrétion hormonale dans la PD. La PT est donc pourvue d'un nombre élevé de récepteurs de la mélatonine et occupe une position stratégique entre l'hypothalamus et le PD hypophysaire. Par ailleurs, il a été démontré que les changements saisonniers de la prolactine libérée par les cellules de la PD, sont sous une régulation dépendante de la PT (Lincoln et Clarke, 1994 ; Morgan et *al.*, 1996 ; Morgan et Williams, 1996 ; Stirland et *al.*, 2001). L'ensemble de ces éléments amène à s'interroger sur le rôle des récepteurs de la mélatonine dans la PT.

L'information photopériodique de la mélatonine est transmise via les récepteurs MT1 aux cellules de PT, qui à leur tour contrôlent les cellules de la PD sécrétant la PRL. Ce contrôle se ferait par une hormone ou un facteur baptisé "la tubéraline" (Stoeckel et *al.*, 1994), qui présenterait les mêmes variations saisonnières que la PRL avec un maximum en PL et un minimum en PC et qui en plus subit une inhibition par la mélatonine (Stirland et *al.*, 2001 ; Johnston et *al.*, 2003). En 1997, Sun et *al.* ont observé pour la première fois l'existence d'un gène horloge dans

la PT. La question qui s'imposait à l'époque était principalement : Y a-t-il un système de mesure de temps dans la PT ? Une horloge ?

La régulation de la sécrétion de la PRL est-elle sous le contrôle d'une horloge ?

3. La *Pars Tuberalis* : Horloge ? Circadienne et/ou Saisonnière ?

Après la découverte du gène *Per1*, les autres gènes horloges ont été découverts dans la PT chez plusieurs espèces (Lincoln et al., 2002 ; Johnston et al., 2005, 2006). Ainsi, la PT du Mouton étudiée en PL et PC, montre que celle-ci exprime *Per1*, *Per2* mais également *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1* et *Clk* avec une oscillation influencée par la photopériode (Lincoln et al., 2002).

L'expression de *Per1* et *Cry1* est contrôlée par la mélatonine (Sun et al., 1997 ; Messenger et al., 1999, 2000, 2001 ; Dardente et al., 2003 ; Hazlerigg et al., 2004) de façon que l'augmentation de la mélatonine nocturne augmente l'expression de *Cry1* et la diminution avant le début de jour augmente l'expression de *Per1* ; et comme les variations saisonnières du signal photopériodique sont exprimées par des variations de la durée de sécrétion nocturne de la mélatonine, ceci contribuerait aux variations du moment d'apparition du pic de *Per1* et *Cry1* (Johnston et al., 2005 ; Lincoln et al., 2005). À des moments définis de la saison, les courbes *Per1* et *Cry1* se chevauchent partiellement (Hazlerigg et Wagner, 2006) et c'est uniquement à ces moments de la saison que PER et CRY coïncident sur l'échelle de temps et s'accumulent (Nuesslein-Hildesheim et al., 2000 ; Jilg et al., 2005). L'hypothèse est donc : que c'est la formation d'un dimère PER-CRY à des moments de la saison qui permet probablement de traduire un effet photopériodique de la transcription *Per1* et *Cry1* : c'est le concept de la coïncidence interne (Reppert et Weaver, 2001, 2002 ; Hazlerigg et Wagner, 2006). Ces dimères interviennent pour inhiber l'activité transcriptionnelle du dimère CLK/BMAL1 qui est responsable du contrôle des sorties de l'horloge. Ça serait donc un message 'secondaire' correspondant au moment de la formation du complexe PER-CRY qui véhiculerait les variations photopériodiques de la mélatonine pour contrôler la libération de la tubéraline agissant sur la PD et ainsi la synchronisation de la sécrétion saisonnière de la PRL.

De ce que nous avons vu, nous pouvons dire que l'expression non endogène des gènes horloges de la PT et leur dépendance mélatoninergique écarterait l'hypothèse de l'existence d'une horloge endogène au niveau de la PT. Toutefois, c'est ce contrôle de la mélatonine sur ces gènes qui permettrait de véhiculer l'information photopériodique à travers laquelle la PT contrôle la sécrétion saisonnière de la PRL au niveau de la PD.

IV. L'hypothalamus : organe cible et acteur du contrôle photopériodique

L'hypothalamus constitue une composante incontournable dans le contrôle circadien et photopériodique, ce qui lui confère une importance particulière. Plusieurs arguments renforcent cette idée :

Tout d'abord, chez tous les Mammifères étudiés jusqu'à présent, le SCN est la structure qui présente à côté de la PT une densité élevée en récepteurs de la mélatonine (Weaver et *al.*, 1989 ; Masson-Pévet et *al.*, 1994 ; Weaver et Reppert, 1996).

En plus selon les espèces, certaines aires et noyaux hypothalamiques présentent une certaine densité de ces récepteurs de la mélatonine : Mouton (Bittman et Weaver, 1990 ; Chabot et *al.*, 1998 ; Helliwell et Williams, 1994), rongeurs (Williams, 1989 ; Weaver et *al.*, 1989)...

Il a été démontré que le contrôle photopériodique de la saisonnalité de la reproduction chez le Mouton se situe au niveau de l'hypothalamus médiobasal (Malpaux et *al.*, 1993 ; Maywood et Hastings, 1995), qui présente aussi des récepteurs de la mélatonine (Chabot et *al.*, 1998 ; Helliwell et Williams, 1994).

Et enfin l'hypothalamus contient en plus les structures et noyaux qui constituent un relais, véhiculant l'information photique vers la glande pinéale : SCN et PVN.

L'hypothalamus est une structure qui contrôle l'homéostasie et ce, en régulant plusieurs systèmes et fonctions : régulations endocrines, du système nerveux autonome et des composantes émotionnelles. A travers ce contrôle, il maintient l'homéostasie en agissant directement sur le milieu intérieur. L'hypothalamus reçoit pour cela des afférences qui lui transmettent des informations concernant les changements ayant lieu dans la pression artérielle, la température corporelle, la balance hydro-électrolytique, le métabolisme, le poids corporel... mais également des afférences corticales via le système limbique. Les principales afférences sont à partir de :

- La rétine : envoie l'information vers le noyau suprachiasmatique via le tractus rétino-hypothalamique.
- Le noyau du tractus solitaire : collectant les informations viscéro-sensorielles du nerf vague.
- La formation réticulée : ce noyau reçoit une variété d'informations afférentes de la moelle épinière. Parmi celles-ci, l'information de la température cutanée.

- Les organes circumventriculaires : comme l'organum vasculosum de la lamina terminalis (OVLT) (structure sensible aux changements d'osmolarité) et le postrema (centre de vomissement).
- Les systèmes limbique et olfactif : permettent respectivement, via leurs projections, de régler les comportements affectifs et de la reproduction.
- L'hypothalamus contrôle également l'équilibre ionique et la température corporelle, respectivement via ses osmorécepteurs et thermorécepteurs.

Après traitement de l'information, le signal des afférences amorce les changements convenables. Ce signal régulateur est élaboré sous forme :

- d'un **signal nerveux** impliquant le système nerveux autonome dont les principales cibles sont : l'hypothalamus latéral, le noyau vagal pour la composante parasympathique et la corne médio-latérale de la moelle épinière pour la fonction du sympathique, ce qui permet le contrôle de la fréquence cardiaque, de la vasomotricité, de la digestion, de la sudation, des sécrétions notamment hormonales: mélatonine ...

- d'un **signal endocrinien** via les différentes composantes hypophysaires ; neurohypophyse par le contrôle direct de la sécrétion de l'ocytocine et de la vasopressine dans la circulation générale, adénohypophyse par l'intermédiaire des peptides hypothalamiques déclencheurs ou inhibiteurs de la libération des hormones hypophysaires, nommés conventionnellement 'releasing factors : RF' pour facteurs de libération (GnRH, GhRH, CRH ...) ou 'inhibiting factors : IF' pour facteurs d'inhibition (GIH, MIF, somatostatine) ou de monoamines principalement la dopamine. La régulation qu'exerce l'hypothalamus sur les glandes endocrines via l'adénohypophyse implique l'éminence médiane et le système porte hypophysaire.

Morphologiquement, l'hypothalamus est une composante du diencephale en position ventrale par rapport aux deux autres structures diencephaliques : le thalamus et l'épithalamus. Son origine embryologique dérive de l'ectoderme par l'infundibulum qui se développe à partir de la crête neuro-ectodermique. L'infundibulum se développe pour donner le plancher du 3V, la tige pituitaire et l'hypophyse postérieure. Le reste du neuro-ectoderme ventral forme l'éminence médiane et les autres noyaux hypothalamiques, qui se différencient dans la paroi latérale du 3V (Dellman et Eurell, 1998). Anatomiquement, l'hypothalamus est constitué de 4 subdivisions qui sont l'hypothalamus préoptique, antérieur, médiobasal et mamillaire. Chaque division contient des noyaux et des aires impliqués dans différents contrôles et fonctions. Il est limité : rostralement, par le chiasma optique, la bande diagonale de Broca, la *substantia innominata* et la commissure antérieure (ac) ;

ventralement par l'éminence qui se prolonge par la tige pituitaire et l'hypophyse au niveau de sa partie médiane ; caudalement il inclut le corps mamillaire et se prolonge par le tégument mesencéphalique ; dorsalement par l'aire thalamique et latéralement par les troncs optiques, le *globus pallidus*, la capsule interne subthalamique, la *substantia nigra*, l'aire de Forel, le noyau subthalamique et la *zona incerta* (Bleier et *al.*, 1979).

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs travaux ont tenté de localiser les sites d'action de la mélatonine permettant de contrôler la saisonnalité de la reproduction. Ainsi, des études notamment au niveau de l'hypothalamus se sont focalisées sur : la localisation des récepteurs de la mélatonine, l'ablation, lésions et infusion ou placement de micro-implants à mélatonine... Les résultats de toutes ces études confèrent un intérêt particulier à deux structures qui sont : le **SCN** et l'**hypothalamus médiobasal**. Dans ce qui suit, nous allons détailler particulièrement l'anatomie, de l'hypothalamus antérieur contenant le SCN, et de l'hypothalamus médiobasal, tout en discutant les aspects et approches expérimentales impliquant ces deux structures dans le photopériodisme, par la suite nous aborderons brièvement les autres régions de l'hypothalamus.

1. L'Hypothalamus antérieur

L'hypothalamus antérieur est constitué de plusieurs noyaux et aires. Il s'agit d'une division qui continue la division préoptique, située rostralement. Elle contient plusieurs noyaux, qui sont principalement, le SCN, le noyau supra-optique (SON), le PVN, l'aire hypothalamique antérieure (AHA), l'aire hypothalamique latérale (LH) et l'aire hypothalamique médiale (MHA) ainsi que l'aire rétrochiasmatique.

1.1. Noyau suprachiasmatique

Voir la partie consacrée à ce noyau ainsi que la partie 'récepteurs de la mélatonine'.

1.2. Noyau supra-optique

Le noyau supra-optique (SON) est une structure paire et symétrique par rapport au 3V. Elle est formée par deux subdivisions distinctes : la subdivision supra-optique proprement dite, appelée encore antéro-chiasmatique ou SON nu et la subdivision rétrochiasmatique. Le SON nu commence dorso-latéralement au chiasma optique et s'étend caudalement, avec une augmentation de sa densité notamment au-dessus des troncs optiques. Le SON rétrochiasmatique se prolonge vers le bas, jusqu'à la région juxta-infundibulaire (Bleier et *al.*, 1979) . Les deux subdivisions

de SON sont reliées par des fibres passant par la dérive dorsale du tronc optique chez la Chèvre (Kikusui et *al.*, 1997).

Par leur cyto-architecture (taille, densité et volume des péricaryons), les neurones du SON sont classés en une seule population homogène de magnocellules, d'une taille de 20 à 40 μm (Rhodes et *al.*, 1981). Ces neurones expriment plusieurs neuropeptides mais particulièrement la VP et l'ocytocine (OT). Les deux populations des neurones à OT et VP présentent une topographie de distribution différente. Les neurones ocytocinergiques sont principalement distribués rostralement et dorsalement tandis que les neurones vasopressinergiques occupent la portion ventro-caudale du noyau (Sofroniew et Glasmann, 1981). Chez la Chèvre, les neurones vasopressinergiques sont prédominants par rapport aux neurones ocytocinergiques et les deux populations sont confondues sur une grande surface de SON (Kikusui et *al.*, 1997). Les axones de ces neurones quittent le SON en direction dorso-médiane puis traversent la couche interne de l'éminence médiane avant d'atteindre la neurohypophyse (Alonso et Assenmacher, 1981). Des collatérales partent de ces axones vers l'éminence médiane, l'amygdale et le septum latéral (Pittman et *al.*, 1981). D'autres études ont démontré l'existence de terminaisons nerveuses vasopressinergiques (Nakada et Nakai, 1985) et ocytocinergiques (Theodosios, 1985) dans le SON.

Le SON par ses magnoneurones à VP constitue une composante intégrante du système hypothalamo-hypophysaire, qui contrôle l'excrétion d'eau à travers son action sur les reins. En effet, une concentration des liquides corporels stimule les neurones de ce système qui secrètent la vasopressine. Celle-ci est transportée par les axones pour être stockée dans la neurohypophyse (Epelbaum, 1995). La VP agit sur les récepteurs situés particulièrement sur la face interne du tube collecteur rénal, où elle induit une réabsorption d'eau.

Des afférences noradrénergiques provenant principalement des noyaux réticulaires latéraux du bulbe convergent principalement vers les neurones vasopressinergiques du SON mais aussi du PVN (Cunningham et Sawchenko, 1988). C'est aussi le cas pour des fibres dopaminergiques issues de l'aire tégumentaire ventrale et des neurones du système incerto-hypothalamique et périventriculaire-préoptique (Lindvall et *al.*, 1984). De même, une innervation cholinergique issue de l'hypothalamus latéral a été mise en évidence (Takahashi et *al.*, 2001).

D'autres afférences sérotoninergiques, histaminergiques, GABAergiques et bien d'autres ont été décrites dans le SON de la Souris et du Rat (Sawchenko et *al.*, 1983 ; Hatton et Yang, 1994). Par ailleurs, suivant les espèces, différents neuropeptides

ont été décrits dans ce noyau. Ainsi, le VIP a été rapporté dans les magnoneurones du SON chez le Rat (Toni et *al.*, 1995) et dans les neurones vasopressinergiques du SON chez l'Homme (Romijn et *al.*, 1999). De même, des neurones montrant une immunoréactivité à la tyrosine hydroxylase (TH) ont été détectés dans le SON chez le Rat (Yagita et *al.*, 1994) et chez l'Homme (Panayotacopoulou et *al.*, 2002).

1.3. Noyau paraventriculaire

Le noyau paraventriculaire (PVN) constitue un amas de neurones hétérogènes et d'une densité particulière. Il interagit avec d'autres structures nerveuses et neuroendocriniennes par des connexions afférentes et efférentes, assurant ainsi par ces voies des fonctions distinctes : neuroendocrine, d'homéostasie et cardiovasculaire entre autres (Swansen et Kuypers, 1980). Le PVN joue un rôle majeur dans la médiation de plusieurs fonctions du système nerveux autonome, ainsi que dans plusieurs rythmes neuroendocriniens. Des afférences circadiennes et du signal photique provenant du SCN font relais dans le PVN au niveau des neurones parvocellulaires (Kalsbeek et *al.*, 1993 ; Vrang et *al.*, 1997) et delà une efférence se dirige vers la colonne médiolatérale de la moelle épinière et ensuite vers le ganglion cervical supérieur, induisant la synthèse nocturne de la mélatonine dans la glande pinéale (Kalsbeek et *al.*, 1999, 2000).

Sur un plan cyto-architectural, le PVN présente deux populations de cellules : des neurones de grande taille, 20 à 40 μm , constituant les neurones magnocellulaires situés en position ventro-latérale ; et des neurones de petite taille, 10-15 μm , représentant les neurones parvocellulaires qui sont en position dorsomédiale. Chez le Rat, ces deux populations se distinguent par leur compartimentation topographique, alors que les limites entre les deux populations sont difficilement distinctes chez la Souris (Vrang *al.*, 1995).

Les neurones magnocellulaires sont repartis de façon hétérogène et expriment principalement la VP et OT (Kikusui et *al.*, 1997). Les neurones ocytocinergiques sont localisés chez le Rat en position rostrale et médiane alors que les neurones vasopressinergiques sont positionnés caudo-latéralement (Rhodes et *al.*, 1981 ; Sofroniew et Glasmann, 1981). Les axones de ces neurones quittent le PVN latéralement, et se dirigent ventralement vers le SON ipsilatéral et du côté médian vers l'éminence médiane et pénètrent ainsi l'hypophyse (Alonso et Assenmacher, 1981). Les études immunohistochimiques ont démontré que les fibres vasopressinergiques pénètrent la région centrale de la tige hypophysaire alors que les fibres ocytocinergiques sont périphériques (Van Leeuwen et *al.*, 1979). La VP est sécrétée par certains neurones en tant que hormone modulant l'activité de certains organes, notamment

la réabsorption au niveau du rein (Boersma et Van Leeuwen, 1994). Par ailleurs, la VP est aussi sécrétée en tant que 'releasing hormone', provenant en majorité des parvoneurones dorsomédians du PVN et leurs axones pénètrent par la zone externe de l'éminence médiane pour atteindre le système porte hypothalamo-hypophysaire. Dans ce cas, la VP module la libération de certaines hormones, notamment l'ACTH, particulièrement sous des états de stress (Aguilera, 1994). C'est grâce au facteur libérant la corticostérone (CRF) avec qui la VP co-localisent dans les neurones du PVN (Vrang *et al.*, 1995 ; Kikusui *et al.*, 1997), que cette modulation de la libération de l'ACTH a lieu (Antoni *et al.*, 1983 ; Antoni, 1993).

Lorsqu'elle est issue des parvoneurones à projection longue, la VP joue le rôle de neuromédiateur (Hatton, 1990). Les axones de ces fibres se dirigent vers les centres nerveux régulant la fonction végétative, notamment dans le tronc cérébral et dans la corne latérale de la moelle épinière thoracique (Hatton, 1990). C'est cette longue projection vers la corne sympathique de la moelle épinière qui est responsable de la sécrétion de la mélatonine dans la glande pinéale.

D'autres neuropeptides ont été rapportés dans le PVN mais avec des variations interspécifiques. Ainsi, le VIP a été décrit avec une forte immunoréactivité dans le PVN du vison américain (Larsen et Mikkelsen, 1993) et du Rat (Toni *et al.*, 1995). Ces auteurs, ont remarqué une augmentation de nombre de neurones et de l'immunoréactivité du VIP suite à l'hyperthyroïdisme ou suite à la castration. De même, la tyrosine hydroxylase (TH), enzyme de synthèse des catécholamines, a été décrite avec une forte immunoréactivité dans le PVN de la Souris (Pirnik et Kiss, 2005), du Rat (Yagita *et al.*, 1994) et de l'Homme (Panayotacopoulou *et al.*, 2002). Dans la classe des opioïdes, la Met-enk a été décrite surtout dans le PVN du Chien (Pego-Reigosa *et al.*, 2000).

L'intérêt que suscite cette région hypothalamique antérieure dans les études du contrôle circadien et photopériodique réside dans deux constats : premièrement, la propriété de pacemaker que comporte le SCN et son aptitude à répondre à une action de la mélatonine via un nombre élevé de récepteurs qu'il contient et ce, chez la plupart des Mammifères. Et deuxièmement, il a été démontré que l'infusion de la mélatonine au niveau de différentes régions de l'hypothalamus antérieur engendre un effet sur les gonades chez plusieurs espèces. De plus, l'ablation soit des SCN soit de la division antérieure de l'hypothalamus bloque l'effet induit par cette infusion. En effet, il a été démontré que des implants à mélatonine dans l'aire suprachiasmatique et dans l'aire rétrochiasmatique entraînent une régression utérine chez des femelles de Souris (Glass et Lynch, 1981, 1982). Cet effet n'a pas été observé en plaçant les implants

dans la division préoptique et dans la decussation postérieure de l'hypothalamus. Chez le hamster syrien, la mise d'implants des deux côtés de la division antérieure de l'hypothalamus et même dans l'hypothalamus médiobasal entraîne un effet préventif de l'action de la photopériode courte sur la régression testiculaire. De même, chez le hamster sibérien juvénile, 10 h d'infusion de mélatonine dans des parties de cette division antérieure et thalamique inhibe aussi le développement des testicules (Badura et Goldman, 1992).

Les SCN ne sont pas nécessaires pour l'effet inhibiteur de la reproduction chez plusieurs rongeurs photopériodiques. Par exemple, si la lésion de ces noyaux chez le hamster syrien mâle perturbe la sécrétion de la mélatonine et empêche ainsi la régression testiculaire causée par la photopériode courte (Rusak et Morin, 1976 ; Eskes et *al.*, 1984 ; Lehman et *al.*, 1984), il apparaît que quand la mélatonine est administrée quotidiennement (infusion qui mime la photopériode courte), une atrophie des gonades est obtenue (Bittman et *al.*, 1989). Par contre, **chez le hamster sibérien** la lésion des SCN bloque effectivement l'effet de la mélatonine injectée ou infusée sur la reproduction (Bartness et *al.*, 1991 ; Bartness, 1996) alors que la destruction de la division antérieure de l'hypothalamus chez cette espèce n'empêche pas cet effet (infusion de longue durée) sur la reproduction (Song et Bartness, 1996). Par contre, chez le hamster syrien la lésion de l'hypothalamus antérieure bloque la réponse gonadale à l'infusion mélatonine ou à l'effet de la photopériode courte (Bonfond et *al.*, 1989).

En conclusion, l'effet de la mélatonine exogène après lésion des SCN ou de la division antérieure de l'hypothalamus est différent chez la même espèce, mais surtout présente des réponses opposées entre les différentes espèces. Cela dit, ces approches expérimentales présentent des limites par rapport à la délimitation anatomique. Des lésions dans la division antérieure touchent des noyaux et des populations neuronales très hétérogènes, conduisant probablement à un résultat qui est une somme de réponses sur une multitude de systèmes.

2. L'Hypothalamus Médiobasal

L'hypothalamus médiobasal est formé principalement par 3 noyaux : le noyau arqué, les noyaux ventromédians et dorsomédians.

2.1. Noyau arqué

Le noyau arqué (Arc), est une structure impaire, située dans la région médiobasale de l'hypothalamus et qui prend une forme en arc au tour de la base du 3V (Bleier et *al.*, 1979). Il contient plusieurs neurones de petite à moyenne taille mais

également des magnocellules. Chez certaines espèces, notamment chez la Souris, ce noyau apparaît dans sa partie rostrale juste avant le détachement de la tige pituitaire.

L'Arc est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, il présente deux populations distinctes de neurones peptidergiques qui exercent des effets opposés sur le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel ; lorsque l'une est stimulée, l'autre est freinée. La première, située dans la partie ventromédiane du noyau, synthétise le NPY (Reuss, et *al.*, 1990 ; Chaillou et *al.*, 2002) et projette vers les neurones à CRF du PVN (Li et *al.*, 2000). Elle synthétise également à côté du NPY un autre neuropeptide : ' Agouti-related protein ' (AgRP). Ces deux neuropeptides stimulent l'appétit et diminuent la dépense énergétique par deux voies différentes : en augmentant les taux de NPY orexigène et en bloquant, par l'intermédiaire de l'AgRP, l'effet anorexigène de l' α -MSH. Un tiers de ces neurones co-expriment également un autre facteur orexigène, le GABA (Schwartz et *al.*, 2000). La seconde population, située dans la partie latérale du noyau secrète l' α -MSH, et montre des neurones à POMC (Pro-OpioMelanoCortin). La plupart de ces neurones co-expriment un autre neuropeptide qui exerce un effet anorexigène : le cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART). Les interconnexions axonales existant entre ces deux systèmes neuropeptidergiques laissent envisager des mécanismes de rétrocontrôle. Ainsi Cowley et *al.* (2001) ont proposé un modèle de régulation entre les deux systèmes à POMC et à NPY selon lequel la leptine freine le contrôle négatif du NPY sur les neurones à POMC, aboutissant à leur activation et stimulant ainsi la libération d' α -MSH. En même temps, la leptine inhibe la production des deux peptides orexigènes par hyperpolarisation des neurones à NPY/AgRP, mais également ceux co-exprimant le NPY et le GABA, provoquant ainsi une levée d'inhibition GABA-ergique qui s'exerce sur la population neuronale exprimant le POMC (Jégou et *al.*, 1993)

Plusieurs autres populations neuronales ont été décrites dans l'Arc avec de grandes variations inter-espèces : Dynorphine (ARNm), récepteur à leptine (ARNm), SOCS-3 « Suppressors of cytokine Signalling » (ARNm), Neurotensine (ARNm), Thyroid-Releasing Hormone (ARNm) (Elias et *al.*, 2001), TH (Pirnik et Kiss, 2005) et Met-enk (Pego-Reigosa et *al.*, 2000). Les fibres à TH et à Met-enk co-localisent avec le CRF dans la partie externe de l'éminence médiane (Hisano et *al.*, 1986). Les différences interspécifiques les plus observées concernent surtout la présence ou non de neurones à OT et/ou à VP. Le noyau arqué joue aussi un rôle important dans la reproduction chez la femelle, en agissant par les neurones LHRH (Luteinizing hormone Releasing Hormone) pour réguler la LH hypophysaire (Li et *al.*, 1999).

2.2. Noyau ventromédian

Le noyau ventromédian (VMH) est un noyau pair et symétrique par rapport au 3V. C'est l'un des plus grands noyaux de l'hypothalamus au niveau de la région tubérale. Il présente une forme ovoïde, incliné ventro-latéralement et présente une population neuronale avec trois subdivisions, dorso-médiane, ventrolatérale et centrale (Bleier et *al.*, 1979).

Le VMH a été longtemps considéré comme étant le centre de satiété (Stellar, 1954). En effet, des expériences de lésions et stimulations bilatérales de ce noyau entraînent une hyperphagie et par conséquent l'obésité. En revanche, les lésions bilatérales de la région hypothalamique latérale entraînent l'anorexie. Ces dernières lésions peuvent entraîner la mort des animaux par une anorexie totale. Ces deux centres ont donc un effet opposé. Des études menées par Meister et *al.*, (1989) ont montré une haute abondance de récepteurs de la leptine au niveau des neurones du VMH. Ce dernier noyau est considéré comme une importante cible pour cette hormone, ce qui expliquerait l'effet hyperphagique induit par sa lésion bilatérale. De plus, les neurones du VMH sont sensibles et répondent au taux de glucose, d'acide gras libres et de l'insuline existant dans la circulation sanguine. Par ses interconnexions directes avec le PVN, l'hypothalamus latéral et le noyau dorsomédian, le VMH intervient à côté de ces structures dans la régulation de l'homéostasie (Williams et *al.*, 2001).

2.3. Noyau dorsomédian

Le noyau dorsomédian (DMH) se présente sous forme d'une structure paire et symétrique de part et d'autre du 3V. Il apparaît au niveau de la partie dorsale de la région tubérale de l'hypothalamus en gardant sensiblement une forme globulaire le long de son extension. De point de vue cyto-architectural, le DMH montre une population neuronale de petite à moyenne taille (Bleier et *al.*, 1979).

Le DMH contribue à la modulation du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-adrénergique en réponse au stress (Lowry et *al.*, 2003). En effet, il est connu depuis fort longtemps que les stimuli causés par le stress élèvent les concentrations de sérotonine, du 5-hydroxyindole-acetic acide (5-HIAA), de la dopamine et de la noradrénaline dans le DMH (Kvetnanský et *al.*, 1977). Ces changements de l'activité monoaminergique dans ce noyau peuvent avoir des conséquences fonctionnelles importantes. Par ailleurs, le DMH pourrait être impliqué dans la régulation du poids corporel et du rythme de la prise alimentaire (Hoorneman et Buijs, 1982) via les projections vasopressinergiques qu'il reçoit à partir du SCN. La littérature a mis en évidence l'existence d'autres connections entre le DMH, l'Arc et le PVN via des fibres probablement vasopressinergiques (Buijs et *al.*, 1999).

En conclusion, ces trois noyaux, Arc, VMH, DMH, constituent la partie la plus importante de l'hypothalamus médiobasal ; leur rôle le plus important et qui nous intéresse dans cette revue bibliographique est de loin leur implication dans les mécanismes responsables de la **saisonnalité de la reproduction** :

Le Mouton est, comme nous l'avons vu, une espèce à reproduction de jours courts. Des essais mimant l'effet de cette photopériode courte par l'emplacement de micro-implants placés dans la région médiobasale de l'hypothalamus entraîne une stimulation sécrétoire de l'axe gonadotrope chez la brebis et chez le Mouflon (Lincoln et Maeda, 1992 ; Lincoln, 1992, 1994 ; Malpaux et *al.*, 1993, 1994, 1995, 1996). De même chez les rongeurs, des constats expérimentaux montrent des effets sur l'activité photopériodique de la reproduction en manipulant cette région hypothalamique : ainsi, chez des hamsters rendus sexuellement inactifs par une photopériode courte, des lésions de VMH entraînent une recrudescence du développement des gonades et une augmentation de la FSH et de PRL, malgré un effet inhibiteur persistant de la photopériode courte (Bae et *al.*, 1999). Des lésions dans la partie dorsale et médiale de l'hypothalamus bloquent l'effet 'jours courts' (par photopériode courte ou par infusion de longue durée de mélatonine) et évitent donc une régression testiculaire chez le mâle du hamster syrien (Maywood et Hasting, 1995 ; Maywood et *al.*, 1996), mais évitent aussi l'anoestrus saisonnier et la modification du profil du PRL (Lewis et *al.*, 2002). La partie de l'hypothalamus médiobasal représentant le site d'action de la mélatonine dans la saisonnalité de reproduction a été plus précisément identifiée par des micro-implants mimant toujours l'effet jours courts chez les ovins : **c'est l'aire hypothalamique pré-mamillaire** (Malpaux et *al.*, 1998). Cette aire pré-mamillaire est une région d'intersection entre la partie mamillaire et l'hypothalamus médiobasal, en arrière de l'Arc.

Dernièrement des gènes qui s'expriment de manière photopériodique dans l'hypothalamus médiobasale ont été identifiés (Ross et *al.*, 2004). Chez le hamster syrien, le gène *Kiss-1* qui se lie à un récepteur à 7 domaines transmembranaires, GPR54 et qui a été initialement mis en évidence dans le cadre de recherches sur le cancer, s'exprime de manière photopériodique dans le noyau arqué et le noyau périventriculaire antéro-ventrale avec des taux plus élevés en période d'activité sexuelle (photopériode longue : Hamster) et l'injection de son produit d'expression 'les kisspeptines' restaure la croissance testiculaire pendant la photopériode courte même en maintenant cette photopériode inhibitrice (Revel et *al.*, 2006 a et b, 2007). Le contrôle de la reproduction par le système Kiss1/ GPR54 est sous le contrôle de la mélatonine (Revel et *al.*, 2006b, 2007).

3. Les autres noyaux et subdivisions de l'hypothalamus

3.1. Noyaux et Aire préoptiques

La subdivision préoptique constitue la partie la plus rostrale de l'hypothalamus. Elle est limitée, en avant par la bande diagonale de Broca et son noyau, l'ac et le noyau accumbens (Ac). Elle se continue dorso-caudalement par la subdivision hypothalamique antérieure. Sa portion latérale est limitée par la *substantia innominata* et le *globus pallidus* (GP) (Bleier et al., 1979). Chez le Rat, le noyau préoptique périventriculaire et le noyau préoptique médian appartiennent à l'aire préoptique (POA) (Bleier et al., 1979). D'une manière générale, on reconnaît chez les Mammifères l'existence de cinq noyaux dans cette subdivision préoptique : Les noyaux préoptiques médian, médial, latéral, périventriculaire et le noyau périventriculaire rostrale. Leur présence partielle ou totale est sujette à des variations inter-espèces. Par ailleurs, la POA se divise en POA latérale (LPOA) et en POA médiale (MPOA) et présente des neurones petits à moyens, denses et de forme arrondie.

La subdivision préoptique reçoit des afférences indirectement du système sensoriel, qu'elle contrôle par une voie de connexion et des efférences aux noyaux de l'hypothalamus, du mésencéphale, du tronc cérébral, ce qui permet de contrôler le système autonome, somato-moteur ainsi que la motivation (Simerly et Swanson, 1988). Des études d'électrophysiologie ont démontré que les différents neurones de la POA interviennent dans le comportement sexuel et la copulation (Shimura et al., 1994). Des projections glutamatergiques issues du noyau amygdalien et du noyau du lit de la *stria terminalis* sont impliquées dans la facilitation de la copulation et des réflexes génitaux via l'augmentation de la libération de la dopamine au niveau de l'aire préoptique médiane (Hull et Domingueza, 2006). Cette aire intervient aussi dans d'autres fonctions, exemple : le comportement maternel (pour revue : Poindron et al., 2007). La POA, en particulier sa partie médiale, est incriminée dans la facilitation du sommeil, dans certains aspects de la thermorégulation (Srividya et al., 2007) et apparemment, elle est liée à la sensation de la soif (Malmo et Malmo, 1983 ; Saad et al., 1993).

Dans l'aire préoptique, des neurones à galanine (GAL) semblent jouer un rôle dans la prise alimentaire et le métabolisme du tissu adipeux (pour revue : Leibowitz, 1998). Des neurones à LHRH, ont été mis en évidence dans l'MPOA par Ibata et al. (1979). Ces neurones à LHRH, chez les ovins, montrent des variations saisonnières et sont régulés par des neurones à GABA de l'MPOA (Scott et Clarke, 1993) et pour revue : Tomaszewska-Zaremba et Przekop (2006). De plus, l'activité du NPY dans l'MPOA, mais également dans l'hypothalamus médiobasal, induit une augmentation

de la libération du **LH** (Rocha et *al.*, 2006). Cette induction pourrait être contrôlée par le LC (*locus coeruleus*) via deux voies : a) directe et représentée par les terminaisons nerveuses du LC qu'innervent l'MPOA et qui libèrent du NPY, b) indirecte, par le contrôle de la libération (et non de la synthèse) du NPY par les neurones de l'hypothalamus médiobasal.

Il a été rapporté que la sérotonine agit au niveau de la région préoptique sur les récepteurs 5-HT1A et 5-HT7. Cette action induit une modulation inhibitrice sur l'hypoxie (Gargaglioni et *al.*, 2006). Par ailleurs, l'aire préoptique est également impliquée dans les mécanismes de thermorégulation (Morrison et *al.*, 2008).

3.2. Noyaux de la subdivision hypothalamique postérieure

Les noyaux mamillaires évoluent morphologiquement dans la subdivision postérieure de l'hypothalamus. En plus des noyaux prémamillaire dorsal, prémamillaire ventral, sub-mamillo-thalamique, mamillaire médian, mamillaire latéral et la *pars caudalis* du noyau tubero-mamillaire, deux grands systèmes de fibres se projettent dans la région hypothalamique postérieure, à savoir le tractus mamillo-thalamique originaire du groupe nucléaire antérieur du thalamus et le fornix originaire de l'hippocampe (Bleier et *al.*, 1979).

A la différence des autres noyaux hypothalamiques, les noyaux mamillaires n'interviennent pas dans la régulation des fonctions autonomes et endocrines. Ils sont impliqués dans les processus de mémoire. En effet, Aranda et *al.* (2006) ont démontré, l'implication du noyau sub-mamillo-thalamique dans l'établissement de la mémoire de travail et pas celle de l'espace et Casatti et *al.* (2002) a montré que le noyau mamillaire médian participe au processus de la mémoire spatiale.

De point de vue cyto-architecture, les noyaux mamillaires présentent des neurones de différentes tailles. En effet, le noyau sub-mamillo-thalamique contient des neurones de taille moyenne à grande, le prémamillaire dorsal comme le prémamillaire ventral présentent des petits neurones de forme ovale, le mamillaire médian et le mamillaire latéral montrent de petits neurones arrondis, alors que la *pars caudalis* du noyau tuberomamillaire contient des magnocellules (Bleier et *al.*, 1979).

Plusieurs neuropeptides et neuromédiateurs ont été révélés dans les noyaux mamillaires. Par exemple, la galanine a été rapportée dans des neurones de certains noyaux mamillaires, notamment chez l'Homme (Bhide et Puranik, 2005). De même, des neurones à CART et à l'oxyde nitrique 'nitric oxide synthase' (NOS) existent dans le noyau prémamillaire des ovins (Sliwowska et *al.*, 2004). Des enzymes comme, le GAD (glutamic acid decarboxylase) sont présents au niveau des noyaux mamillaires,

et distribués dans tout le noyau mamillaire médian (Dixon *et al.*, 2004) ; mais également des récepteurs comme ceux de la leptine (ARNm) sont présents au niveau du noyau prémamillaire ventral (Elias *et al.*, 2001). Chez le Rat, ces noyaux mamillaires reçoivent une innervation (Gonzalo-Ruiz *et al.*, 1999), principalement à :

- acétylcholine transférase et secondairement à GABA, glutamate, neurotensine ou à SP, provenant du noyau septal médial et du noyau de la bande diagonale de Broca ;
- à somatostatine et secondairement à neurotensine, provenant du noyau préoptique médial ;
- majoritairement à sérotonine et quelques neurones à neurotensine ou à glutamate, provenant du noyau du raphé dorsal ;
- à glutamate à partir du subiculum ;
- à acétylcholine transférase du noyau latéro-dorsale et ;
- à GABA et Leucine-enképhaline et à neurotensine à partir du noyau supérieur central.

OBJET DU TRAVAIL

La compréhension de la physiologie des rythmes est indispensable puisqu'il s'agit d'une fonction majeure, inhérente au vivant (adaptation et anticipation aux changements journaliers et saisonniers de notre environnement). Elle est toutefois difficile, en raison : a) de la diversité des événements biologiques étudiés (ex : cycle veille/sommeil, rythmes des sécrétions hormonales, de l'hibernation, du métabolisme ou encore de la reproduction etc.), b) de la multiplicité des disciplines impliquées (neurobiologie, neuro-anatomie, endocrinologie, neuroendocrinologie, biochimie, physiologie générale, environnementale et comparative, biologie cellulaire et moléculaire, biophysique, etc.), c) des différents niveaux d'organisation envisagés (gène, protéine, cellule, organe, organisme entier, population, écosystème), d) et enfin des différences entre les espèces. Pour maintenir un état d'homéostasie équilibré dans l'extraordinaire variabilité des biotopes, à ces mécanismes nerveux et neuroendocriens d'anticipation doit s'ajouter l'adaptation immédiate aux contraintes aiguës et imprévisibles de l'environnement, notamment dans des zones hostiles (exemples : déserts froids, déserts chauds).

La grande majorité des études fonctionnelles sur les rythmes biologiques ont été réalisées sur les rongeurs et le développement actuel des approches moléculaires ne fait que renforcer cet état de fait, participant ainsi à une analyse réductrice de la problématique. La neurobiologie des rythmes, pour couvrir la complexité des processus adaptatifs, se doit aussi de développer des travaux mécanistiques sur d'autres modèles animaux et en particulier sur des modèles spécifiques aux différents biotopes existants.

Dans ce travail, nous avons choisi le Dromadaire (*Camelus dromedarius*) comme modèle biologique d'étude et ce pour plusieurs raisons :

Importance sociétale du Dromadaire au Maroc :

Au Maroc, l'élevage du Dromadaire joue un rôle socio-économique important. Il représente un moyen de travail et de transport, un moyen de traction pour le labour, une attraction touristique et une source nutritionnelle. Durant ces dernières décennies l'intérêt du Dromadaire comme animal de rente a été reconnu par les autorités du pays, et des programmes pour développer et optimiser son élevage ont été mis en place. Que ce soit en élevage intensif ou semi intensif, le développement des élevages est confronté à un handicap majeur, qui réside dans les problèmes de sa reproduction et de la saisonnalité de celle-ci. Des approches scientifiques sont donc nécessaires pour résoudre ces problèmes.

Un rythme saisonnier de reproduction :

Le Dromadaire présente une activité sexuelle saisonnière (Shalash, 1965), qui correspond dans le contexte marocain à la période allant de mi-novembre à mi-avril (80 à 90% des saillies, Sghiri et Driancourt, 1999). La gestation dure 12 à 13 mois et de ce fait, les mises-bas sont regroupées entre décembre et mars (MADRPM, 1998). Même si nos connaissances sur la physiologie sexuelle sont relativement développées, les études sur l'aspect saisonnier réalisées jusqu'ici se sont limitées à décrire la saison de l'activité sexuelle et des mises bas, les variations cycliques des hormones sexuelles et des gonades. La nature des facteurs extérieurs impliqués dans cette saisonnalité de la reproduction ne sont pas exactement connus et les discussions sur les degrés d'implication de la photopériode, de l'alimentation, de la température ou même de la sécheresse, sont intenses. En fait, la démonstration expérimentale de l'implication de ces différents facteurs externes reste à faire.

Les performances de cette reproduction saisonnière sont très faibles avec globalement un chamelon chaque 3-4 ans. Dans les faits, une femelle qui n'est pas pleine ou qui a avorté durant une saison doit attendre toute une saison (12 à 13 mois) pour être saillie de nouveau. Un contrôle adéquat de cette saisonnalité pourrait permettre de déclencher précocement une nouvelle saison de reproduction, et ainsi d'améliorer la fertilité et la prolificité de cette espèce de rente. Une étude fondamentale des mécanismes nerveux et neuroendocrines impliqués dans l'intégration des facteurs physiques de l'environnement synchronisateurs de rythmes biologiques est donc nécessaire pour une meilleure maîtrise de la reproduction chez le Dromadaire.

Le Dromadaire, une adaptation particulière à l'environnement :

En terme d'adaptation, le Dromadaire est un modèle expérimental intéressant. Il s'agit d'une espèce parfaitement adaptée aux conditions très hostiles de son biotope désertique (Elkhawad, 1992 ; Leroux, 1960) avec des mécanismes physiologiques remarquables (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957 ; Wilson, 1984). Sous la forte chaleur du désert et en état de déshydratation, il échappe aux régulations normothermique et adopte un état de poïkilothermie* avec des variations élevées, atteignant 8°C : 34°C le matin et 42°C le soir (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957 ; Schmidt-Nielsen, 1964). Ces changements de la température corporelle, souvent associés chez les autres Mammifères à des états de choc clinique et d'hyperthermie entraînant des états

* : Le mot approprié serait "hétérothermie", terme faisant référence à un état physiologique adaptatif chez des espèces homéothermes, capables de varier dans des conditions particulière (hibernation, jeûne...) leur température interne. Chez le Dromadaire, la communauté scientifique à préserver le terme "poïkilothermie" depuis l'incontournable travail de Schmidt-Nielsen et *al.*, en 1957. Pour des raisons de commodité nous utiliserons la même terminologie.

comateux et souvent la mort, constituent chez le Dromadaire une adaptation minimisant les dépenses hydriques engagées par les voies métaboliques. Bien évidemment, cette adaptation particulière s'accompagne d'autres processus physiologiques qui visent à limiter les pertes d'eau : il y a l'action antidiurétique accrue de la vasopressine au niveau des reins, l'activation de voies spécifiques utilisant les triglycérides de la graisse de la bosse pour produire l'eau métabolique et des changements comportementaux pour diminuer l'exposition de la surface cutanée au soleil (position face au soleil, position de décubitus sternal permettant une aération du bas tronc, miction rafraîchissante des cuisses...). De même, la réhydratation chez le Dromadaire est bien particulière, ne serait-ce qu'en fonction des quantités d'eau absorbées, les érythrocytes sont particulièrement résistants aux états d'hémodilution.

De cette importance à la fois socioculturelle, agro-économique et scientifique, nous avons fait le choix et le pari de prendre le Dromadaire comme modèle biologique pour les études de la neurobiologie des rythmes et ce malgré les obstacles et difficultés prévus concernant la réalisation des différentes expériences.

Notre premier objectif a été de caractériser le profil saisonnier de la sécrétion de la mélatonine :

En effet, le présent travail s'inscrit dans une approche globale qui vise à répondre à certaines interrogations concernant le contrôle de la saisonnalité de reproduction chez cette espèce, notamment par la photopériode. Or, afin d'approcher cette problématique et avant d'aborder des questions pertinentes sur le contrôle de la reproduction chez cette espèce, il nous a paru judicieux de décortiquer avant tout les bases fondamentales et les mécanismes de sa biologie des rythmes. Et l'une des questions auxquelles il fallait répondre en premier concerne la capacité ou non du Dromadaire à intégrer le message photopériodique.

Chez les Mammifères, il a été démontré expérimentalement que ce sont les variations de la durée du pic nocturne de la mélatonine qui informent l'organisme des changements photopériodiques (Bartness et *al.*, 1993 ; Goldman, 2001 ; Pévet, 2003). L'**hypothèse** donc est que **si dans un biotope désertique** correspondant aux latitudes basses où vit le Dromadaire **un véritable signal photopériodique existe** (malgré les faibles variations saisonnières de la durée du jour), **des changements de la durée de sécrétion nocturne de la mélatonine doivent être présents**. Le présent travail a donc été mené pour vérifier si, chez cette espèce, des variations saisonnières des concentrations plasmatiques de la mélatonine étaient observables. La caractérisation du rythme nyctéméral et un éventuel effet de l'âge ont été également investigués.

La capacité du Dromadaire à intégrer un signal photopériodique relativement faible ayant été démontrée, et le rythme saisonnier et journalier de la mélatonine caractérisé, le deuxième objectif de la thèse a été de définir le type de contrôle moléculaire dans la glande pinéale qui détermine la nature du profil de synthèse de mélatonine :

Chez certains ongulés, les concentrations plasmatiques de la mélatonine augmentent fortement et rapidement, laissant apparaître un pic précocement dans la nuit, et présentent également une réponse rapide à la stimulation lumineuse (Ravault et Chesneau, 1996 ; Vivien-Roels et *al.*, 1999) ; et il est connu que ce type de réponse dépend des mécanismes de régulation de l'expression du gène *Aa-nat*. Ce gène code pour la synthèse de l'enzyme Arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), enzyme responsable de la synthèse rythmique de la mélatonine (Simonneaux et Ribelayga, 2003). Chez les rongeurs, l'enzyme AA-NAT n'est disponible que la nuit puisque c'est la libération nocturne de la noradrénaline (NA) activant la PKA qui permet la transcription de son gène ainsi que sa synthèse et son activation (Garidou et *al.* 2002, 2003 a et b ; Gauer et *al.*, 1999 ; Roseboom et *al.*, 1996, 1998). Cette régulation est de type transcriptionnelle. Elle engendre donc une montée lente des concentrations en mélatonine et l'apparition d'un pic retardé dans la nuit. Chez les ongulés et les primates, au contraire, l'enzyme AA-NAT et son ARNm sont synthétisés jour et nuit, mais l'inhibition de la protéolyse pendant la nuit ainsi que l'activation de l'enzyme (grâce à la PKA activée par la libération nocturne de la NA) conduit à une disponibilité immédiate de l'AA-NAT (Coon et *al.*, 1995, 1996, 2001, 2002 ; Craft et *al.*, 1999 ; Ganguly et *al.*, 2001 ; Schomerus et *al.*, 2000). Ce type de mécanisme correspond à une régulation de type post-transcriptionnel entraînant une augmentation rapide des concentrations de mélatonine après le début de l'obscurité.

En prenant en compte les résultats obtenus dans le premier objectif et concernant la caractérisation du rythme nyctéméral de la mélatonine, nous avons voulu savoir si la régulation de la synthèse de la mélatonine au niveau de la glande pinéale chez le Dromadaire est de type transcriptionnel ou post transcriptionnel. L'approche comparative dans ce travail est donc primordiale. Ainsi nous avons étudié, dans ce deuxième objectif, l'expression du gène *Aa-nat* (par hybridation *in situ*) dans des pinéales de Dromadaires prélevées le jour et la nuit.

Le troisième objectif de ce travail était de réaliser une cartographie des noyaux de l'hypothalamus (inexistante jusqu'à la réalisation de ce travail) et une étude des phénotypes de ses neurones afin de mieux comprendre les mécanismes d'adaptations chez cette espèce :

L'hypothalamus est une structure qui contrôle plusieurs fonctions physiologiques et maintient un état d'homéostasie permanente. Il constitue une composante incontournable non seulement dans la genèse mais aussi dans le contrôle des rythmes circadiens et saisonniers. Le Dromadaire est une espèce adaptée au désert et à ses conditions environnementales particulières. La lutte contre la déshydratation, fait intervenir plusieurs mécanismes, notamment une rétention hydrique impliquant la vasopressine du système hypothalamo-neurohypophysaire (Achaaban et *al.*, 1992 ; Ben Goumi et *al.*, 1993 ; Wilson, 1984 ; Elkhawad, 1992) comme une action particulière au niveau de la régulation de la température corporelle (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957). Comprendre au niveau central les mécanismes permettant d'anticiper les saisons pour une bonne adaptation à la déshydratation de jour comme de nuit demande tout d'abord une connaissance anatomique et neurochimique de l'hypothalamus du Dromadaire.

La connaissance de la morphologie, de l'anatomie de l'hypothalamus et de son contenu peptidergique est indispensable pour toute étude visant à comprendre le fonctionnement de tel processus d'adaptation. Dans ce cadre général, le présent travail s'est fixé comme objectif 1) de réaliser une cartographie des différents noyaux hypothalamiques, étape désormais incontournable pour fournir une référence pour les études immunohistochimiques 2) et identifier les phénotypes des neurones présents et en particuliers ceux qui apparaissent potentiellement importants pour l'étude des processus d'adaptation au milieu.

Enfin, dans la dernière partie, nous avons étudié un modèle de rythme circadien : le rythme de la température corporelle et la réponse de l'horloge à l'entraînement par la photopériode mais aussi par un autre facteur de l'environnement, potentiellement important dans les zones désertiques et chez le Dromadaire : la température ambiante.

Le rythme de la température corporelle est l'un des plus utilisés en chronobiologie. Il est souvent utilisé en parallèle pour l'étude d'autres rythmes ainsi que pour les études sur la synchronisation et la désynchronisation de l'horloge endogène (Kelly, 2006). Chez tous les Mammifères étudiés, le cycle lumière-obscurité constitue le synchroniseur (zeitgeber) le plus puissant de ce rythme (Refinetti et Menaker, 1992). S'agissant d'un paramètre qui présente à cause de la régulation

thermique de grandes variations interspécifiques, il est primordial dans le domaine de chronobiologie de distinguer les espèces endothermes des espèces ectothermes (Refinetti et Menaker, 1992).

Le Dromadaire est un homéotherme non strict (Schmidt-Nielsen, 1964). En effet, Schmidt-Nielsen et *al.* (1957) ont démontré que sous les états de déshydratation et de fortes températures ambiantes, il se transforme d'un mammifère homéotherme à un animal poïkilotherme. Les variations du rythme de la température corporelle peuvent atteindre un intervalle mortel (état de choc) chez la plupart des Mammifères : 34°C à 42°C entre le matin et le soir, alors que chez cette espèce il s'agit d'un processus d'adaptation à la déshydratation permettant de minimiser les dépenses d'eau (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957 ; Yagil, 1985). La question qui se pose donc est de savoir quel serait le fonctionnement de la composante circadienne quand les nécessités de réponse à des états d'urgence d'adaptation réparatrice sont imposées à l'organisme. Mais avant de répondre à des interrogations aussi précises et précoces, il fallait caractériser tout d'abord ce rythme de la température chez le Dromadaire.

Dans le présent travail, l'objectif a été de démontrer l'existence d'une horloge endogène biologique chez le Dromadaire et d'étudier via le rythme de température corporelle, les capacités d'entraînement de l'horloge par deux facteurs environnementaux (le cycle lumière-obscure et le cycle de la température ambiante) et ce, chez des animaux bien hydratés et en parfaite homéothermie.

L'étude ayant concerné chaque objectif est présentée sous forme d'un chapitre. Les chapitres II et III ont fait l'objet d'une publication chacun, les résultats du chapitre I et IV seront publiés ultérieurement. Il convient ici de préciser qu'une partie de l'étude histologique des noyaux hypothalamiques a été réalisée dans le cadre d'un Diplôme d'Etudes Supérieures Approfondies de Mr. Chokri Aziz*, que nous avons encadré et suivi de près nous-même.

* : CHOKRI Aziz, *Cartographie des noyaux hypothalamiques du dromadaire (Camelus dromedarius) : Étude histologique sur coupes frontales*. Mémoire de Diplôme d'Études Supérieures Approfondies, discipline : Neurobiologie des Fonctions Adaptatives et Intégratives (Faculté des Sciences de Rabat, Université Mohamed V) soutenu en 2006.

MATERIEL & METHODES

I. Animaux

Les dromadaires utilisés dans cette étude proviennent principalement 1) des régions sahariennes du sud du Maroc, à savoir les provinces de Lâayoune et de Dakhla, ou 2) de la région centrale au niveau de la province de Settat. Pour cette dernière région, en regard du commerce important des troupeaux camelins et de leur déplacement, l'origine exacte des animaux est incertaine. Nous avons travaillé sur les variétés Marmouri, Khouari, Guerzni et Jebli ou sur la variété Blanche appelée 'Zergua'. Il est à noter qu'il convient actuellement (à partir de caractérisations génétiques de 11 marqueurs microsatellites) de parler de race du Nord et de race du Sud (ou Sahraoui). La race du Nord est représentée par les variétés Jebli et Blanche et la race du Sud regroupe les variétés Guerzni, Khouari et Marmouri.

Suivant les protocoles expérimentaux, le travail a été réalisé soit sur des dromadaires vivant sous des conditions environnementales naturelles, sur des animaux placés sous un environnement contrôlé (photopériode et température ambiante artificielles) ou en utilisant des dromadaires sacrifiés à l'abattoir (cerveaux prélevés en post-mortem) (détails dans les chapitres suivants).

Selon l'approche expérimentale, les animaux ont été maintenus soit dans un élevage extensif de type pastoral (la végétation des parcours constitue l'unique source alimentaire), soit élevage semi-intensif (sur parcours pendant la journée, et complément d'alimentation à l'étable le soir), ou en élevage intensif avec une stabulation permanente et une alimentation exclusivement à l'étable (détails dans les chapitres suivants).

II. Etude du rythme de la température corporelle

Afin de pouvoir utiliser pour nos études le rythme de la température corporelle comme un paramètre circadien, il nous a fallu tout d'abord répondre à certaines questions concernant l'existence d'une horloge endogène et la réponse de celle-ci à l'environnement. Un protocole expérimental a été établi sur plusieurs étapes, contenant chacune plusieurs phases (voir protocoles dans le chapitre IV dans la partie résultats et discussion). Nous avons réalisé au départ une lecture de la température rectale avec un thermomètre digital. Ensuite sur la base des résultats obtenus, nous avons opté pour l'utilisation de capteurs électroniques de la température 'Ibutton®' qui permettent un enregistrement automatiquement toutes les 10 minutes sans manipulation de l'animal.

1. Capteur électronique de la température : Ibutton

1.1. Descriptif

Le capteur électronique utilisé est un thermochron® de la famille des capteurs appelés 'iButtons®' (type DS1922L, Dallas Semi-Conductor, USA). Il s'agit d'un système autonome qui mesure la température et l'enregistre dans une section protégée à mémoire interne. L'enregistrement se fait en définissant un intervalle de lecture. Un total de 8192 8-bits ou de 4096 16-bits de lecture peut être utilisé à un intervalle stable allant d'1 seconde à 273 heures. Ce capteur se présente sous forme d'un ensemble en acier inoxydable (figure 9) qui est très résistant. Le DS1922L permet une lecture de température sur une échelle allant de -40°C à $+85^{\circ}\text{C}$. Avec le programme d'interface utilisé pour ce capteur thermique, nous pouvons choisir deux résolutions : $0,5^{\circ}\text{C}$ pour le mode en 8-bits ou $0,0625^{\circ}\text{C}$ pour le mode en 16-bits. Le DS1922L est configuré au préalable et fonctionne par une communication utilisant un lecteur externe relié à l'ordinateur. Le logiciel 'Onewireview' permet d'accéder aux diverses fonctions, notamment la programmation du thermochron sous forme de missions. Dans ces missions nous pouvons définir la résolution, l'échelle de lecture de la température, mais aussi le moment exact de début de la lecture. Un délai de temps peut être programmé pour retarder le début de l'enregistrement.

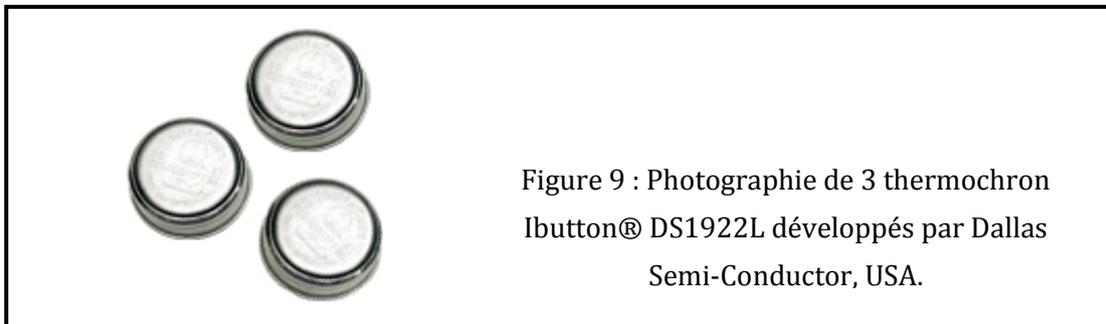


Figure 9 : Photographie de 3 thermochron Ibutton® DS1922L développés par Dallas Semi-Conductor, USA.

1.2. Programmation des capteurs

Utilisant l'interface de type Java™, le logiciel 'Onewireviewer®' permet un accès à la programmation de l'Ibutton® via son lecteur relié à un ordinateur. La programmation de chaque capteur est réalisée avant implantation. Comme cela a été signalé plus haut, celle-ci se fait sous forme d'une mission pour laquelle nous avons défini, pour chaque Ibutton®, les paramètres suivants :

- l'horloge du capteur est synchronisée avec celle de l'ordinateur ;
- une échelle de lecture de température, pour une lecture en $^{\circ}\text{C}$ toutes les 10 minutes ;
- une résolution à 16-bits ($0,0625^{\circ}\text{C}$) ;

- une sauvegarde des données même à saturation de la mémoire ;
- un délai de temps avant le début de la mission, en fonction des cas.

Les *Ibutton*® sont ensuite enrobés d'une couche de protection à transfert de chaleur composée d'élastomère de silicone (*Rhodorsil*® RTV141).

1.3. Choix du site d'implantation du capteur électronique

Le choix du site pour implanter le capteur *Ibutton*® a été dicté par :

- Une représentativité dans ce site de la température corporelle,
- Une facilité d'accès : par cavité naturelle ou par chirurgie,
- Une récupération facile du capteur,
- Et un risque minimal pour l'animal : infection, complications chirurgicales, hémorragie...

Avant de commencer les études, les capteurs ont été placés dans différents sites sur le corps de deux chèvres : dans le rectum, le vagin, dans la bosse, en sous-cutané, en intramusculaire du flanc droit et du flanc gauche (entre les muscles oblique interne et transverse de l'abdomen), en intra-cavité abdominale. La comparaison des rythmes de la température obtenus dans ces divers sites d'implantation a permis de constater que seuls les capteurs implantés dans les muscles du flanc ont permis d'obtenir un rythme de température superposable à celui obtenu avec les capteurs placés dans la cavité abdominale. En regard du risque de péritonites et de la difficulté de récupérer le capteur dans la cavité abdominale, le choix du site intramusculaire du flanc gauche s'est avéré idéal.

1.4. Chirurgie

Avant de procéder à l'implantation chirurgicale des *Ibutton*®, l'animal est préparé en le mettant en décubitus sternal. La contention a été renforcée par une prise forcée de la lèvre supérieure et de la conque de l'oreille. Le site d'implantation est situé à mi-distance entre la dernière côte et l'angle de la hanche à la bordure entre le creux et le fuyant du flanc. Un espace rectangulaire à ce niveau est rasé, dégraissé à l'alcool et désinfecté à la Bétadine. L'animal est ensuite anesthésié par une dose de type 2 de Xylazine (*Rompun*®, Bayer Allemagne) : 0,05 mg/kg en intraveineuse, et par infiltration locale de 20 ml de Lidocaïne (*Xylazine*® 2%, Astrazeneca. Canda Inc). Une incision est pratiquée sur le site en passant par la corde du flanc ; sont incisés de l'extérieur vers l'intérieur les plans suivants : la peau, le peaucier abdominal, la tunique abdominale, la partie charnue du muscle oblique externe et la partie charnue du muscle oblique interne. Le *Ibutton*® est placé latéralement à la plaie, entre le muscle

oblique interne et transverse de l'abdomen. Les différents plans musculaires sont pris par un surjet simple en fil résorbable alors que la peau est suturée par des points simples en fil de soie ou parfois de *Dexon*[®] 4-0 (Davis et Geck, USA). La plaie est ensuite désinfectée avec un aérosol à base de néomycine et protégée par un bandage. Afin de récupérer le capteur à la fin de l'expérimentation, une deuxième incision a été pratiquée juste à côté du lieu de la 1^{ère} incision, la technique chirurgicale étant identique à celle décrite ci-dessus.

Suivant la durée de chaque expérimentation, les capteurs ont été implantés seuls ou à plusieurs sur chaque animal, retirés puis réimplantés pour les expériences suivantes.

2. Étable à contrôle photopériodique et thermique

Des étables spécifiques pour les expériences de température avec cycle environnemental contrôlé ont été aménagées à la Station d'Insémination Artificielle de Ain Jamâa et à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat. Le contrôle de la photopériode se faisait (avec possibilité d'obscurité totale et de variations de la photopériode) par des minuteries électroniques contrôlant le moment de déclenchement et de la fin de la phase lumineuse. Cinq climatiseurs d'une puissance totale de 61000 BTU munis d'une horloge électronique interne ont été utilisés afin de pouvoir créer un cycle de température ambiante mimant les variations naturelles de l'environnement. La manipulation temporelle de ce cycle – température ambiante fixe, cycle inversé – était également possible.

III. Décérébration et prélèvements des cerveaux

Pour les études morphologiques, les cerveaux des dromadaires ont été prélevés après décérébration. Ils ont été soit immédiatement perfusés par un fixateur (hypothalamus pour l'histologie et l'immunofluorescence), soit disséqués après prélèvement et les structures collectées congelées à -80°C sur la carboglace (Glande pinéale et cortex pour l'hybridation *in situ*). Les saisons, les heures des prélèvements, le nombre d'animaux ainsi que les conditions d'abattage (obscurité totale ou pas) dépendent de chaque expérience et sont rapportés dans les chapitres correspondants

La séparation des têtes s'est faite par section au niveau de l'articulation atlanto-occipitale. La décérébration se fait en enlevant la calotte osseuse par section transversale sur la limite pariéto-frontale et deux autres sections longitudinales allant de celle-ci en descendant latéralement dans la fosse temporale, pour rejoindre le foramen Magnum (technique décrite par Ouassat, 1983). L'ablation du processus

coronoïde de la mandibule s'est avérée nécessaire pour compléter la section longitudinale. L'extraction du cerveau demande l'incision de la dure-mère et la section de la première paire de nerfs crâniens qui est isolée du bulbe olfactif. Puis en soulevant le télencéphale avec délicatesse, une section successive des nerfs optiques, du nerf oculomoteur et de la quatrième et la cinquième paire de nerfs crâniens est entreprise. L'ensemble des nerfs crâniens et des vaisseaux de la base du crâne, particulièrement ceux du réseau admirable ont été enlevés. Le soulèvement de l'hypophyse avec ses attaches méningées permet de libérer davantage l'encéphale et de pouvoir ainsi sectionner les six dernières paires de nerfs crâniens. Enfin, une section à la jonction bulbo-spinale au niveau du collet bulbaire permet de libérer l'encéphale de toutes ses attaches.

IV. Prélèvements sanguins

Pour déterminer les concentrations plasmatiques de mélatonine, des prélèvements sanguins ont été effectués sous diverses conditions expérimentales, ainsi qu'à des périodes et des intervalles variables, selon les expériences comme rapporté dans les chapitres suivants.

D'une manière générale, le sang a été prélevé en alternant entre les veines jugulaires droite et gauche, sur des dromadaires sous contention et maintenus en position de décubitus sternal. Ils ont été effectués en essayant de minimiser au maximum le stress que pourrait provoquer des ponctions répétées, notamment chez les jeunes. Selon l'étude, les prélèvements dans l'obscurité ont eu lieu soit sous une faible lumière rouge, soit sous le faible éclairage de la lumière de la lune. Les échantillons sanguins ont été recueillis sur des tubes sous vide, héparinés et immédiatement centrifugés à 1760 g pendant 30 minutes. Les plasmas récoltés sont stockés à -20°C en attendant le dosage de la mélatonine.

V. Dosage radioimmunologique de la mélatonine

1. Principe

Les concentrations en mélatonine dans le plasma et dans la glande pinéale du Dromadaire sont déterminées par dosage radioimmunologique (Radio immuno assay : RIA) spécifique. Cette méthode repose sur la compétition qui s'établit entre un ligand « froid » et le même ligand « chaud » (ou radioactif marqué à l'iode 125 ou au tritium) vis-à-vis d'un anticorps spécifique. Lorsque l'équilibre de fixation sur l'anticorps est atteint, on isole soit la fraction libre, soit la fraction liée à l'anticorps. La radioactivité de type gamma (pour l'iode 125) ou de type bêta (pour le tritium)

est ensuite quantifiée en coups/min (cpm), et en référence aux standards utilisés pour élaborer une gamme étalon, les concentrations en ligand froid présentes dans l'échantillon analysé sont facilement mesurées. Dans notre étude, le ligand froid est la mélatonine que nous allons doser, et le ligand chaud la mélatonine radioactive marquée à l'iode 125.

2. Protocole

* Extraction : Les plasmas sont extraits dans le dichlorométhane DCM qui précipite les protéines et autres substances à raison de 3 ml de DCM pour 600 µl de plasma. Les standards de la gamme (entre 1 et 400 pg/ml) sont traités de la même façon à raison de 5 ml de DCM pour 500 µl de standard. Après agitation et centrifugation (5 min, 2000 t/min, 4°C), la phase aqueuse est éliminée par aspiration et la phase organique est conservée (2,5 ml pour les échantillons ; 2 ml pour les standards) et évaporée à sec (pompe à vide) pendant une heure. L'extrait sec est repris dans du tampon tricine (250 µl pour les échantillons ; 400 µl pour les standards).

Le dosage de la mélatonine dans la glande pinéale est réalisé sans extraction. Des échantillons de tissus de la glande pinéale sont pesés et broyés dans 500 µl de tricine. Afin d'éviter que la température augmente et puisse ainsi dégrader la mélatonine, la tricine est refroidie sur un lit de glace pendant le broyage. Ce mélange est ensuite centrifugé pendant 10 min à 4°C et à 2000 t/min, et le surnageant est récupéré et stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

* Réactions : Un anticorps primaire polyclonal de lapin anti-mélatonine (AcI anti-MEL ; R 19540 INRA, Nouzilly, France) a été utilisé à une dilution finale de 1/125000 à raison de 100 µl. Cet anticorps est mis en présence de 100 µl d'échantillon (plasma ou glande pinéale) ou de standard, et de 300 µl du ligand « chaud » ou traceur [¹²⁵I]-2-iodomélatonine (10000cpm/300 µl). L'incubation est réalisée au moins pendant une nuit à 4°C afin d'atteindre l'équilibre de liaison.

* Dosage : Le complexe formé (AcI anti-MEL-mélatonine) est précipité en ajoutant un anticorps secondaire spécifique de AcI (AcII de Mouton anti-γ-globuline de lapin, SMAL, INRA, Nouzilly, France). La précipitation est réalisée dans de la glace fondante. La séparation de la mélatonine liée et libre se fait par centrifugation (4000 t/min pendant 30 min) et aspiration du surnageant contenant la mélatonine libre. La radioactivité liée contenue dans le culot peut être déterminée en nombre de coups par minute (cpm) grâce à un compteur γ (Packard®) et est inversement proportionnelle à la quantité de mélatonine contenue dans les tubes. Les concentrations de MEL dans les échantillons sont calculées à partir de la gamme standard et exprimées en pg/ml.

La limite de sensibilité du dosage est de 10 pg/ml. Chaque dosage est validé par des contrôles qualité à l'aide de concentrations connues faibles (QCL : 6 pg/100 µl), moyennes (QCM : 30 pg/100 µl) et élevées (QCH : 150 pg/100 µl).

3. Validation du dosage chez le Dromadaire

Le dosage de la mélatonine plasmatique a été validé chez le Dromadaire en comparant le parallélisme des courbes de déplacement entre les dilutions en série des échantillons de plasma de nuit et la courbe standard (figure 10). Le coefficient inter- et intra-dosages, calculé à partir de contrôles passés dans un seul ou dans plusieurs dosages, était respectivement de 4,4 et 5,5% pour 5 pg/ml ; 5,9 et 7,2% pour 50 pg/ml ; et 9,9 et 5,2% pour 200 pg/ml. La limite de détection du dosage était de 1 pg par tube (10 pg/ml de plasma). Les valeurs inférieures à la limite de détection ont été arbitrairement fixées à la valeur de sensibilité.

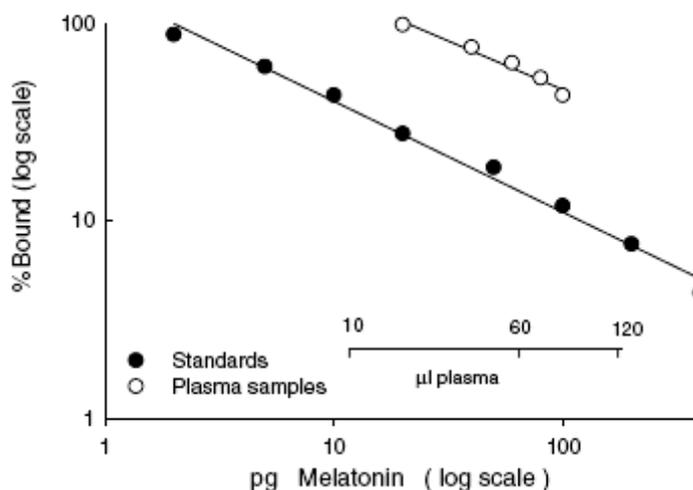


Figure 10 : Courbes de l'inhibition parallèle obtenues en variant des quantités de la mélatonine des standards et par dilution en série des échantillons de plasma de nuit.

VI. Hybridation *in situ*

1. Principe

L'hybridation *in situ* (HIS) est une technique de biologie moléculaire qui permet d'identifier et de détecter des séquences d'acides nucléiques spécifiques et donc de dire si un gène défini est exprimé dans une cellule ou dans un tissu. Cette technique se base sur deux propriétés fondamentales de l'ADN et qui sont : en premier une séparation et une fragmentation réalisable des deux hélices de l'ADN en molécules monocaténaïres ou en simples brins et, en second lieu une complémentarité entre bases. En effet, les bases azotées de chaque brin d'acides

nucléiques s'associent : A avec T, C avec G, et en transcription l'Adénine se lie avec Uracyle dans l'ARN. Ceci permet à un fragment d'acide nucléique de se lier à sa séquence complémentaire située sur le brin recherché dans le tissu ou la cellule. Ce fragment d'ADN ou d'ARN monocaténaire et exogène est appelé sonde. Les sondes peuvent être de l'ADN, de l'ARNm ou des oligonucléotides synthétisées (en général entre 20 à 50 nucléotides). Une fois que cette liaison basée sur la complémentarité est établie, une visualisation de la sonde doit se faire ; c'est pourquoi les sondes sont toujours marquées. Il existe au moins quatre types de marquage :

- Radioactif : par l'isotope radioactif de l'hydrogène ^3H ou le tritium, le Phosphore radioactif ^{32}P et le soufre radioactif ^{35}S , et la révélation se fait par radioautographie;
- Fluorescent : par un fluochrome (Cy3, FITC...) qui est soit incorporé dans la sonde, soit couplé à un anticorps dirigé contre un antigène (digoxigénine, avidine..). La révélation se fait par microscopie à fluorescence ;
- Chimique et enzymatique : par l'avidine, la stréptavidine ou l'enzyme phosphatase alcaline, et l'anticorps est dirigé contre un antigène (biotine, dioxigénine) ;
- Métallique : marquage à l'or colloïdal pour la microscopie électronique.

L'ADN est cloné dans un vecteur contenant des promoteurs (initiateurs de la transcription) et c'est la transcription *in vitro* qui nous permet d'obtenir cette sonde d'ARN recherchée. Ceci permet de générer un transcrit *antisens* ou un transcrit *sens*. Le transcrit *antisens* correspond à la séquence complémentaire de l'ARNm recherché dans la cellule ou le tissu et le transcrit *sens* correspond au contrôle.

2. Protocole

Le protocole de l'hybridation est relativement fixe. Toutefois il existe selon les laboratoires quelques variantes mais qui ne touchent pas au fond du principe de la technique. Sera cité ci-dessous l'exemple de protocole d'hybridation *in situ* que nous avons utilisé sur le tissu de la glande pinéale et du cortex, coupés au cryostat à -16°C et montés sur des lames gélatinées. Le protocole comporte 3 étapes successives : la pré-hybridation, l'hybridation et la post-hybridation.

* Pré-hybridation : Cette étape consiste en un prétraitement des coupes afin de minimiser le marquage non spécifique. Une fixation des coupes est réalisée dans le paraformaldéhyde préparé à 4% dans du tampon phosphate (PBS) 1x qui est préparé à partir de PBS 10x : 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na_2HPO_4 anhydre, 2 g KH_2PO_4 , qsp 1 l H_2O autoclavé. En plus de la préservation du tissu, cette fixation permet l'inhibition des ribonucléases endogènes. Des lavages sont effectués ensuite dans des bains de PBS

1x, puis dans du tampon citrate de sodium (SSC) 2x. Les coupes sont ensuite mises dans une solution de triéthanolamine (TEA) 0,1 M en présence d'acide acétique anhydre. Cette étape permet l'acétylation des groupements amines chargés positivement et la diminution des sites non-spécifiques d'accrochage de la sonde sur le tissu. Un rinçage dans du SSC 2x et du PBS 1x et un passage dans le tampon Tris 0,1M-glycine, sont effectués et ce, pour réduire encore les liaisons non-spécifiques. Les coupes sont ensuite rincées (SSC 2x et PBS 1x) et déshydratées dans un gradient croissant d'alcool.

* *Hybridation* : Elle correspond à l'étape d'induction de liaison de complémentarité entre la sonde et l'ARNm endogène. Dans notre cas, nous avons utilisé un mélange de trois oligo-sondes à terminal marqué au ³⁵S-ATP pour lier l'ARNm du gène (voir protocole expérimental du chapitre II des résultats). Les trois sondes sont mélangées au milieu d'hybridation. Avant le mélange, ce milieu est préchauffé à 54°C. Les coupes sont placées sur une plaque chauffante d'histologie (54°C) et sur chaque lame portant les coupes on dépose 70 µl du mélange. Les coupes sont recouvertes par la suite par des lamelles siliconées et stériles et le tout est placé dans une chambre humide (à SSC2X, formamide 50%) et mis à incuber pendant une nuit à 37°C. Il est à noter que le rôle du milieu d'hybridation est surtout de saturer les sites non spécifiques, d'empêcher l'oxydation de la sonde et de diminuer la stringence, le volume aqueux et la température de fusion.

* *Post-hybridation* : L'objectif de cette étape est de réduire le bruit de fond du marquage. Ceci se fait grâce à l'action de suppression des sondes non hybridées par une ribonucléase et par l'action d'élimination des hybridations non-spécifiques par des bains successifs de stringence croissante. Sont effectués dans l'ordre : un rinçage SSC 2x, un traitement dans un bain de tampon ARNase 1x par la ribonucléase A, un lavage dans le tampon ARNase, un passage dans des bains de sel à gradient de concentration décroissant et à température croissante et enfin une déshydratation et séchage des lames.

Après la post-hybridation, la révélation est faite par radioautographie en exposant les coupes pendant 5 jours à un film radiographique Kodak, BioMax MR Film (Sigma-Aldrich, Lyon, France) avec une gamme de standards de carbone ¹⁴C-radioactif afin de standardiser les mesures densitométriques le long du film. Placé à l'obscurité, les émissions de radioactivité β ionisent les cristaux d'argent contenus dans le film, ce qui forme une image lente. Après révélation du film, l'image devient visible avec des grains d'argent métallique. L'intensité du marquage et de la densité optique dégagée est fonction de la radioactivité et donc fonction des liaisons d'hybridation entre la sonde et l'ARNm tissulaire.

Les films à rayons X sont scannés sur un appareil de type : 'Epson 4990 Transmittance scanner[®] (Levallois-Perret, France). L'arrière-fond est enlevé et la mesure de la densité optique des niveaux ARNm est calibrée par le logiciel *ImageJ* (National Institutes of Health).

VII. Histologie classique

1. Principe

La technique d'histologie classique se base principalement sur la coloration des cellules et tissus. Le colorant est préparé dans une solution aqueuse qui peut donc se charger électriquement et qui peut colorer une substance ou un ensemble de substances de manière stable. Il est constitué d'un groupement chromophore et d'un groupement auxochrome (ionisé). Ceci permet une fixation permanente sur des groupements acides ou basiques des constituants cellulaires (à un pH donné) et une visualisation du tissu et des cellules. Les composants acides de la cellule présentent une affinité aux colorants basiques alors que les composants basiques de la cellule sont teintés par des colorants acides. Il est à souligner le succès de certaines colorations combinant les deux types de colorants acide et basique et particulièrement l'exemple de la coloration « hématoxyline (basique) - éosine (acide) ».

2. Coloration de Nissl

Plusieurs méthodes de coloration ont été mises au point pour révéler certaines structures. La plus utilisée en Neurosciences est la coloration de Nissl (du nom de Franz Nissl). Elle utilise principalement le bleu de toluidine et le violet de Crésyl et très rarement la thionine. Ces colorants sont acides, avec une grande affinité aux composants cellulaires basophiles, notamment l'ARN ou l'ADN. Ainsi, le noyau et les ribosomes sont colorés en bleu ou violet. Le réticulum endoplasmique rugueux, riche en ribosomes, est fortement coloré, d'où l'aspect de granules colorés dans le corps cellulaire du neurone. C'est cet aspect là qui a été baptisé « corps de Nissl ».

3. Technique

L'histologie classique se base sur des protocoles variables selon l'état du tissu (frais, imprégné, congelé...), la nature du tissu, le système (nerveux...) et le type de coloration. Apparaissent ainsi, dans chaque coloration, différentes variantes techniques. Néanmoins le principe du protocole reste généralement le même. Dans notre étude nous avons utilisé la technique suivante, que nous avons adaptée à la taille de l'hypothalamus du Dromadaire :

* Fixation : Les cerveaux sont fixés par perfusion de 2 l de formaldéhyde à 10% à débit alterné dans les deux carotides. Après décérébration, les blocs hypothalamiques sont disséqués et coupés en pièces de 1 cm d'épaisseur pour assurer une déshydratation et une inclusion optimales. Le tissu est post-fixé par la suite par immersion dans le même fixateur. La fixation permet la formation des ponts disulfures entre les protéines et la préservation des organites et structures cellulaires.

* Déshydratation : Les blocs hypothalamiques sont déshydratés par l'emploi d'alcools à gradient croissant. La déshydratation a été adaptée à l'épaisseur des spécimens en utilisant les bains suivants : éthanol à 70% : 5 h ; éthanol à 70% : 24 h ; éthanol à 70% : 5 h ; éthanol à 95% : 5 h ; éthanol à 100% : 5 h. À la fin de la déshydratation, le solvant final doit être miscible avec la paraffine, souvent c'est le toluène, c'est pourquoi les blocs hypothalamiques sont placés dans un mélange éthanol et toluène : 10 h, puis successivement dans des bains de toluène (3 x 5 h).

* Inclusion : Elle est réalisée dans de la paraffine liquide chauffée à 56°C (2 x 5 h). Le refroidissement de la paraffine à température ambiante permet un moulage du tissu sous forme de blocs. Ces derniers sont conservés à température ambiante jusqu'au débitage en coupes.

* Coupe au microtome : Les blocs hypothalamiques sont débités en coupes sériées, dans le plan frontal suivant un axe rostro-caudal. La coupe est réalisée à l'aide d'un microtome standard (*Shandon hypercut*®) à des épaisseurs de 6 ou de 9 µm. Les coupes sélectionnées (1 coupe sur 10) sont préparées pour la coloration. Elles sont mises en flottaison, dans une solution de gélatine 4% (chauffée à 42°C) et étalées sur des lames porte-objet. Les coupes sont ensuite déparaffinées par un chauffage des lames à 56°C jusqu'à transparence et par passage dans des bains de toluène (2 x 5 min). Par la suite, elles sont réhydratées par passage dans des bains successifs de toluène (2 x 5 min), d'éthanol 100% (2 x 5 min), d'éthanol 90% (1 x 5 min), d'éthanol 75% (1 x 5 min) et d'eau distillée (2 x 5 min).

* Coloration : Une fois réhydratées, les coupes étaient prêtes à la coloration. Cette dernière est réalisée en utilisant le bleu de toluidine, l'éosine-hématoxyline ou le crésyl violet :

- Pour le bleu de toluidine (1 g de bleu de toluidine, 1 g de Borate de Na, 1 g d'azure et 1 g de saccharose dans 100 ml d'eau), la coloration est appliquée pendant 2 min avec un temps variable et ajustable selon le degré de la teinte des coupes.

- Pour l'hématoxyline-éosine, la réhydratation dans l'eau lithinée est préconisée et la coloration est réalisée par un passage d'abord dans l'hématoxyline (5 min), un rinçage dans l'eau distillée (2 x 2 min) ensuite une coloration dans l'éosine (5 min).
- Pour le violet de Crésyl (1 g dans 100 ml d'eau distillée), la coloration est appliquée pendant 2 min avec un temps variable et ajustable selon le degré de la teinte des coupes.

Après la coloration, les coupes sont rincées dans l'eau distillée (3 x 1 min), déshydratées par passages successifs dans l'éthanol 75% (1 x 5 min), 90% (1 x 5 min), 100% (2 x 5 min) et éclaircies dans le toluène (2 x 5 min).

* *Montage* : Les lamelles couvre-objet sont montées sur les lames en utilisant les colles : l'*Eukitt*® pour les lames colorées au bleu de toluidine et au crésyl violet et le *baume de Canada*® pour l'hématoxyline-éosine. La lecture des lames est effectuée sous microscope optique (*Olympus Optical Co, LTD*®). La prise de photos est réalisée par utilisation d'un microscope *Meiji*®, muni d'un logiciel *Motic image*®.

VIII. Immunofluorescence

1. Principe

L'immunofluorescence est une technique dérivée du principe de la technique d'immunohistochimie. En effet, les deux techniques utilisent le même principe fondamental, qui est de rechercher dans une cellule ou dans un tissu un antigène reconnu par un anticorps spécifique. Les deux techniques permettent la détection et la localisation d'un ou plusieurs peptides, protéines ou autres éléments tissulaire grâce à l'utilisation d'anticorps polyclonaux, ou encore plus spécifiques par l'usage d'anticorps monoclonaux. L'avantage de l'immunofluorescence réside dans sa possibilité d'étudier 2 ou plusieurs peptides (ou autres antigènes) en même temps. Ceci est rendu possible par une gamme assez large de fluochromes. Il existe deux types d'immunofluorescence :

- ° Directe, où l'antigène est reconnu par un anticorps couplé à un fluochrome.
- ° Indirecte, avec un anticorps primaire (AcI) reconnaissant l'antigène et un anticorps secondaire (AcII) anti-espèce chez laquelle l'AcI est produit. Elle est subdivisée en trois types :
 - AcII couplé à un fluochrome (cas des doubles marquages).
 - AcI couplé à la biotine. Il se lie à la stréptavidine, qui est elle même couplée à un fluochrome. L'AcII n'est pas utilisé.

- AcII couplé à la biotine. Il se lie à la stréptavidine, qui est elle même couplée à un fluochrome.

2. Protocole

L'immunofluorescence peut se réaliser sur des coupes montées sur lames ou sur des coupes flottantes. Elle peut également se réaliser sur des coupes de tissus fixés, congelés et coupés au cryostat, comme elle peut être appliquée sur un tissu fixé déshydraté, inclus à la paraffine et coupé au microtome.

Comme pour la plupart des techniques, des variantes existent mais le principe reste le même. Ci-dessous seront présentés les exemples d'immunofluorescence utilisées pour étudier le contenu neuropeptidergique de l'hypothalamus chez le Dromadaire. Des différences existent selon qu'on recherche un peptide ou deux sur la même coupe :

2.1. Immunomarquage simple

Cette technique permet la recherche d'un seul neuropeptide sur la coupe. Elle consiste en une étape de fixation et de préparation du tissu, des étapes d'incubation, de révélation et de montage

* Préparation du tissu : Un lavage par perfusion d'une solution héparinée (2,5 UI/ml) de chlorure de sodium 0,9% (NaCl, Fluka®) à pH = 7,4 est effectué pour chasser le sang et l'empêcher de coaguler dans les vaisseaux, suivie d'une fixation des cerveaux par perfusion de 3 à 4 l de paraformaldéhyde à 4% (PAF, Scharlau®) à débit alterné dans les deux carotides. La solution du PAF est préparée extemporanément à 8% dans de l'eau distillée chauffée à 70°C, ensuite filtrée, et enfin diluée à 50% avec du tampon phosphate salin (PBS 0,2M, pH = 7,4).

Après décérébration et dissection, les blocs hypothalamiques sont post-fixés par immersion à 4°C dans le même fixateur (PAF 4%) pour une durée de 2 à 3 jours à 4°C. Un rinçage de 3 x 10 min est effectué dans le tampon phosphate (PB 0,1M ; pH = 7,4) suivi d'une cryoprotection à 4°C dans le sucrose (Fluka®, 20% du tampon PB 0,1M). La solution de sucrose est renouvelée de manière hebdomadaire. Les blocs hypothalamiques sont ensuite congelés pendant 2 minutes à -30°C dans de l'isopentane (C5H12, Fluka®) refroidis sous vapeur d'azote liquide. Dans le but d'assurer une congélation tissulaire optimale et une distribution homogène du froid, les blocs hypothalamiques sont divisés et coupés en pièces de 1 cm d'épaisseur. À l'aide d'un cryostat (leica-3050®), les blocs sont débités en coupes frontales de 20 µm. Les tranches hypothalamiques sont étalées sur des lames gélatinées ou Super-frost® et gardées à -20°C jusqu'à utilisation pour l'immunofluorescence.

* Pré-incubation : Les coupes sur lames sont circonscrites par un film hydrophobe du stylo 'Dakopen®'. Elles sont placées dans une chambre humide d'incubation, puis 250 µl à 300 µl de tampon 1 (BPS à 0,05 M contenant 5% de sérum albumine bovin (BSA), *sigma*® et 0,5% de TritonX) sont déposés sur chaque lame. Elles sont incubées sans agitation pendant une heure. Il est à noter que la BSA permet une saturation des sites antigéniques non spécifiques et que le triton permet de perméabiliser la membrane cellulaire et donc une meilleure pénétration des anticorps.

* Incubation primaire : Le tampon 1 couvrant les lames est éliminé en le versant dans un bac. L'anticorps primaire préalablement dilué dans le tampon 1 est alors déposé à raison de 250 µl à 300 µl par lame pour une incubation d'une nuit à température ambiante et sans agitation.

Les anticorps et les dilutions utilisées sont :

- anticorps polyclonal anti-Arginine vasopressine (AVP) produit chez le lapin, utilisé au 1:1000 et anticorps polyclonal anti-OT produit chez le lapin, utilisé au 1:500, fournis à titre gracieux par Dr G. Alonso (Alonso, 1988) ;
- anticorps monoclonal cyclique anti-AVP produit chez la Souris (*Sigma*®) et utilisé au 1:500 ;
- anticorps polyclonal anti-VIP produit chez le lapin, utilisé au 1:1000, et généreusement donné par Dr G. Tramu (DeLoof *et al.*, 1988) ;
- anticorps monoclonal anti-TH produit chez la Souris (*Sigma*®), utilisé au 1:1000 ;
- anticorps polyclonal anti-GAL produit chez le lapin (*Santa Cruz Biotechnology*®, INC), utilisé au 1:500 ;
- anticorps polyclonal anti-Met-enk (Tramu et Leonardelli, 1979) produit chez le lapin, utilisé au 1:500, généreusement donné par Dr Michel Arluison (NSI, Paris VI, France) et fourni gracieusement à l'origine par Pr G. Tramu (Université de bordeaux, France) ;
- anticorps polyclonal anti-NPY (Ciofi *et al.*, 1987) produit chez le lapin, utilisé au 1:500, généreusement donné par Dr Michel Arluison (NSI, Paris VI, France) et fourni gracieusement à l'origine par Pr G. Tramu (Université de bordeaux, France) ;

* Incubation secondaire : Le lendemain, des lavages sont réalisés, 3 x 10 min dans le tampon 2 (BSA à 0,2% de PBS 0,05 M) suivis d'une incubation de 2 heures à température ambiante dans l'anticorps secondaire. Ce dernier était un anti-lapin biotinylé, produit chez la Chèvre (*Vector*®) et préalablement dilué dans le tampon 2 à raison de 1:200.

* **Révélation** : Cette étape consiste à l'ajout du composant contenant la fluorescence et donc sa détection au microscope. Des lavages dans le PBS (0,05 M), 3 x 10 min et sous agitation sont effectués et ensuite une incubation dans la stréptavidine couplée à un fluochrome (Cy3, FITC...) permet une formation de liaison chimique basée sur l'affinité de la stréptavidine et de la biotine. La stréptavidine-fluochrome est diluée à 1:200 dans le PBS (0,05 M) et déposée à raison de 250 µl à 300 µl par lame. Cette incubation se fait pendant 2 heures à température ambiante sous obscurité et sans agitation.

* **Montage** : Les lames sont rincées dans le PBS (0,05 M), 4 x 10 min sous agitation et en obscurité puis recouvertes par des lamelles couvre-objets en utilisant le Mowiol (*Sigma*®) comme milieu de montage.

L'observation des coupes et la prise des photomicrographies est réalisée sous un microscope à fluorescence (*Leica*® DM400B) et sous un microscope à fluorescence inversé (*Zeiss*® Axiovert200 à platine motorisée) ou, pour les résultats les plus intéressants, sous microscope confocal (*Leica*® TCS SP2 AOBS).

2.2. **Immunomarquage double**

Cette technique permet la recherche de deux neuropeptides sur la même coupe. La technique est la même que la précédente, avec une préparation du tissu, une pré-incubation, une incubation primaire, une incubation secondaire et un montage. Seule l'étape utilisant la stréptavidine-fluochrome est éliminée du protocole. De même, **les deux anticorps primaires** (dirigés contre les 2 neuropeptides recherchés) ne sont pas biotinylés et ils sont produits chez deux espèces différentes (généralement un polyclonal produit chez le lapin et un monoclonal fabriqué chez une autre espèce) **et les deux anticorps secondaires** sont couplés directement à des fluochromes différents.

Les anticorps primaires utilisés dans ces études de double immunomarquage sont les mêmes que ceux listés ci-dessus ; alors que les anticorps secondaires utilisés sont différents, il s'agit de :

- l'anti-lapin conjugué à Cy3 produit chez le Mouton (*Sigma*®) dilué au 1:500 ;
- l'anti-Souris conjugué à la FITC produit chez le Cheval (*Vector*®) dilué au 1:500 ;
- l'anti-lapin Alexa fluor 488 produit chez la Chèvre (*Molecular Probes*®) dilué au 1 :250.

IX. Dosage des protéines par la méthode Lowry

Cette méthode, développée par Lowry et *al.* (1951), repose sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par des complexes protéines-cuivre. En effet, Le Folin-

Ciocalteu est à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec la tyrosine et le tryptophane, induisant une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. Cette dernière se base sur une liaison entre les ions Cu^{2+} (ajoutés sous forme de sulfate de cuivre) aux atomes d'azote des ponts peptidiques de la protéine. Sous un pH alcalin, le complexe produit est de couleur violette avec une absorption maximale à 540-550 nm. L'intensité de la coloration bleue de la méthode de Lowry est mesurée à la longueur de 750 nm par spectrophométrie. Ceci est basé sur la relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration. Cette méthode est d'une sensibilité élevée, la rendant la plus utilisée pour ce type de dosage. Cette sensibilité peut aboutir à des fourchettes de 5-10 μg . Il est à noter que depuis la mise en place de cette technique, elle a été modifiée par Hartree (1972) et ensuite par Rice (1982) et ce dans l'objectif de compenser l'interférence entre les composés phénoliques et le réactif de Folin. Depuis d'autres variantes de la technique sont apparues.

X. Analyses statistiques

Les calculs et analyses statistiques effectuées seront explicités dans chaque chapitre de la partie Résultats.

RESULTATS

Chapitre I : Anatomie de l'hypothalamus et distribution de certains neuropeptides

I. Introduction

L'hypothalamus est une structure du diencephale, qui est responsable du contrôle de l'homéostasie. En régulant plusieurs systèmes fonctionnels et en agissant directement sur le milieu intérieur il maintient cette homéostasie. L'hypothalamus reçoit des afférences nerveuses en provenance de diverses structures (rétine, noyau du tractus solitaire, formation réticulée, organes circumventriculaires, systèmes limbique et olfactif, etc.) qui l'informent sur les changements extérieurs et intérieurs (environnement lumineux, odeurs, température extérieure et corporelle, pression artérielle, balance hydro-électrolytique, métabolisme, etc.). Après traitement des informations, l'hypothalamus amorce les changements adéquats et distribue les signaux régulateurs via des efférences nerveuses ou endocrines. Ces signaux régulateurs sont élaborés sous forme :

- **de signaux nerveux**, impliquant le système nerveux autonome dont les principales cibles sont: l'hypothalamus latéral et le noyau vagal pour la composante parasympathique, et la corne médio-latérale de la moelle épinière pour la composante sympathique. Ceci permet le contrôle de la fréquence cardiaque, de la vasomotricité, de la digestion, de la sudation, des sécrétions hormonales, etc.

-**de signaux endocrines** via les différentes composantes hypophysaires :
1) neurohypophyse par le contrôle direct de la sécrétion de l'ocytocine et de la vasopressine dans la circulation générale, 2) adénohypophyse par l'intermédiaire des peptides hypothalamiques déclencheurs ou inhibiteurs de la libération des hormones hypophysaires, ('releasing factors' et 'inhibiting factors') ou de monoamines, principalement la dopamine.

Chez les Mammifères, la genèse et le contrôle des rythmes circadiens et des rythmes saisonniers sont parmi les fonctions majeures de l'hypothalamus. Les noyaux suprachiasmatiques (SCN) sont le siège de l'horloge circadienne principale. Ces noyaux génèrent un rythme endogène (d'approximativement 24 h) et sont impliqués directement dans la régulation des rythmes circadiens et saisonniers (Moore, 1983 ; Morin, 1994). Cette horloge est synchronisée à exactement 24 h, principalement par le cycle jour-nuit (Pittendrigh et Daan, 1976) et ce, par l'intermédiaire du tractus rétino-hypothalamique qui lie la rétine à la partie ventrale des SCN (Moore et Lenn, 1972). L'information circadienne sortant des SCN synchronisés, est distribuée à différentes structures cérébrales, en particulier les noyaux

paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN). A partir des PVN une voie polysynaptique complexe se terminant par des fibres noradrénergiques rejoint la glande pinéale (Swanson et Kuypers, 1980 ; Kalsbeek et *al.*, 1993 ; Larsen et *al.*, 1998 ; Teclemariam-Mesbah et *al.*, 1999) et est responsable de la synthèse rythmique nocturne de la mélatonine (pour revue : Pévet, 1988). La durée du pic nocturne de cette sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit et correspond donc à un signal photopériodique. La lecture saisonnière de ce message « nuit » se fait au niveau des récepteurs de la mélatonine qui sont distribués massivement dans la pars tuberalis de l'adénohypophyse (Weaver et *al.*, 1989 ; Masson-Pévet et *al.*, 1994 ; Weaver et *al.*, 1996) mais aussi, selon les espèces, dans plusieurs structures cérébrales et périphériques (pour revue et liste voir Masson-Pévet et *al.*, 1994) dont les SCN chez certaines espèces. L'hypothalamus médiobasal contient également des récepteurs de la mélatonine et il a été suggéré que ces récepteurs seraient impliqués dans le contrôle photopériodique de la saisonnalité de la reproduction chez le Mouton et le Hamster (Malpoux et *al.*, 1993 ; Helliwell et Williams, 1994 ; Maywood et Hastings, 1995 ; Chabot et *al.*, 1998).

L'hypothalamus constitue donc une composante incontournable, non seulement dans la genèse, mais aussi dans le contrôle des rythmes circadiens et saisonniers.

Plusieurs neurones peptidergiques des SCN sont connus pour intervenir dans le contrôle des rythmes circadiens et saisonniers. Par exemple, ce sont les neurones contenant le peptide intestinal vasoactif (VIP) dans la partie ventrolatérale des noyaux, qui reçoivent les afférences rétiniennes directes (Moore, 1973 ; Cassone et *al.*, 1988 ; Ibata et *al.*, 1989 ; Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1992 ; Abrahamson et Moore, 2001) nécessaire à la synchronisation photique de l'horloge (Jacomy et *al.*, 1999). Ces neurones VIP projettent non seulement dans diverses structures hypothalamiques mais aussi dans la partie dorso-médiale des SCN contenant des neurones vasopressinergiques. Ces neurones à VP, joueraient un rôle primordial dans l'élaboration et la distribution des signaux circadiens. Des études ont démontré que dans ce noyau, le contenu neuronal en VP (Protéine et ARNm) varie suivant un rythme (Larsen et *al.*, 1994 ; Kalsbeek et *al.*, 1995 ; Duncan et *al.*, 1995 ; Smith et Carter, 1996) endogène (Yamase et *al.*, 1991 ; Cagampang et *al.*, 1994) avec une acrophase diurne.

D'autres neuropeptides et d'autres neurotransmetteurs sont connus pour être impliqués dans les voies afférentes aux SCN et pour jouer un rôle dans les mécanismes de synchronisation de l'horloge. Dans la partie ventrolatérale des SCN, des fibres contenant le neuropeptide Y (NPY) (contiennent aussi du GABA) projettent

sur les neurones à VIP (Ibata *et al.*, 1988 ; François-Bellan et Bosler, 1992). Ces fibres à NPY proviennent de l'IGL (Card et Moore, 1989 ; Morin *et al.*, 1992) et forment le tractus geniculo-hypothalamique. Ce tractus est une voie de passage pour les synchroniseurs non photiques, (Challet et Pévet, 2003 ; Juhl *et al.*, 2007) comme cela a été démontré par des approches lésionnelles (Harrington et Rusak, 1986 ; Pickard *et al.*, 1987 ; Edelstein et Amir, 1999 ; Challet *et al.*, 1996). Chez le Hamster doré, des neurones dans l'IGL et contenant de la méthionine-enképhaline (Met-enk) projettent également sur les SCN (Morin *et al.*, 1992 ; Morin et Blanchard, 1995). Ces neurones à Met-enk dans l'IGL reçoivent une innervation rétinienne et sont activés par la lumière (Juhl *et al.*, 2007). Ils seraient responsables de la transmission aux SCN d'une information photique indirecte. Les afférences sérotoninergiques aux SCN, originaires de neurones dans les noyaux du raphé médian (Azmitia et Segal, 1978 ; Hay-Schmidt *et al.*, 2003) et du raphé dorsal (Azmitia et Segal, 1978 ; Meyer-Bernstein et Morin, 1996 ; Vrang *et al.*, 2003) représentent un autre tractus majeur impliqué dans l'intégration par l'horloge de facteurs synchronisateurs. Ces neurones sérotoninergiques, en particulier ceux des raphés dorsaux, projettent également sur l'IGL (Malek *et al.*, 2004, 2005). Ces afférences sérotoninergiques à l'IGL comme aux SCN seraient impliquées dans l'intégration d'informations non-photiques (Challet et Pévet, 2003). Enfin, des fibres contenant de l'enzyme tyrosine hydroxylase (TH) et des récepteurs D1 dopaminergiques ont été décrites dans les SCN du fœtus du Hamster doré. Elles disparaissent après la naissance et sont très probablement impliquées dans la synchronisation de l'horloge fœtale par des facteurs en provenance de la mère (Strother *et al.*, 1998).

Les neuropeptides des neurones de l'horloge peuvent avoir différents rôles selon les différents sites de projection et ceci est encore plus évident si l'on considère l'ensemble de l'hypothalamus. Par exemple, la VP peut être libérée dans la circulation sanguine ou directement dans le 3V et agir comme hormone. Elle peut agir comme 'releasing factor', contrôlant la libération de l'hormone ACTH par l'adénohypophyse (Aguilera, 1994 ; Antoni, 1993), ou comme neurotransmetteur/neuromodulateur dans différentes structures cérébrales (Epelbaum, 1995 ; Kalsbeek et Buijs, 1992 ; Kalsbeek *et al.*, 2002). Le système magnocellulaire hypothalamo-neurohypophysaire des noyaux paraventriculaires et supra-optiques est responsable du contrôle osmotique et de la rétention rénale en libérant la vasopressine dans la neurohypophyse. Cette hormone agit au niveau des récepteurs V2 localisés dans les cellules du tube collecteur du rein (Orloff et Handler, 1967) mais également au niveau des récepteurs V1a (Arpin-Bott *et al.*, 1997 ; Arpin-Bott *et al.*, 1999) localisés dans les tubules connecteurs du cortex, le tube collecteur cortical et dans l'appareil juxta-glomérulaire

(Arpin-Bott et *al.*, 2002). En outre, il a été admis que la deuxième hormone, l'ocytocine (OT), appartenant à ce système, intervient dans la régulation osmotique au niveau du rein (Arpin-Bott et *al.*, 1997 ; Arpin-Bott et *al.*, 2002). Ce système contient, en plus un autre neuropeptide, la galanine (GAL) (Melander et *al.*, 1986 ; Arai et *al.*, 1990 ; Landry et *al.*, 1991 ; Arai et Calas, 1991), qui répond à la stimulation osmotique par une augmentation de sa biosynthèse et de sa sécrétion (Skofitsch et *al.*, 1989 ; Meister et *al.*, 1990), formant ainsi l'un des aspects de la plasticité de ce système (Calas et *al.*, 1994) .

Le Dromadaire est une espèce adaptée au désert et à ses conditions environnementales particulières. La lutte contre la déshydratation fait intervenir plusieurs mécanismes, notamment une rétention hydrique impliquant la vasopressine du système hypothalamo-neurohypophysaire (Wilson, 1984 ; Achaaban et *al.*, 1992 ; Elkhawad, 1992 ; Ben Goumi et *al.*, 1993) comme une action particulière au niveau de la régulation de la température corporelle (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957). Comprendre au niveau central les mécanismes permettant d'anticiper les saisons pour une bonne adaptation à la déshydratation de jour comme de nuit, demande tout d'abord une connaissance anatomique et neurochimique de l'hypothalamus du Dromadaire.

Dans ce cadre général, le présent travail s'est fixé comme objectif 1) de réaliser une cartographie des différentes subdivisions hypothalamiques et 2) d'identifier les phénotypes des neurones présents, et en particulier ceux qui apparaissent potentiellement importants pour l'étude des processus d'adaptation au milieu environnemental désertique et semi désertique. En fonction des résultats de la littérature et des résultats préliminaires chez le Dromadaire (Achaaban et *al.*, 1992, Ben Goumi et *al.*, 1993), la VP, l'OT, le VIP, la Met-enk, la TH, le NPY, la GAL et la sérotonine ont été spécifiquement analysées.

II. Protocole expérimental

La cartographie des noyaux hypothalamiques a été faite à partir de coupes histologiques classiques. 15 cerveaux de Dromadaires (7 femelles et 9 mâles) âgés entre 4 et 12 ans ont été utilisés. L'analyse de la distribution des neurones peptidergiques dans l'hypothalamus a été réalisée sur les cerveaux de 21 dromadaires (12 mâles et 9 femelles) âgés entre 4 et 12 ans. Tous les animaux ont été sacrifiés à l'abattoir municipal d'Eddakhla (23°43'N, 15°57'O) et de Souk Essabt de Témara (33°93'N, 6°91'O) entre le mois de novembre 2004 et le mois de mars 2007. Les Dromadaires étaient de variétés Khouari, Guerzni et Marmouri et originaires de la région d'Oued Eddahab (21°8'-25°7'N, 11°9'-12°-16°6'O) et de la région de Settat (33°04'N, 07°37'O). Ils étaient élevés en système pastoral, donc sous des conditions naturelles de photopériode et de température. Ils recevaient selon le cas,

une alimentation complémentaire à base de paille, de foin de luzerne et de tourteaux de betterave, avec un accès libre à l'eau. L'abattage a été effectué suivant le rituel islamique 'A Nahre' juste après le lever du soleil. Après isolement de la tête, une décérébration, une fixation et un traitement des échantillons ont été réalisés suivant les protocoles détaillés dans la partie Matériel et Méthodes. Les techniques d'histologie et d'immunofluorescence ont été également détaillées dans ce même chapitre.

Pour une cartographie précise des noyaux hypothalamique, nous avons commencé par définir un point de référence. Il correspond au point de fusion des nerfs optiques : chiasma optique (partie rostrale) et nous l'avons noté H0. La lecture et l'interprétation des coupes histologiques, toutes dans un plan frontal, ont été réalisées en s'appuyant sur les travaux anatomiques et histologiques de l'hypothalamus d'autres espèces domestiques : la Vache, le Mouton et la Chèvre. Lorsque les références manquaient, nous avons eu recours à d'autres atlas, notamment celui du Rat (Bleier et *al.*, 1979 ; Paxinos et Watson, 1982) et du Babouin (Riche et *al.*, 1968) et les publications topographiques de l'hypothalamus humain (Travaux de l'équipe de Hofman M.A. et collaborateurs : voir plus loin). La nomenclature adoptée lors de ce travail se réfère pour l'essentiel aux références scientifiques internationales. Pour représenter les résultats, nous avons utilisé des dessins (agrandis cinq fois par rapport à la taille réelle du tissu) réalisés sur papier millimétrique et recopiés sur du papier dessin. Chaque dessin correspondait à une coupe dont la distance (en mm) est calculée par rapport au plan H0. Cette distance a été déterminée en multipliant le rang par l'épaisseur de la coupe (6 ou de 9 μm).

III. Résultats

L'étude histologique a permis la construction d'une cartographie précise de l'hypothalamus du Dromadaire. L'identification des différentes structures et noyaux, l'étude de leur étendue, de leurs rapports morphologiques et de leur composition cellulaire a permis d'établir un atlas anatomique (figure 11).

L'hypothalamus du Dromadaire est situé ventralement par rapport au thalamus et latéralement de chaque côté du 3V. Il est limité rostralement par le chiasma optique, la bande diagonale de Broca, la *substantia innominata* et la commissure antérieure ; ventralement par l'éminence médiane qui se prolonge par la tige pituitaire et l'hypophyse ; caudalement il inclut le corps mamillaire et se prolonge par le tégument mesencéphalique ; dorsalement par l'aire thalamique et latéralement par les troncs optiques, le *globus pallidus*, la capsule interne subthalamique, la *substantia nigra*, le noyau subthalamique et la *zona incerta*.

Comme chez tous les mammifères (voir discussion), chez le dromadaire, l'hypothalamus comporte quatre principales subdivisions : la région préoptique (hypothalamus préoptique), la région antérieure (hypothalamus antérieur), la région tubérale (hypothalamus médiobasal) et la région postérieure ou mamillaire (hypothalamus postérieur). Au niveau de chaque division se définissent des groupes de noyaux. La région préoptique comporte : le noyau préoptique périventriculaire (Nep) et le noyau périventriculaire antérieur (Pea). La région antérieure est constituée par les noyaux suprachiasmatiques (SCN), supra-optiques (SON), et paraventriculaires (PVN). La région tubérale inclut les noyaux dorsomédians (DMH) et ventromédians (VMH), le noyau arqué (Arc) et le noyau tubéral (Tu) ; et enfin la région postérieure est constituée des noyaux mamillaires.

Les limites des subdivisions hypothalamiques sont parfois peu précises. Par exemple, les noyaux des deux subdivisions antérieure et tubérale se chevauchent et coexistent ensembles sur des sections de niveau rétrochiasmatique (Figure 11 : plan H12, H13, H14 ; figure 35).

Figure 11

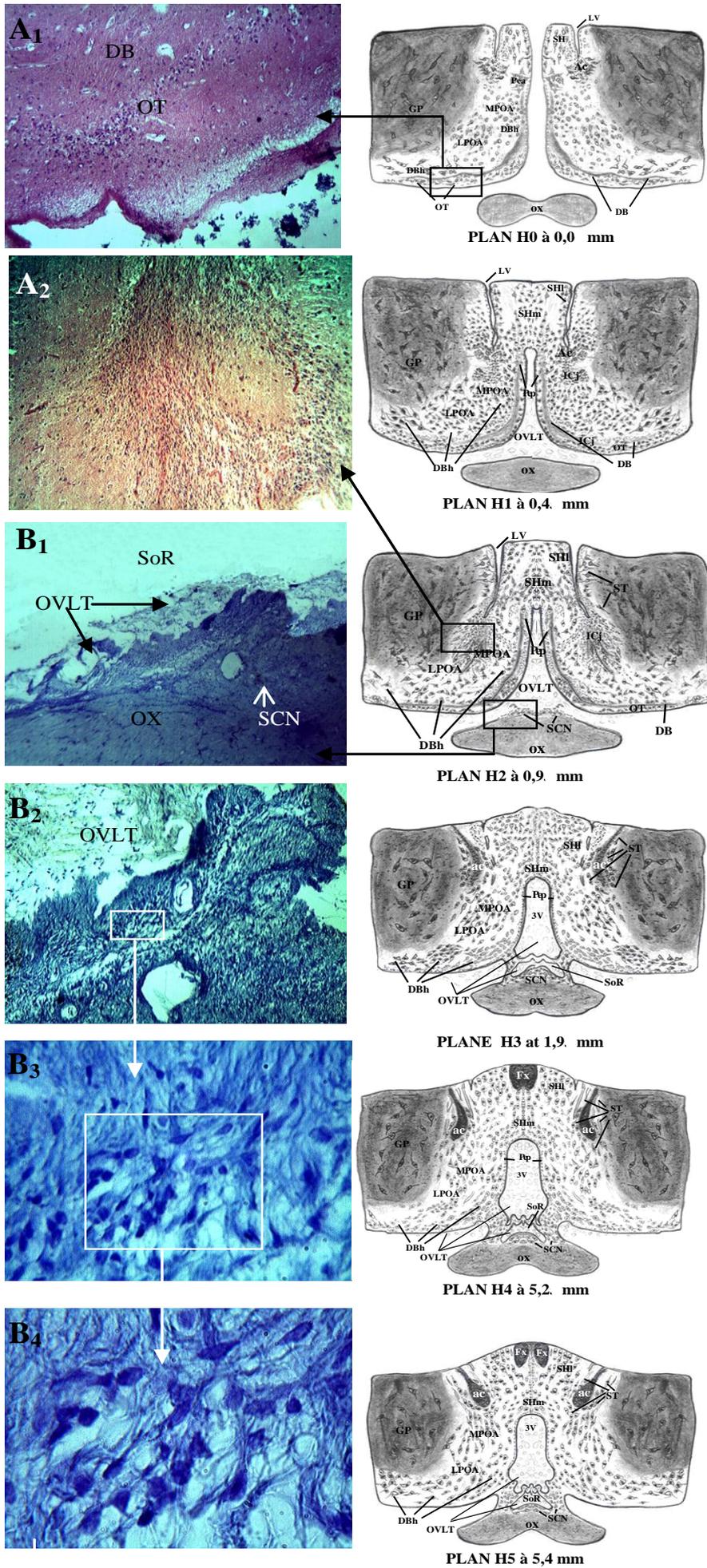


Figure 11 : Suite 1

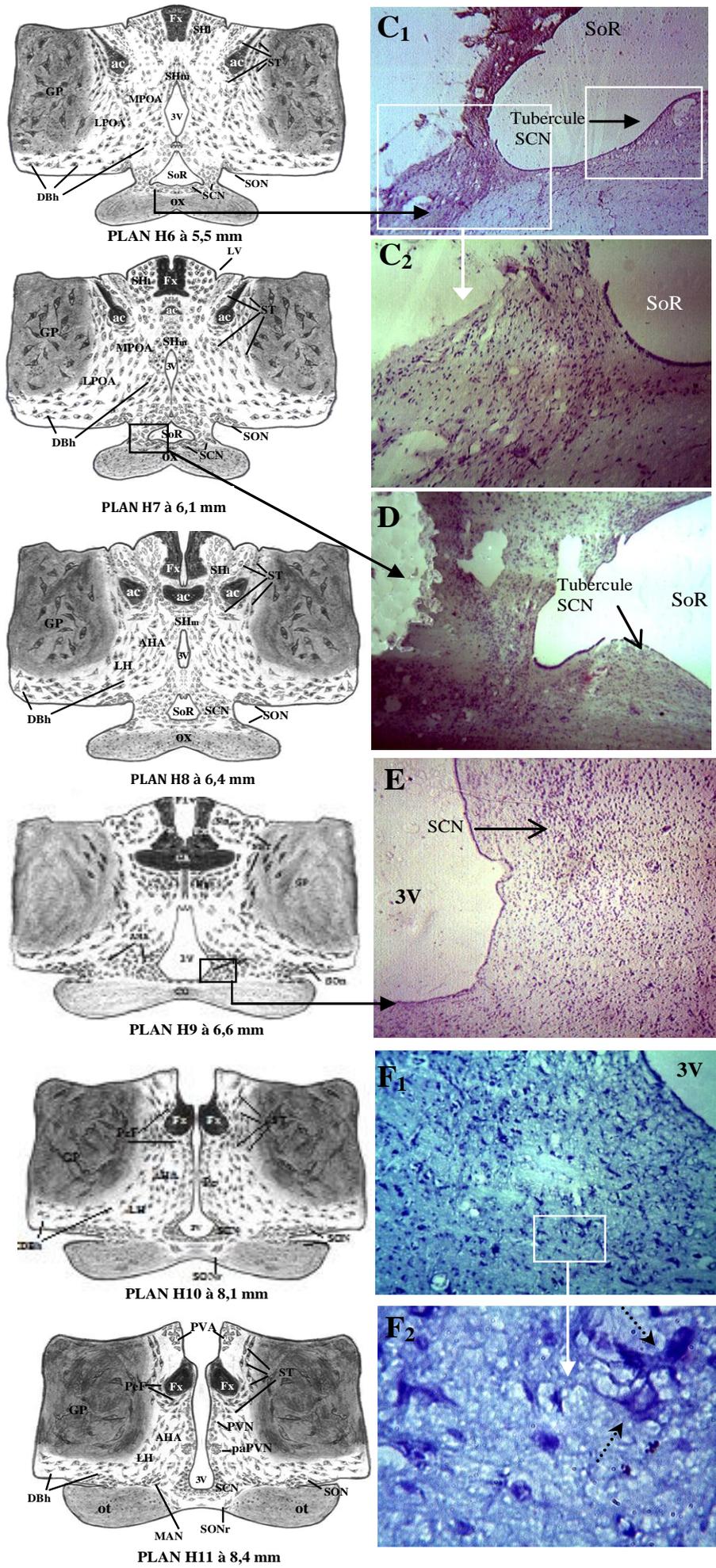


Figure 11 : suite 2

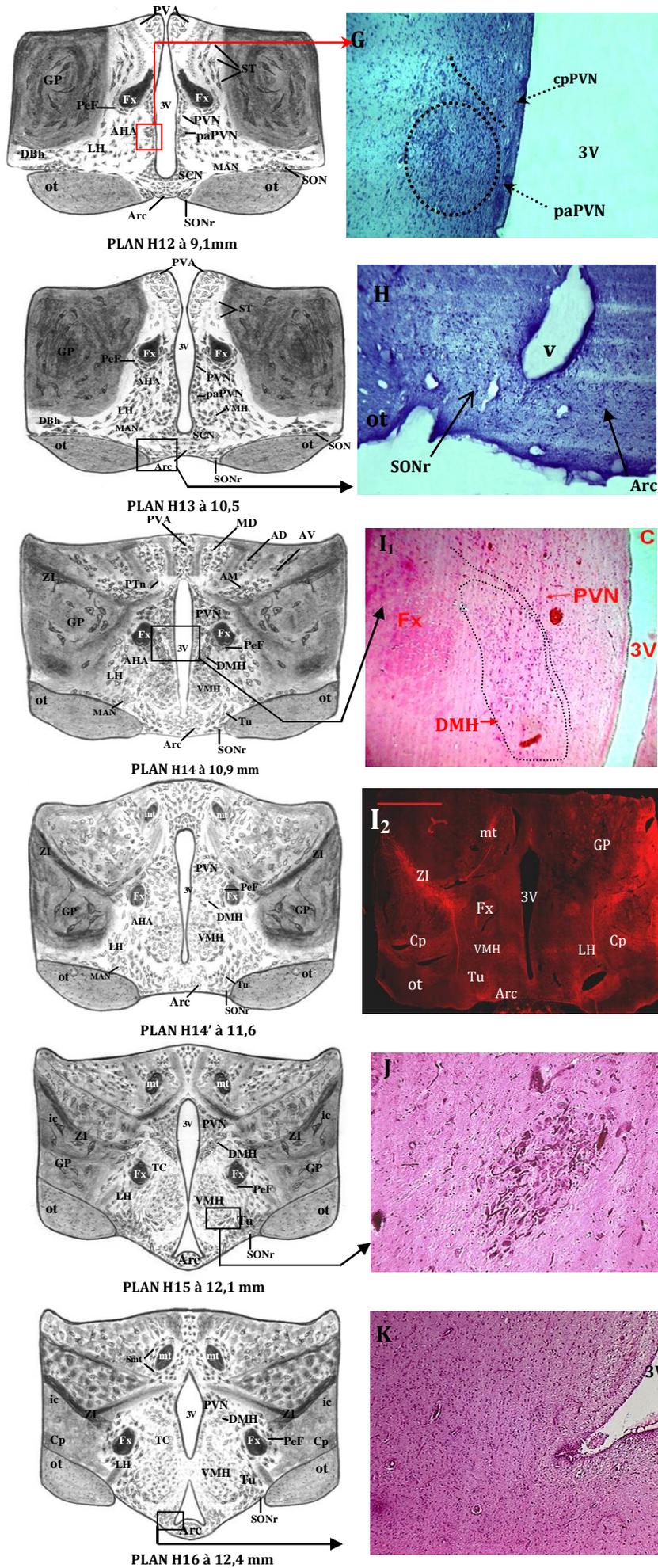
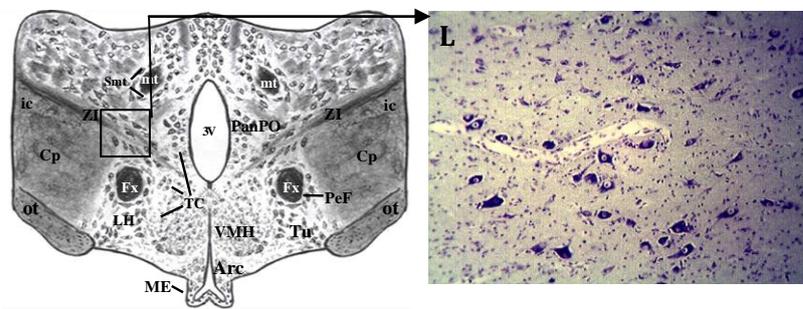
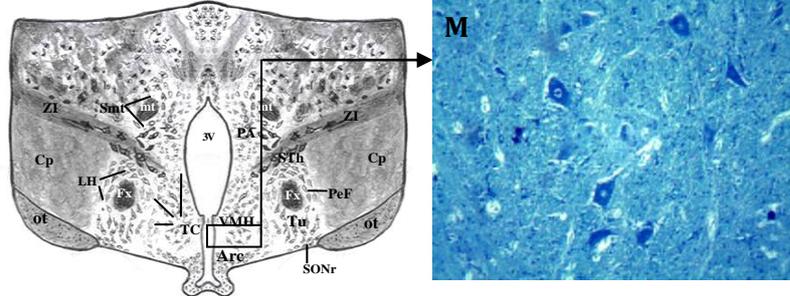


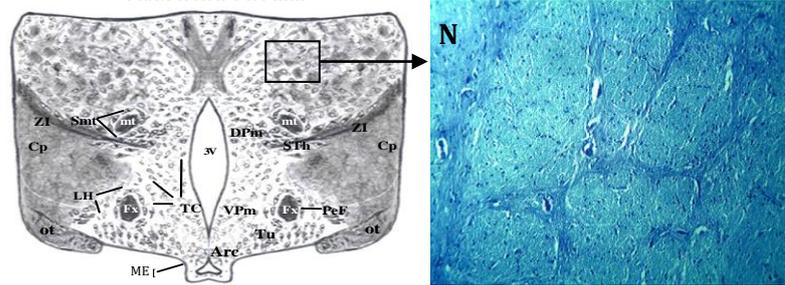
Figure 11 : suite 3



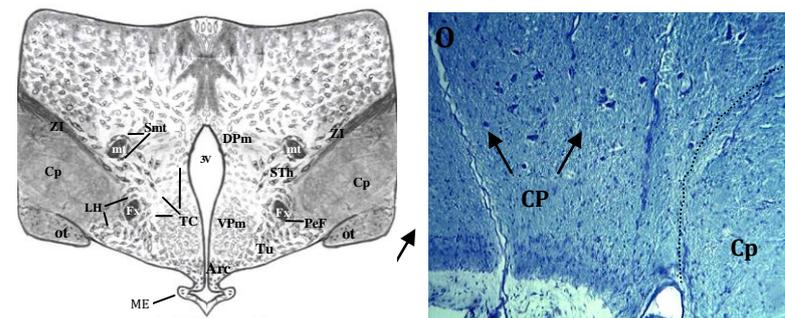
PLAN H17 à 12,7 mm



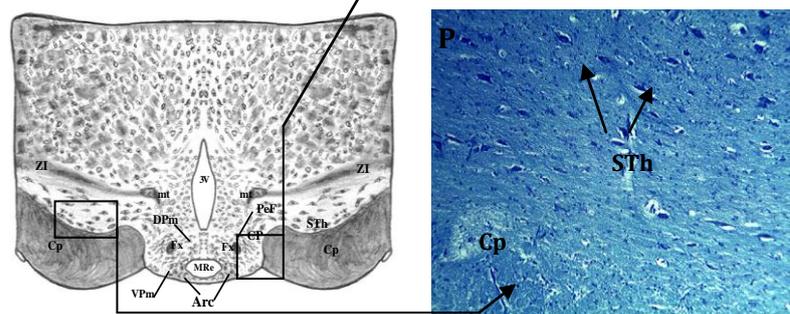
PLAN H18 à 14.4 mm



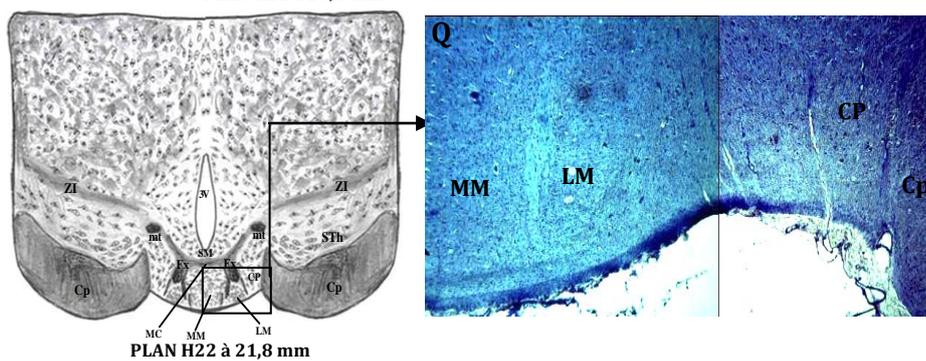
PLAN H19 à 14,5 mm



PLAN H20 à 17,1 mm



PLAN H21 à 20,4 mm



PLAN H22 à 21,8 mm

Figure 11 : Cartographie rostro-caudale des noyaux et aires hypothalamiques du Dromadaire. Les schémas correspondent à une reproduction des observations des coupes frontales au microscope. Ces schémas sont représentés selon le niveau de coupes. Ils commencent par le plan H0 (fusion des nerfs optique) et se terminent par le plan H22 (partie caudale de la région mamillaire). Des photomicrographies, classées de A à Q, sont utilisées pour illustrer certaines structures qui sont représentées sur les schémas.

A1 : Photomicrographie montrant la position parallèle à la bande diagonal de Broca (DB), des neurones formant le noyau du tubercule olfactif (OT) (*H&E*: x4).

A2 : Photomicrographie des îlots de *Calleja* : ICj, située à la limite ventrale du ventricule latéral (LV) (*H&E*: x10).

B1, B2, B3, and B4 : Photomicrographies montrant l'apparition des premiers neurones appartenant au noyau suprachiasmatique rostral (SCNr). (Bleu de toluidine, B1 : x4, B2 : x10, B3 : x40, B4: x100).

C1, C2, D : Photomicrographies du SCN rostral et ses rapports avec le récessus supra-optique (SoR) (crésyl violet. C1 : x4, C2 : x10, D : x4).

E : Photomicrographie du SCN nu (ou intermédiaire, équivalent au SCN des rongeurs) avec sa position et sa forme, habituellement, connue chez les rongeurs. Crésyl violet : x4).

F1, F2 : Photomicrographies de la partie ventro-médiale du SCN nu montrant la constitution cellulaire du noyau et l'existence de quelques magnoneurones (flèches) (bleu de toluidine, F1 : x10, F2 : x40).

G : Photomicrographie du noyau paraventriculaire (PVN) rostral avec sa partie formant la pars accessoire du PVN (paPVN) et la colonne périventriculaire (cpPVN) (bleu de toluidine : x4).

H : Photomicrographie montrant les rapports anatomiques de la partie rétrochiasmatique du noyau supra-optique (SONr) avec le noyau arqué (Arc) (bleu de toluidine : x4).

I1 : Photomicrographie montrant la position intercalée du noyau dorsomédian (DMH), entre le fornix (Fx) et le noyau paraventriculaire (PVN). (*H&E* : x4).

I2 : Immunomarquage (rouge) de la tyrosine hydroxylase montrant certaines structures anatomiques de l'hypothalamus. La photographie correspondant à une reconstitution à partir de 200 images, prises à un grossissement de x10.

J : Photomicrographie des niveaux rostraux du noyau ventromédian (VMHnVL). *H&E* : x16.

K : Photomicrographie du noyau arqué (Arc), montrant sa position juxta-infundibulaire (*H&E* : x4).

L : Photomicrographie du noyau sub-thalamique (STh) avec ses magnoneurones (*Crésyl violet* : x10).

M : Photomicrographie du partie du noyau ventromédian (VMH) dans la partie caudale de l'hypothalamus (*H&E* : x10).

N : Photomicrographie du *Globus pallidus* (GP) surplombant la *zona incerta* (ZI) (bleu de toluidine : x10).

O : Photomicrographie de la subdivision mamillaire, montrant la pars caudale du noyau tubéro-mamillaire (CP). (Bleu de toluidine : x10).

P : Photomicrographie du noyau sub-thalamique (STh) dans la région mamillaire (bleu de toluidine : x10).

Q : Photomicrographie représentant les noyaux mamillaires latéral (LM) et médian (MM), et la pars caudale du noyau tubéro-mamillaire(CP). La photographie est une reconstitution de deux images prises à un grossissement de x10 (bleu de toluidine).

La liste des abréviations utilisées dans les schémas est la suivante :

3V : 3^{ème} ventricule.

Ac : noyau accumbens

ac : commissure antérieure.

AD : noyau antéro-dorsal du thalamus.

AHA : aire hypothalamique antérieure.

AM : noyau antéro-médial du thalamus.

Arc : noyau arqué

AV : noyau antéro-ventral du thalamus.

Cp : pédoncule cérébral.

CP : *Pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire.

cpPVN : colonne périventriculaire du noyau paraventriculaire.

DB : bande diagonale de Broca.
DBh : noyau de la bande diagonale de Broca.
DMH : noyaux dorsomédians.
DPm : noyau prémamillaire dorsal.
Fx : fornix.
GP : *globus pallidus*.
ic : capsule interne.
ICj : Îlots de Calleja.
LH : hypothalamus latéral.
LM : noyau mamillaire latéral.
LPOA : aire préoptique latérale.
LV : ventricule latéral.
MAN : noyau accessoire magnocellulaire de l'hypothalamus latéral.
MC : commissure supra-mamillaire.
MD : noyau médiodorsal du thalamus.
ME : éminence médiane.
MM : noyau mamillaire médian.
MPOA : aire préoptique médiane.
MRe : récessus mamillaire du 3V.
mt : tronc mamillo-thalamique.
ot : tronc optique.
OT : noyau du tubercule olfactif
OVLT : organum vasculosum de la lamina terminalis.
ox : chiasma optique.
PA : aire caudale (Hypothalamic Posterior Area)
PanPO : subdivision caudale (postérieure) du noyau paraventriculaire hypothalamique.
paPVN : partie accessoire du noyau paraventriculaire hypothalamique.
Pea : noyau périvericulaire antérieur.
PeF : noyau périfornical.
Pep : noyau préoptique périvericulaire.
PTn : noyau paratenial du thalamus
PVA : noyau paraventriculaire antérieure thalamique
PVN : noyau paraventriculaire.
SCN : noyau suprachiasmatique.
SH : noyau sépto-hypothalamique ou septal.
SHl : noyau sépto-hypothalamique latéral.
SHm : noyau sépto-hypothalamique médial.
SM : Pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire.
Smt : noyau submamillo-thalamique
SON : noyau supra-optique.
SONr : la partie rétrochiasmatique du noyau supra-optique.
SoR : récessus supra-optique.
ST : noyau de la stria terminalis.
STh : noyau subthalamique.
TC : aire du tuber cinereum.
Tu : noyau tubéral.
V : vaisseau sanguin.
VMH : noyau ventromédian.
VPm : noyau prémamillaire ventrale
ZI : *zona incerta*.

1. Hypothalamus préoptique

L'hypothalamus préoptique est la division la plus rostrale des quatre régions hypothalamiques. Chez le Dromadaire, il est formé par deux aires préoptiques et deux noyaux périventriculaires.

1.1. Description anatomique

1.1.1. Aires préoptiques

La division préoptique est composée de l'aire préoptique médiane (MPOA) et de l'aire préoptique latérale (LPOA). La MPOA est située latéralement au 3V et occupe la région médiane de l'hypothalamus, ventro-médialement aux travées de la capsule interne qui prolongent les ventricules latéraux (Figure 11, plans H0). Plus caudalement, elle se place sous les îlots de *Calleja* (figure 11 : plans H1 et H2). La deuxième aire, qui est latérale (LPOA), est située ventro-médialement au *globus pallidus* et ventro-latéralement à la MPOA (Figure 11 : plans H0, H1, H2). Les neurones dans la LPOA et la MPOA sont diffus au point que la limite avec les noyaux préoptiques est parfois imprécise. Par conséquent, les noyaux préoptiques, médian, latéral et médial, très distincts chez d'autres espèces, sont difficilement reconnaissables par l'histologie classique chez le Dromadaire.

1.1.2. Noyaux préoptiques

Chez le Dromadaire, seuls les deux noyaux, préoptique périventriculaire (Pep) et périventriculaire antérieur (Pea), sont identifiables par histologie classique.

Le Pep correspond à une collection de parvoneurones dont la densité est plus élevée rostralement. Ce noyau apparaît sous forme d'une bande uniforme le long du 3V (Figure 11 : plan H0, H1, H2, H3). Son extension atteint la subdivision antérieure.

Le Pep est situé ventro-médialement au Ac et dorsalement à la MPOA (Figure 11 : plan H0). Il se présente sous forme d'un amas de grands neurones denses de forme ronde. Ses limites anatomiques sont bien circonscrites, sauf pour son extension qui est courte, ce qui suggère que sa limite rostrale est plus antérieure que le plan H0.

1.1.3. Autres Noyaux

Plusieurs noyaux appartenant d'autres structures cérébrales, notamment les noyaux acumens (AC), le noyau septal (ou sept-hypothalamique, SH), le noyau de la bande diagonale de Broca (DB) et le noyau du tubercule olfactif, traversent partiellement la subdivision pré optique et se prolongent jusqu'aux zones limitrophes de la division antérieure (Figure 11 : plan H0 jusqu'au plan H9).

Le Ac est un noyau de forme ovoïde situé dans la région dorsale de l'hypothalamus, médialement au GP et en dessous des prolongements des ventricules latéraux (Figure 11 : Plan H0, H1). Dans la subdivision antérieure, seuls quelques neurones éparpillés de ce noyau persistent sous la corne rostrale de l'ac (Figure 11 : plan H3).

Le SH regroupe deux noyaux, le noyau septal, latéral (SHl) et médial (SHm) (Figure 11, plans H1, H2, H3). Son extension rostro-caudale est très longue, atteignant le plan H9 de l'hypothalamus antérieur.

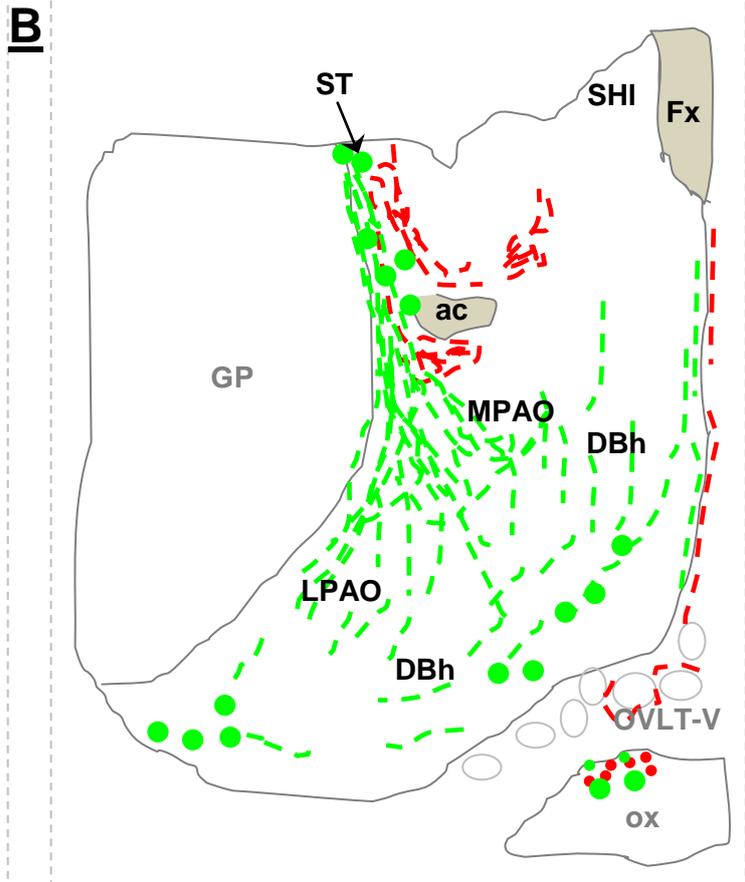
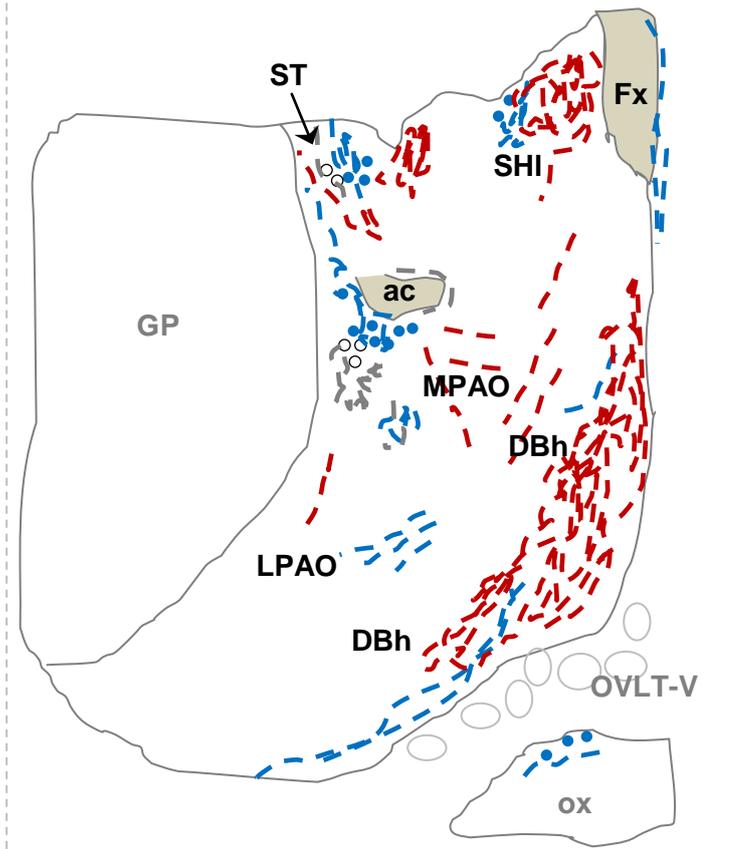
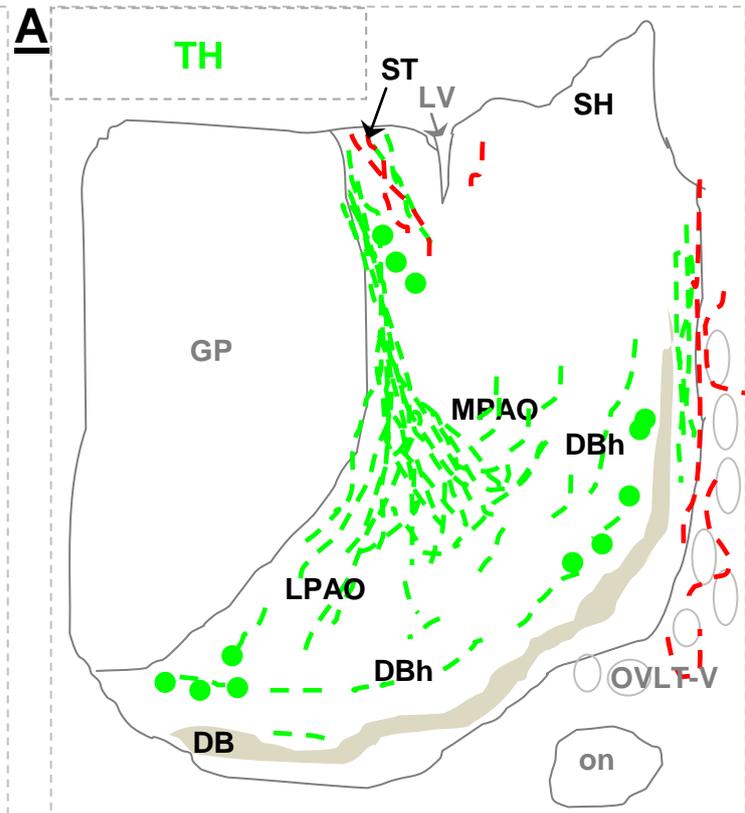
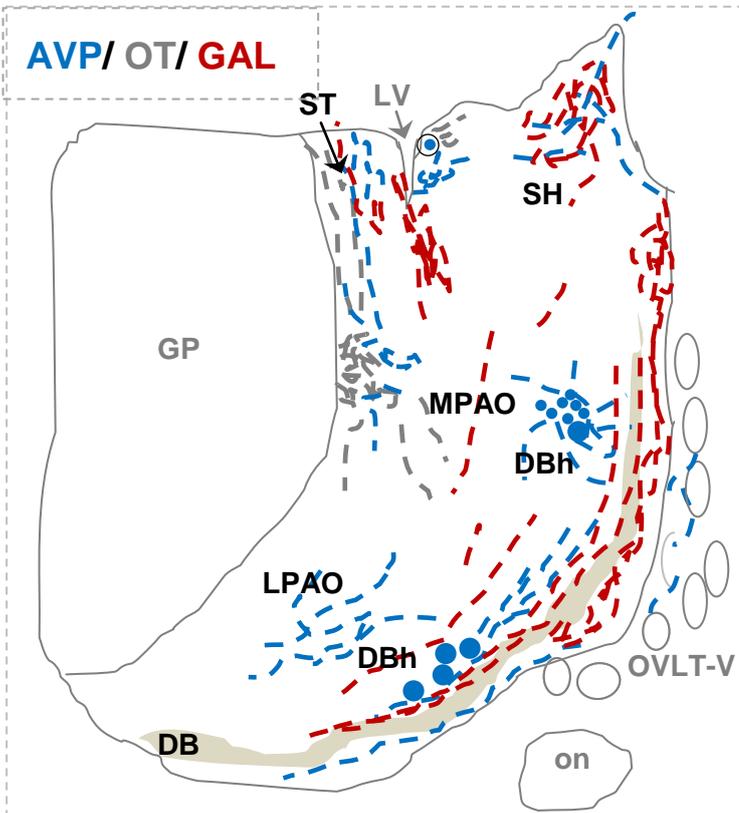
Le DBh est formé de grands magnoneurones diffus le long de la région latérale et ventrolatérale, entre la bande diagonale de Broca (DB) et l'aire préoptique (MPOA et LPOA) (Figure 11 : plan H0, H1, H2). L'extension du DBh est très longue ; sa limite caudale atteint l'hypothalamus antérieur au niveau du plan H12.

Le noyau du tubercule olfactif est formé par de parvoneurones étalés ventralement à la bande diagonale de Broca sous forme de travées en forme sinusale (Figure 11 : plan H0, H1, H2, photomicrographie A1).

1.2. Contenu en neurones peptidergiques

Les noyaux et les aires de l'hypothalamus préoptique ne montrent pas de neurones immunoréactifs à l'enzyme et aux neuropeptides étudiés à l'exception de quelques neurones immunoréactifs à la Met-enk dans la LPOA (Figure 12). Toutefois, les fibres nerveuses sont abondantes. Des fibres très denses à la TH mais surtout à NPY et à la Met-enk ont été observées dans les aires préoptiques latérale et médiale. De même, le noyau préoptique périventriculaire (Pep) montre des fibres denses en GAL (Figure 12).

Les autres noyaux qui délimitent cette région préoptique montrent plusieurs neurones immunoréactifs. Des neurones immunoréactifs à l'AVP, au NPY et à la TH sont présents dans le noyau de la bande diagonale de Broca. De même, les noyaux septal et de la stria terminalis montrent une densité élevée de neurones à NPY et à Met-enk et quelques neurones à AVP et OT (Figure 12).



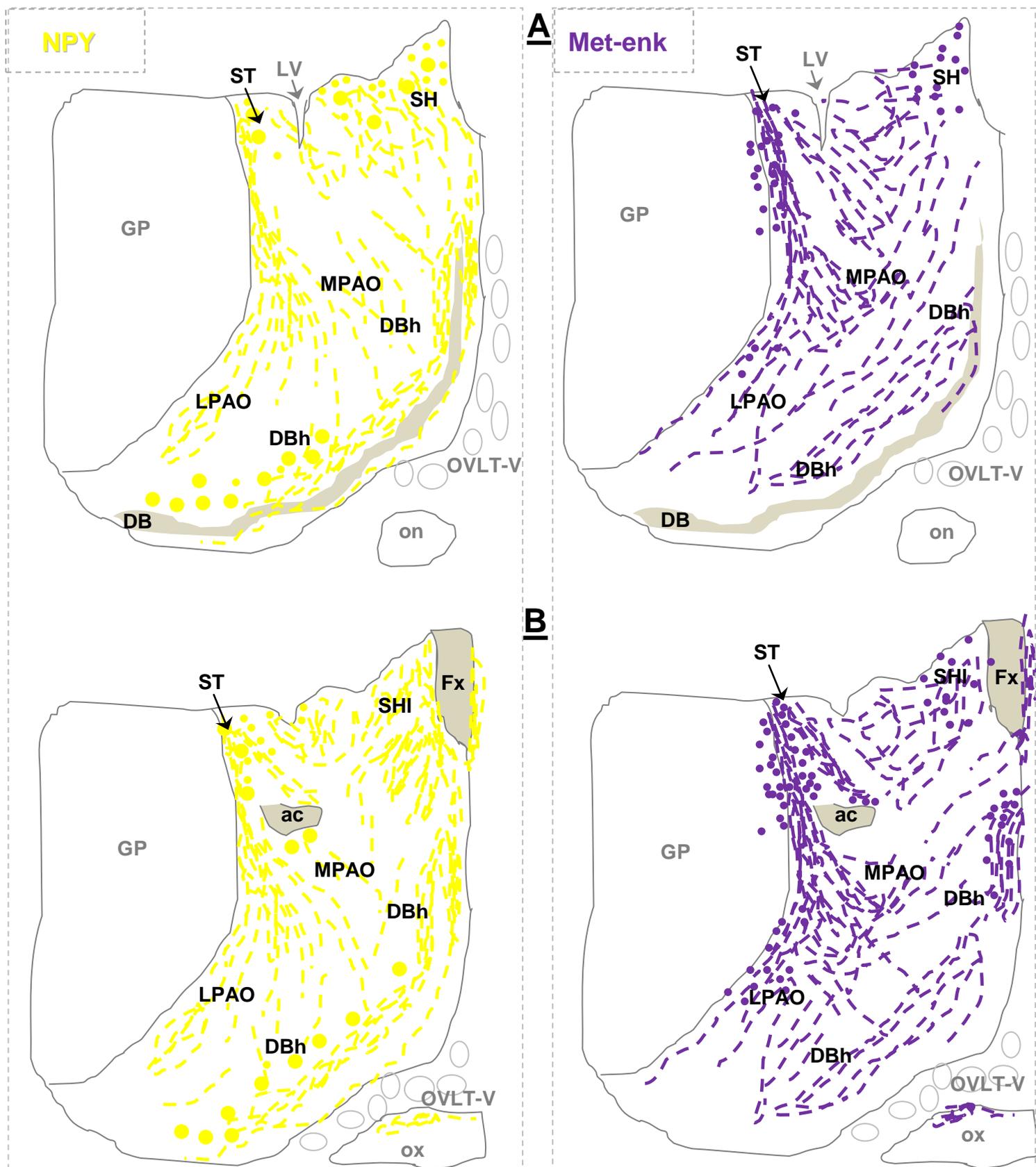


Figure 12 : Schéma synthétisant la distribution de l'enzyme TH et des neuropeptides étudiés dans l'hypothalamus préoptique du Dromadaire. Cette région est représentée par deux schémas de coupes frontales, correspondant à une partie rostrale (A) et caudale (B). Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères ● : AVP ○ : OT ● : TH ● : NPY ● : Met-enk . Les fibres sont représentées par des traits de mêmes couleurs. **ac** : commissure antérieure, **DB** : bande diagonale de Broca, **DBh** : noyau de la bande diagonale, **Fx** : fornix, **GP** : globus pallidus, **LPAO** : aire préoptique latérale, **LV** : ventricule latérale, **MPOA** : aire préoptique médiane, **on** : nerf optique, **ox** : chiasma optique, **OVLT-V** : partie ventrale de l'organum vasculosum de la lamina terminalis, **SH** : noyau sépto-hypothalamique, **SHI** : noyau sépto-hypothalamique latéral, **ST** : noyau de la stria terminalis.

2. Hypothalamus antérieur

Il comporte l'aire hypothalamique antérieure (AHA), l'aire hypothalamique latérale (LH), les noyaux suprachiasmatiques, les noyaux supra-optiques et les noyaux paraventriculaires.

2.1. Noyaux suprachiasmatiques

2.1.1. Description anatomique

Chez le Dromadaire, le noyau suprachiasmatique (SCN) est une structure très longue qui s'étend sur 9.55 mm. Il est subdivisé en 3 parties, le SCN rostral, le SCN nu, le SCN rétrochiasmatique :

Les neurones **du SCN rostral** apparaissent immédiatement après la fusion des nerfs optiques sous forme d'une collection de parvoneurones, en dehors de l'hypothalamus, collée sur la face dorsale du chiasma optique (Ox) (Figure 11 : Plan H2, photomicrographies B1, B2, B3 et B4, figure 13 et figure 14). Plus caudalement, le SCN rostral forme deux tubercules qui font saillie dans le récessus supra-optique (SoR) (Figure 11 : photomicrographie D, plan H6, H7 ; figure 13, 14, 15, 16, 20 et 21). Dans chaque tubercule, les neurones les plus dorsaux du SCN sont en rapport anatomique avec l'*organum vasculosum* de la *lamina terminalis* (OVLt) ventral qui est lui-même contenu dans le SoR. Ce dernier est délimité dorso-latéralement par deux prolongements de l'hypothalamus qui suspendent le chiasma optique (voir Figure 11 : photomicrographies C1, C2, plan H3, H4, H5, H6, H7 ; figure 13, figure 16 et 24). En progressant caudalement, il apparaît que les neurones des deux tubercules du SCN occupent la partie dorso-latérale des deux prolongements (à 4,8 mm par rapport au plan de référence H0) (Figure 11, figure 13). Le SoR se comprime latéralement et s'allonge verticalement en forme triangulaire. Sur ces niveaux de coupes, les neurones du SCN contournent le SoR avec une faible densité à sa base (Figure 11, plan H4 et H5, figure 13). A ce stade, le SCN est en rapport dorsalement avec l'aire hypothalamique antérieure (AHA) et latéro-ventralement avec les premiers neurones du SON (Figure 11 : plan H6).

Le **SCN nu**, caractérisé par sa situation et sa forme habituelle connue chez les rongeurs, apparaît caudalement après la fusion du chiasma optique avec l'hypothalamus et la disparition du SoR (Figure 11 : plan H9, figure 13 ; figure 14). En effet, le chiasma optique se rapproche progressivement de l'hypothalamus en montrant une dépression dans sa partie ventro-médiane et en s'élargissant parallèlement au plancher de celui-ci ; ce qui entraîne une élévation progressive du SCN rostral, sa fusion avec l'hypothalamus et l'apparition du SCN nu (Figure 13). Les deux

SCN nus, gauche et droit, ont une forme de triangle dont les bases ventrales se continuent entre elles par une rangée de neurones situés au dessous du plancher du 3V. Ces neurones de la base ventrale s'étendent latéralement pour former la pointe ventrolatérale de chaque SCN (Figure 11 : photomicrographie E, plan 9 et 10 ; figure 13).

Le **SCN rétrochiasmatique** apparaît après l'effacement du chiasma optique et la formation des deux troncs optiques (ot). Cette apparition se fait dans l'aire rétrochiasmatique. Sur ces niveaux de coupes, les neurones du SCN occupent la région périventriculaire (Figure 11 : plan H11, H12 et H13, figure 13). Cette étendue rétrochiasmatique a été confirmée par des coupes sagittales et para-sagittales, comme le montre la figure 14.

Le SCN est constitué par des parvoneurones (Figure 11 : photomicrographies B3, B4, B1 et F2) qui sont les plus petits de l'hypothalamus. Toutefois, nous avons relevé l'existence de quelques magnoneurones (Figure 11 : photomicrographies F1, F2 ; figure 15 ; figure 17 ; figure 18D). Dans le SCN rostral, ces magnoneurones constituent un tapis cellulaire séparant le chiasma optique de la population dense parvocellulaire, située dorsalement. Dans le SCN nu, les magnoneurones gardent une disposition ventrale et ventrolatérale alors que le SCN rétrochiasmatique est constitué uniquement de parvoneurones.

2.1.2. Contenu en neuropeptides

Une forte densité de neurones immunoréactifs à l'enzyme TH a été observée dans le SCN du Dromadaire. **D'abord, dans le SCN rostral**, les neurones à TH existent au niveau des deux tubercules et du prolongement hypothalamique du noyau. Dans le tubercule du SCN, ils se divisent en 2 catégories, une population de parvoneurones dorsaux juxtaposée au SoR et aux vaisseaux de l'OVL et, une autre population ventrale de magnoneurones avec de longs prolongements, située juste au-dessus du chiasma optique (Figures, 15, 16, 20, 21 et 26). Cette répartition ventrale pour les magnoneurones et dorsale pour les parvoneurones est retrouvée également **dans le SCN nu**. A ce niveau, la population des parvoneurones à TH occupe le corps du SCN ; elle est plus dense et reçoit des fibres provenant de la population des magnoneurones à TH, située ventralement (figure 17, 18 et 26). Ces magnoneurones envoient également des fibres projetant sur une population située dorso-latéralement, immunoréactive à la vasoactif intestinal peptide (VIP). Plus caudalement, **au niveau du SCN rétrochiasmatique**, seuls les parvoneurones à TH subsistent ; ils sont moins nombreux et périventriculaires (Figure 19, figure 26).

Des neurones immunoréactifs à OT ont été observés dans le SCN du Dromadaire. Ils sont exclusivement de type parvoneurones. Dans le SCN rostral,

aucune immunoréactivité à OT n'a été relevée. Toutefois, dans le SCN nu, ces neurones à OT ont été observés soit éparpillés sur toute la surface du corps du noyau soit formant un amas occupant une position excentrique latérale ou ventrolatérale (Figure 22, figure 26). Le nombre des neurones à OT n'est pas aussi important que celui de la population des neurones à TH. A ce niveau, les neurones à OT et ceux à TH coexistent mais sans aucune co-localisation. Sur des niveaux caudaux, nous avons constaté l'absence de marquage OT-ergique dans le SCN rétrochiasmatique.

La distribution des autres neuropeptides étudiés est différente. Les neurones immunoréactifs à AVP sont des parvoneurones localisés à la limite dorsale dans le SCN rostral (Figure 21 et 26) et en rapports anatomiques avec les vaisseaux de l'OVLT. Dans le SCN nu, l'AVP apparaît au début sous forme d'une population proche de la région périventriculaire ventrale et surplombant les magnoneurones ventraux à TH. En se dirigeant caudalement, les neurones à AVP sont d'abord éparpillés dans le SCN. Ils occupent le corps du noyau (Figure 23 et 26). Ensuite, ils remontent dorsalement vers le haut et occupent une position circonscrite dorso-médiane au sommet du triangle formé par le noyau. Dans le SCN rétrochiasmatique, de très rares neurones à AVP subsistent. Par ailleurs, les essais de double immunomarquage montrent que l'AVP ne co-localise pas avec la TH (Figure 21 et 23). De même, les deux populations de neurones à AVP et à OT dans le SCN semblent être exclusives, mais on peut trouver quelques neurones où les deux neuropeptides sont co-exprimés.

Des parvoneurones immunoréactifs au VIP existent dans le SCN du Dromadaire. Dans le SCN rostral, les parvoneurones à VIP sont dorsaux et envoient des fibres vers les vaisseaux de l'OVLT (Figure 20 et 24). Sur ces niveaux du SCN rostral, les parvoneurones à VIP sont plus nombreux que ceux à TH et à AVP. Certains co-localisent la TH et le VIP (Figure 20). Dans le SON nu, les parvoneurones à VIP forment une population occupant la position ventrale du corps du noyau (Figure 25 : microphotographie A, B et C ; figure 26). À ce niveau de coupes, ces neurones à VIP coexistent avec ceux à AVP occupant le sommet du noyau ainsi qu'avec les neurones à TH et quelques rares neurones latéraux à OT (Figure 26).

Les observations montrent également l'existence de magnoneurones ventraux à Met-enk situés ventralement dans le SCN rostral et formant un tapis cellulaire à la base ventrale du SCN nu. Toutefois, le nombre de ces neurones est faible et reste insignifiant par rapport à la densité des neurones contenant la TH ou les autres neuropeptides (Figure 26).

Les fibres issues des neurones immunoréactifs à VIP dans le SCN nu constituent un réseau dense traversant la population AVP-ergique et remontent

dorsalement et s'écartent progressivement du 3V en s'inclinant vers le DMH et en contournant le fornix (Figure 25A, figure 26). Ces fibres remontent vers les structures nerveuses dorsales probablement sub-thalamiques. D'autres fibres provenant de ces neurones à VIP se dirigent vers le PVN et vers le SON controlatéral (Figure 25 : D et E). Dans le SCN rétrochiasmatique les neurones à VIP sont absents, seules quelques fibres subsistent en plus des fibres supra-ependymaires le long du 3V (Figure 19 et 26)

Nous avons observé également des fibres AVP-ergiques reliant le SCN avec le SON. La grande connexion des fibres AVP du SCN semble se faire avec le SON mais surtout avec le PVN via des fibres le long de la bordure périventriculaire.

Des fibres immunoréactives à la sérotonine (5-HT) ont été observées descendant à partir de structures sus-hypothalamiques, en empruntant la bordure périventriculaire et se terminant dans le SCN, particulièrement le SCN nu (Figure 26). Des fibres à GAL ont été également observées dans les 3 parties du SCN (figure 26). Dans ce noyau, les fibres immunoréactives à Neuropeptide Y (NPY) sont plus abondantes que celles à 5-HT. Enfin, celles à la Méthionine-enképhaline (Méth-enk) sont extrêmement denses. Elles présentent des varicosités et se terminent dans le noyau (Figure 26).

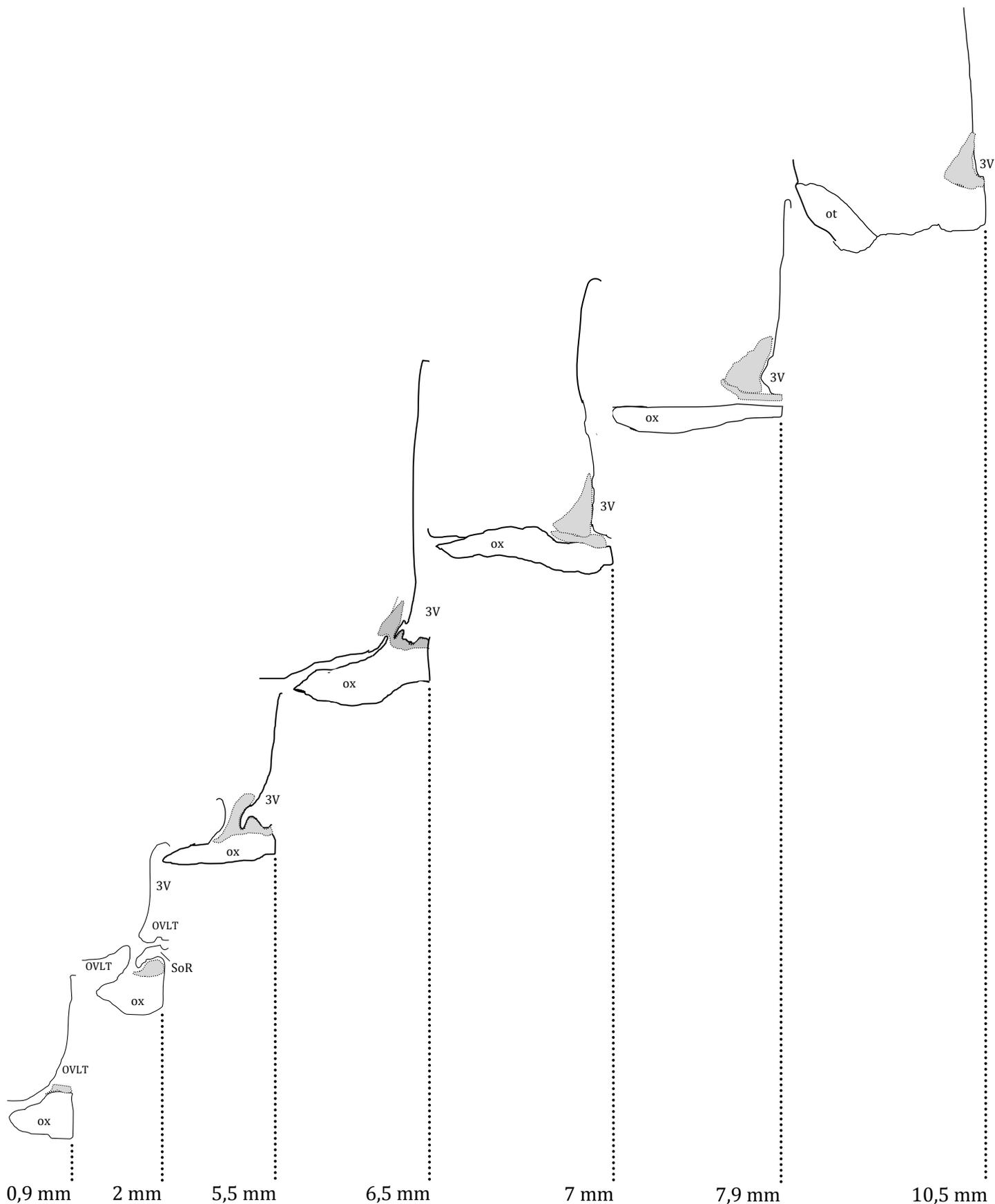


Figure 13 : Représentation schématique de l'évolution rostro-caudale du noyau supra-chiasmatique chez le Dromadaire. Chez cet animal, le SCN est très long. Il est divisé en 3 parties : le SCN rostral, le SCN nu, le SCN rétrochiasmatique. Le SCN rostral, correspond à une population de parvoneurones situé en dehors de l'hypothalamus et au dessus du chiasma optique. Ce dernier s'allonge latéralement et s'élève dorsalement et le SCN rostral fusionne ainsi avec l'hypothalamus pour former le SCN nu. Celui-ci est de forme triangulaire avec une base large se prolongeant sous le 3^{ème} ventricule (3V). Après la disparition du chiasma optique et l'apparition des troncs optiques, le SCN nu garde sa position périventriculaire mais devient le SCN rétrochiasmatique. **3V** : 3^{ème} ventricule, **ot** : tronc optique, **OVLT** : organum vasculosum de la lamina terminalis, **ox** : chiasma optique, **SoR** : récessus supra-optique.

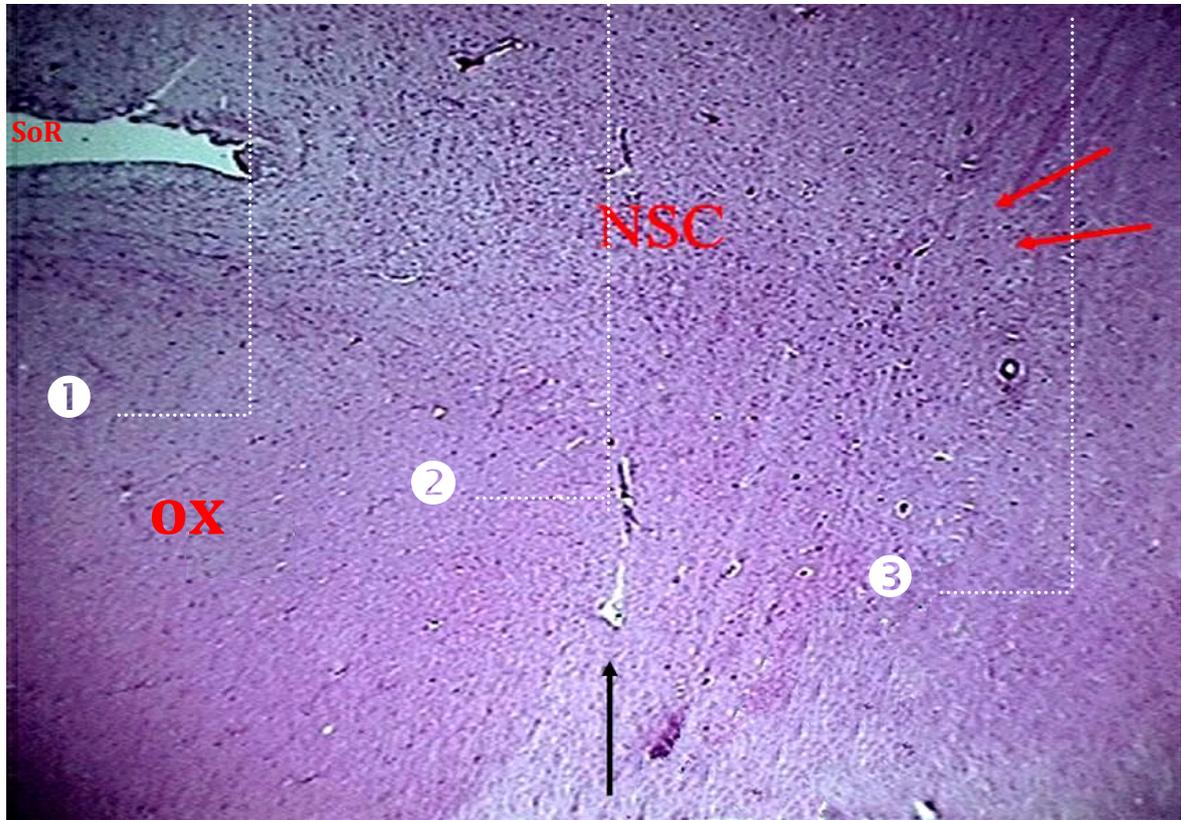


Figure 14 : Photomicrographie d'une coupe sagittale de l'hypothalamus du Dromadaire, montrant les trois parties du SCN (❶ : SCN rostral, ❷ : SCN nu, ❸ : SCN rétrochiasmatique) et montrant également l'extension caudal du noyau, au delà du chiasma optique. La flèche noire montre la terminaison caudale du chiasma optique et les flèches rouges la limite caudale du noyau. (H&E : x4). Ox : chiasma optique, SoR : récessus supra-optique, l'abréviation 'NSC' dans cette image désigne le noyau suprachiasmatique.

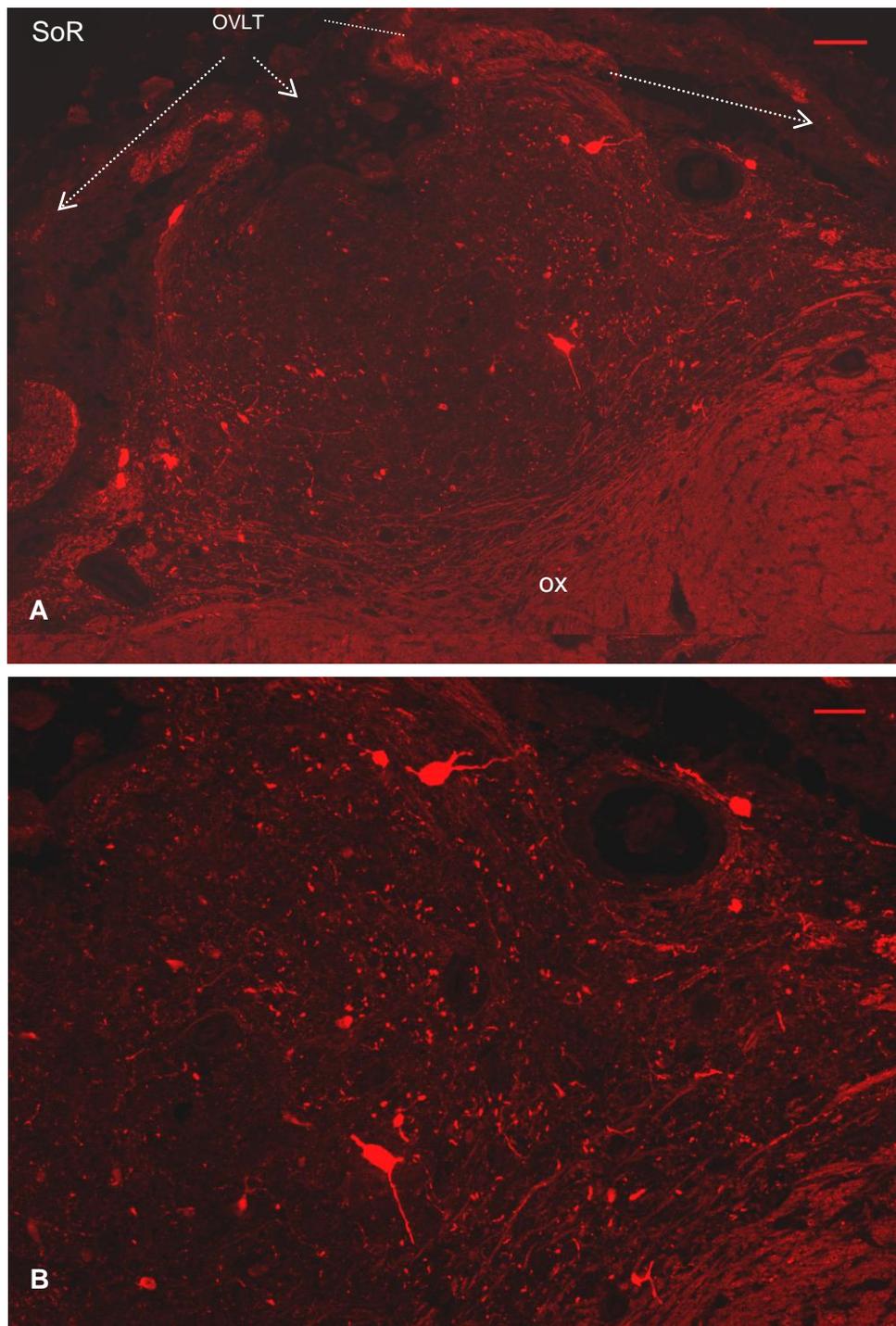


Figure 15 : Photomicrographies du SCN rostral après une immunofluorescence rouge à la TH. La figure montre le niveau du tubercule du SCN rostral, situé dorsalement au chiasma optique (ox) et ses rapports anatomiques avec le récessus supra-optique (SoR) et les vaisseaux de l'organum vasculosum de la lamina terminalis (OVLT). Le niveau de coupe correspond au plan H2 de la figure 11. À noter l'existence de magnoneurones à TH. Vue A : grossissement x5, la barre rouge correspond à 100 μ m. Vue B : grossissement x10, la barre rouge correspond à 50 μ m. **OVLT** : organum vasculosum de la lamina terminalis, **ox** : chiasma optique, **SoR** : récessus supra-optique.

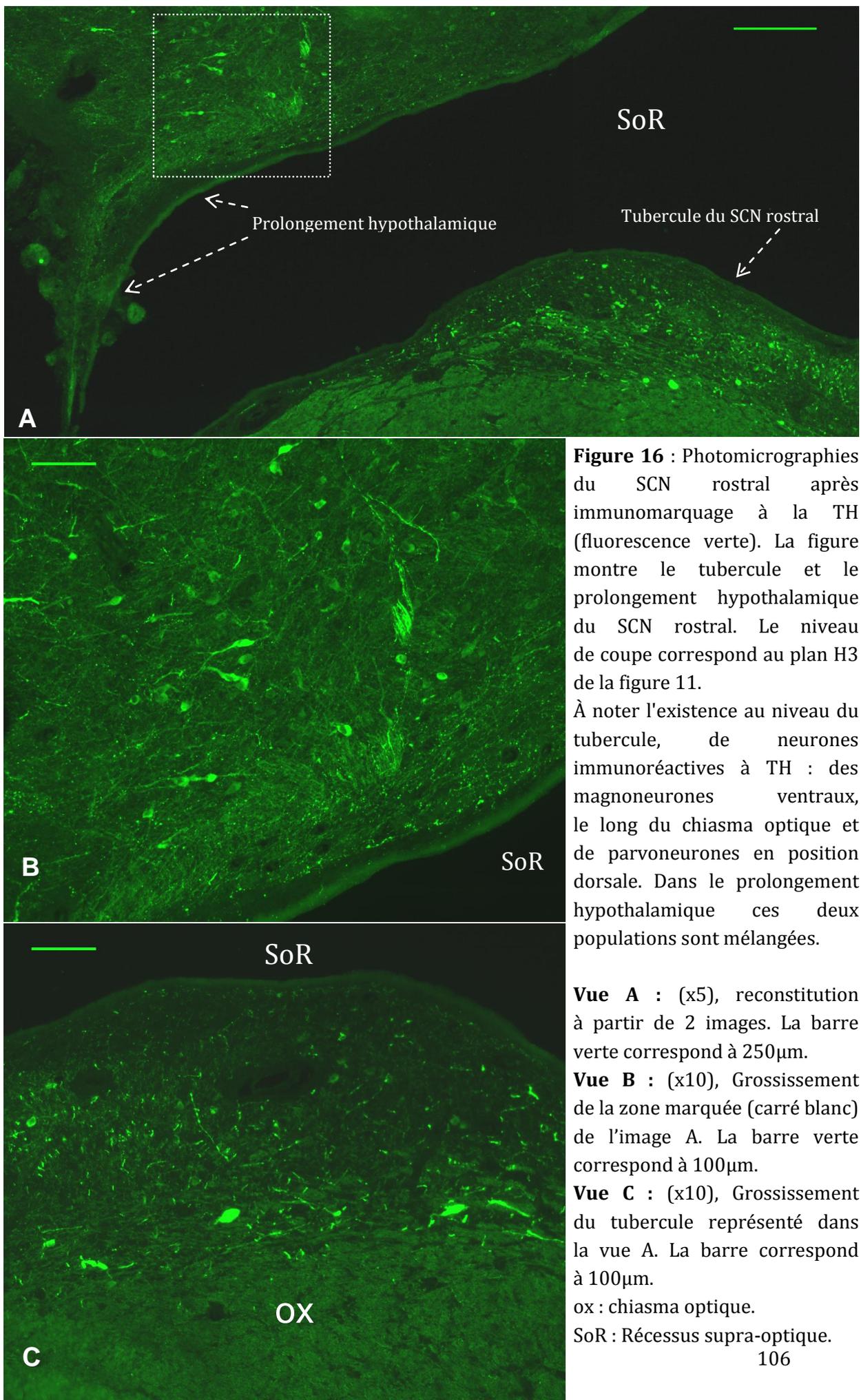


Figure 16 : Photomicrographies du SCN rostral après immunomarquage à la TH (fluorescence verte). La figure montre le tubercule et le prolongement hypothalamique du SCN rostral. Le niveau de coupe correspond au plan H3 de la figure 11.

À noter l'existence au niveau du tubercule, de neurones immunoréactives à TH : des magnoneurones ventraux, le long du chiasma optique et de parvoneurones en position dorsale. Dans le prolongement hypothalamique ces deux populations sont mélangées.

Vue A : (x5), reconstitution à partir de 2 images. La barre verte correspond à 250µm.

Vue B : (x10), Grossissement de la zone marquée (carré blanc) de l'image A. La barre verte correspond à 100µm.

Vue C : (x10), Grossissement du tubercule représenté dans la vue A. La barre correspond à 100µm.

ox : chiasma optique.

SoR : Récessus supra-optique.

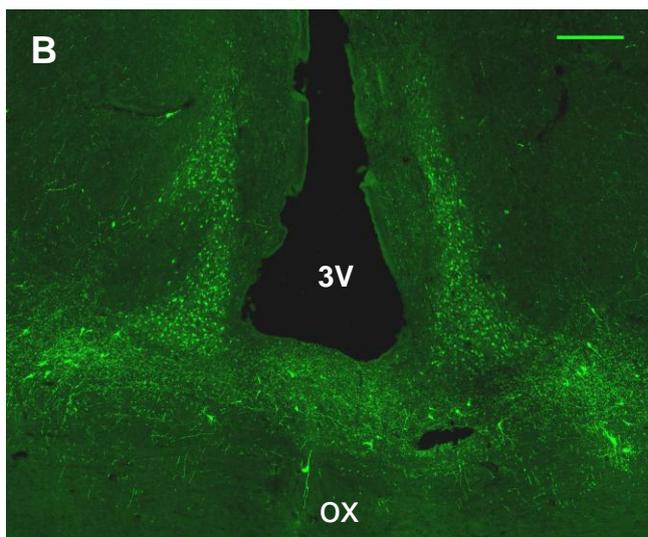
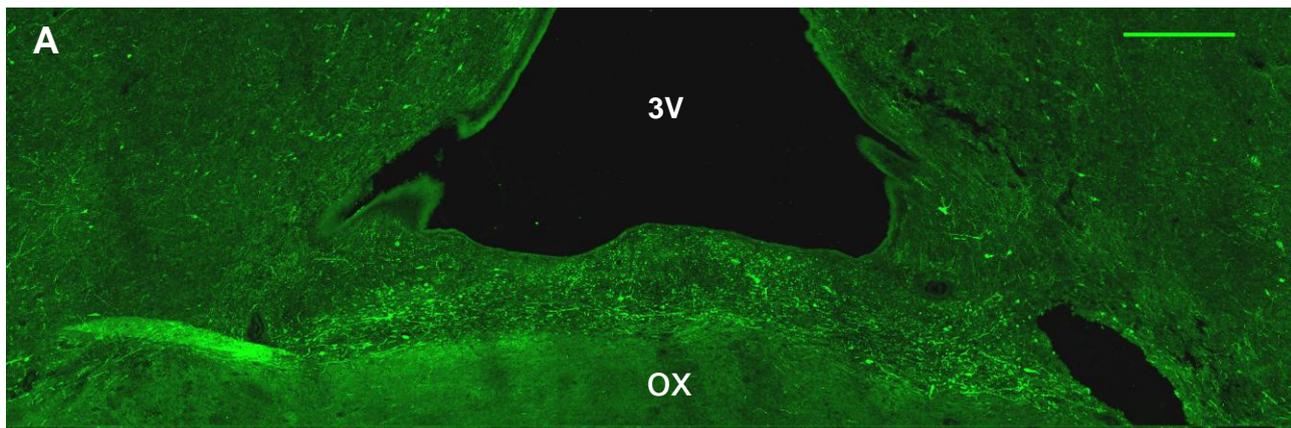
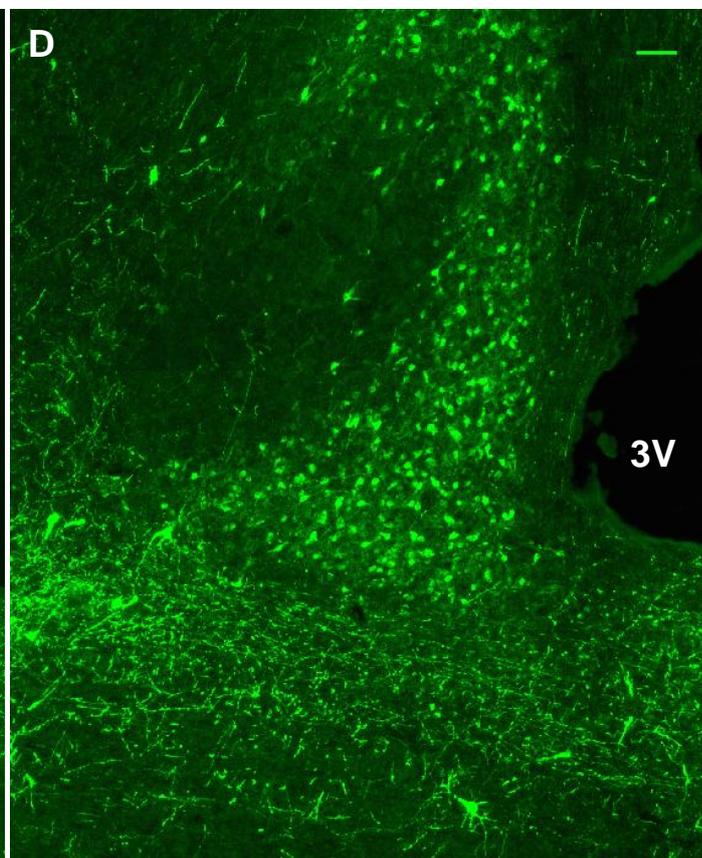
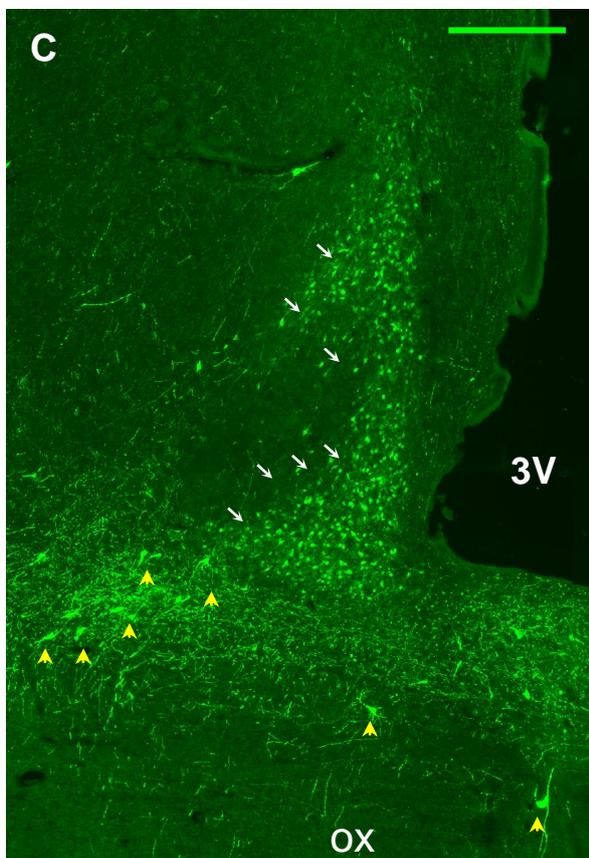


Figure 17 : Photomicrographies des SCN après marquage de la TH (fluorescence verte). La vue A correspond au début de la fusion du SCN rostral avec l'hypothalamus et le début du SCN nu (stade 4 de la figure 13). Les vues, B, C et D correspondent au niveau de coupe du plan H9 de la figure 11. À noter l'existence de 2 populations de neurones à TH : des magnoneurones (têtes de flèches jaunes) en position ventrale et ventro-latérale et des parvoneurones (flèches blanches) occupant le corps du noyau. **Vue A** : (x10) reconstitution à partir de 32 photomicrographies. La barre verte correspond à 500µm. **Vue B** : (x5) reconstitution à partir de 16 photomicrographies. La barre verte correspond à 500µm. **Vue C** : grossissement de la figure B, La barre verte correspond à 500µm. **Vue D** : grossissement de la figure B, La barre verte correspond à 100µm. ox : chiasma optique, 3V : 3^{ème} ventricule.



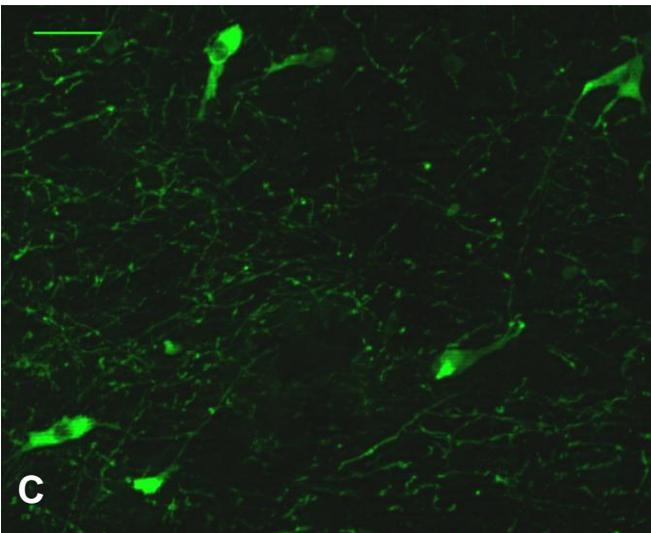
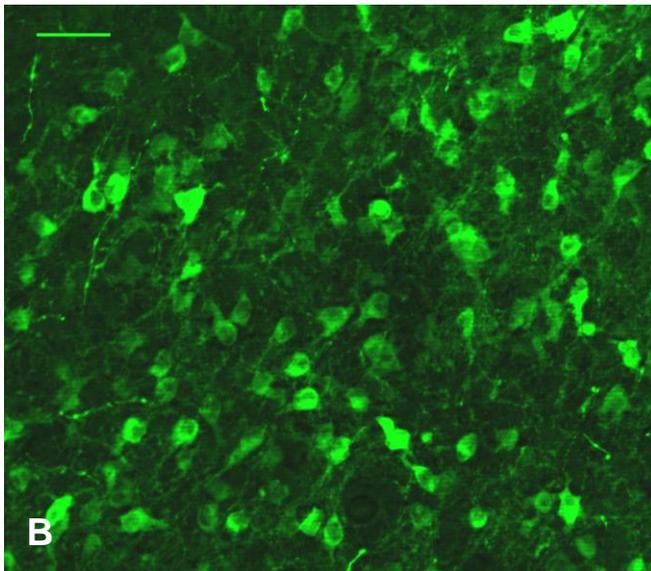
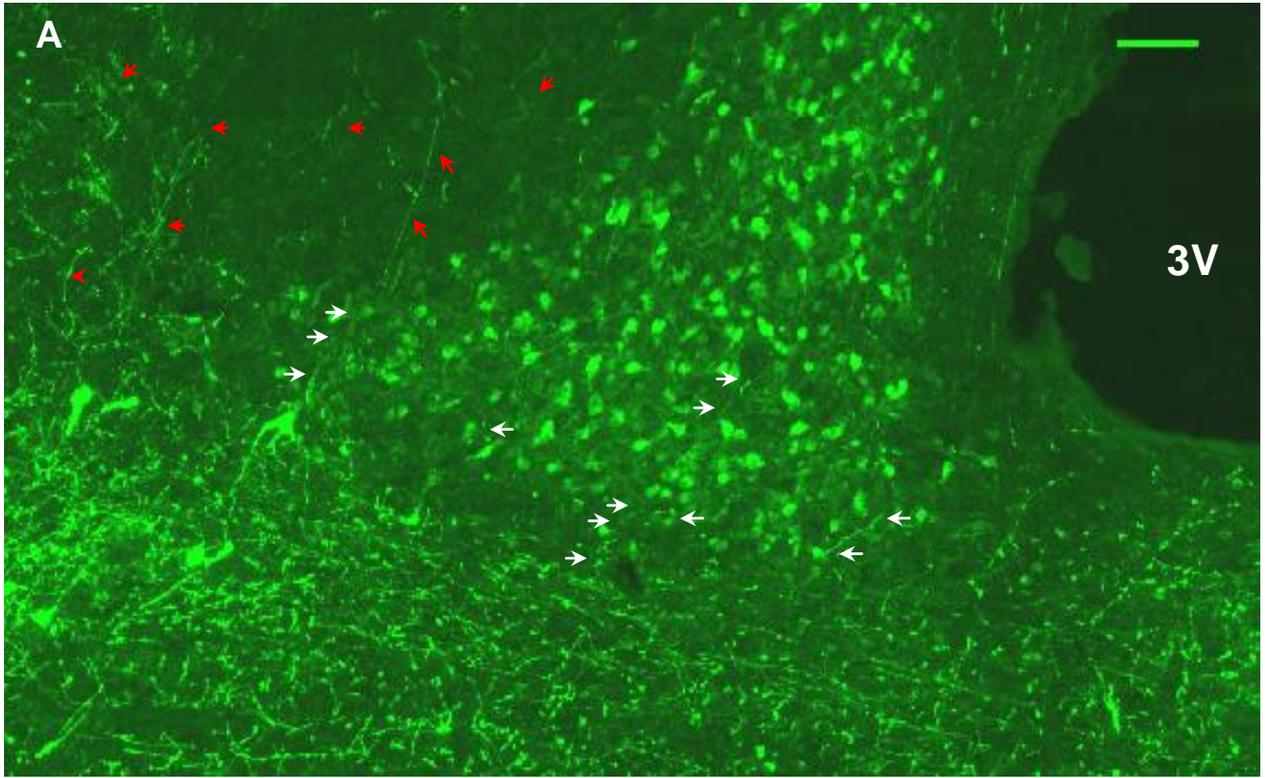


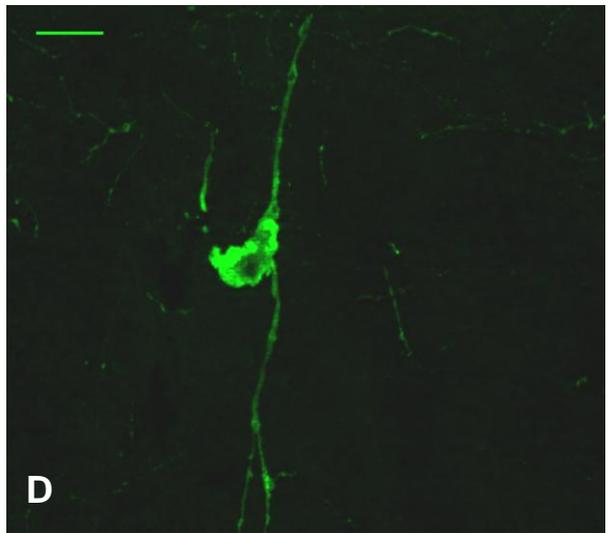
Figure 18 : Photomicrographies montrant les 2 populations de neurones à TH identifiées dans le SCN nu. À noter l'existence de fibres partant des magnoneurones vers la population des parvoneurones (Flèches blanches) et des fibres allant vers la zone non marquée du corps du SCN (Flèches rouges).

Vue A : grossissement sur la vue D de la figure 17. La barre verte correspond à 100µm.

Vue B : population des parvoneurones à TH (x20), La barre verte correspond à 50µm.

Vue C : population des magnoneurones à TH (x20). La barre verte correspond à 50µm.

Vue D : un magnoneurone envoyant une fibre dorsalement vers le corps du SCN et une autre ventralement (x20). La barre verte correspond à 50µm. 3V : 3ème ventricule.



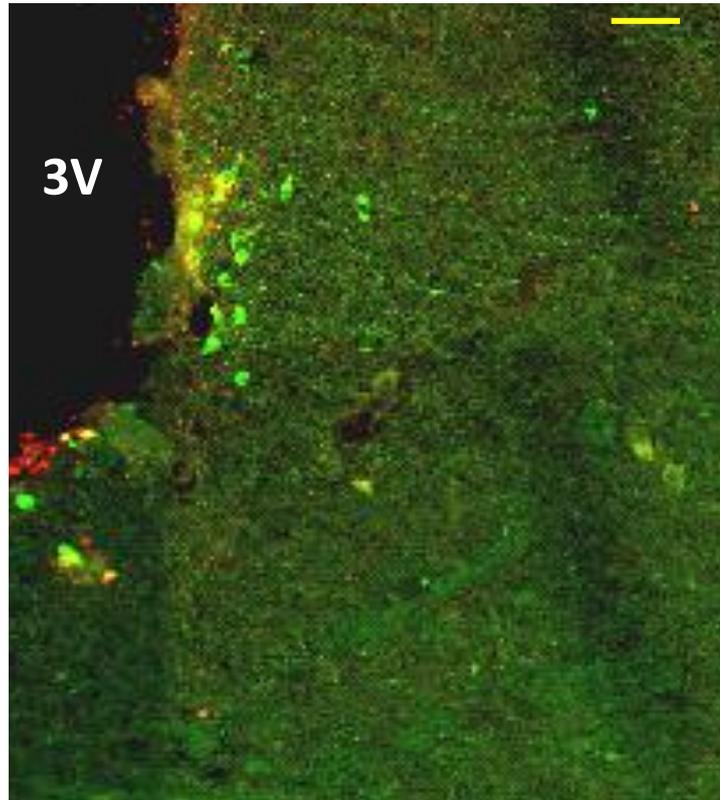


Figure 19 : Photomicrographie du SCN rétrochiasmatique après marquage de la TH (fluorescence verte) et du VIP (fluorescence rouge). La coupe correspond à un niveau intermédiaire entre les plans 13 et 14 de la figure 11. La photomicrographie est un agrandissement, effectué sur une reconstitution de 16 images d'un grossissement de x10. La barre jaune correspond à 125 μ m. Sur ces niveaux de coupes, les neurones à TH sont moins denses et périventriculaires alors que ceux à VIP sont absents. Seules quelques fibres à VIP subsistent. 3V : 3ème ventricule.

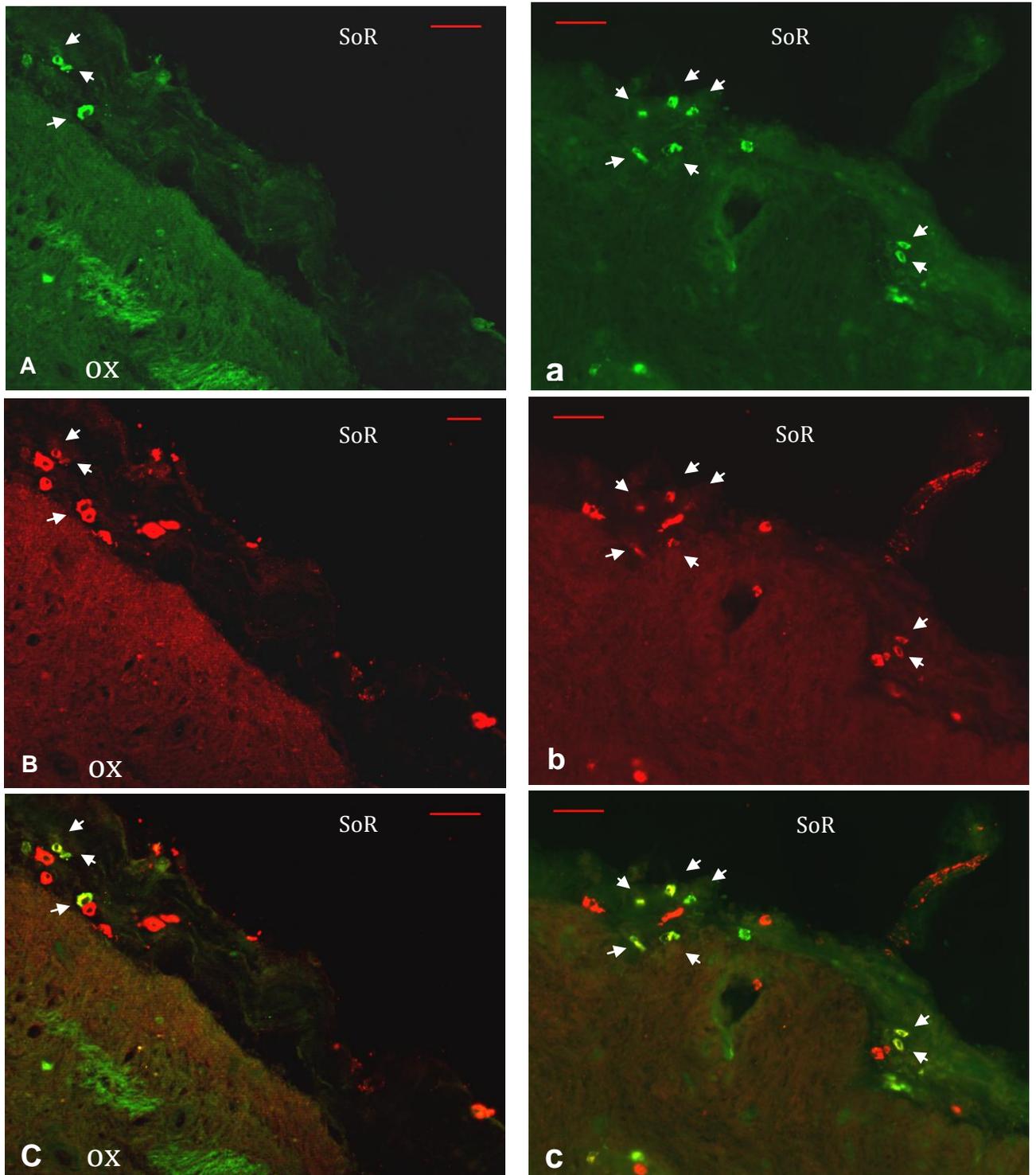


Figure 20 : Photomicrographies des parvoneurones du SCN rostral après un double -marquage de la TH (Vert) et du VIP (rouge). Le niveau de coupe correspond au plan H2 de la figure 11. La Figure représente deux parties différentes du SCN rostral : le 1^{er} correspond aux éléments A, B, C et le 2^{ème} endroit correspond aux éléments a, b, c. Les photomicrographies ont été prises pour la fluorescence verte (Images A et a) ensuite pour la fluorescence rouge (Images B et b) et après les deux ont été superposées (Images C et c). Le grossissement est de x40 et les barres rouges correspondent à 50µm. À noter l'existence à ce niveau d'une co-localisation (flèches) de la TH et du VIP dans certains neurones. Des fibres à VIP provenant du SCN rostral se dirigent dorsalement vers les vaisseaux de l'OVLt, ox : chiasma optique, SoR : Récessus supra-optique.

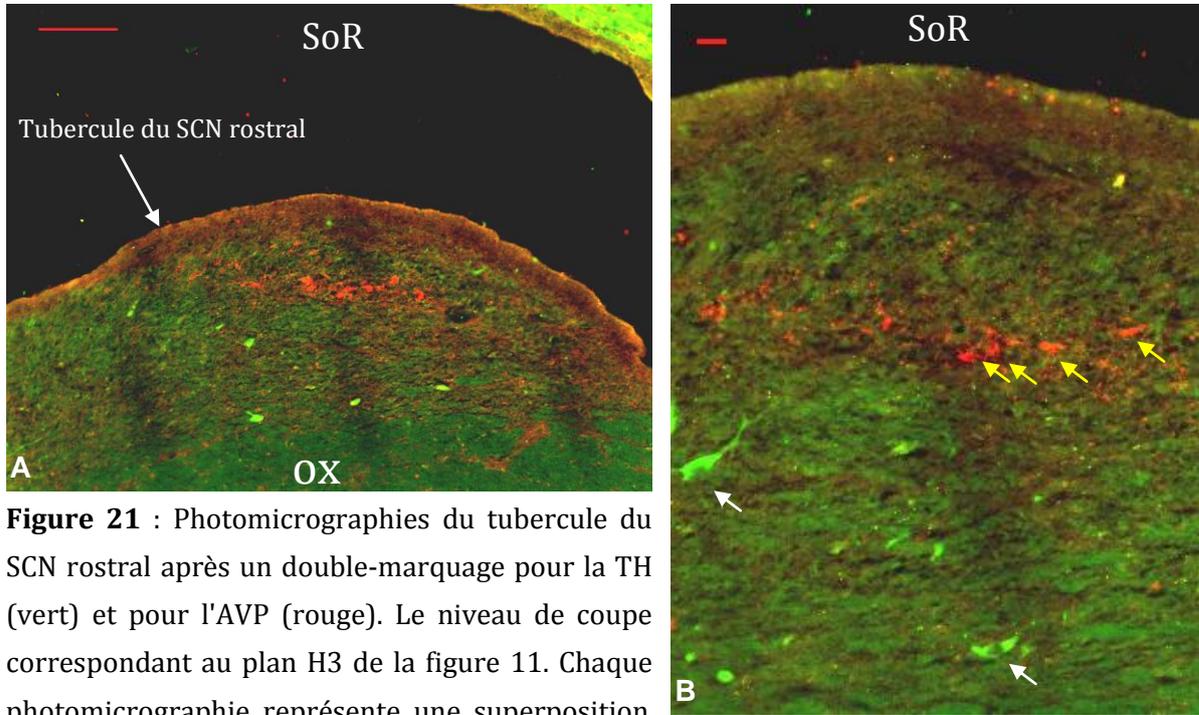


Figure 21 : Photomicrographies du tubercule du SCN rostral après un double-marquage pour la TH (vert) et pour l'AVP (rouge). Le niveau de coupe correspondant au plan H3 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. À noter qu'aucune co-localisation du neuropeptide et de l'enzyme n'a été observée. À noter également la taille des magnoneurones à TH (flèches blanches), situés ventralement aux parvoneurones à AVP (flèches rouges). **Vue A** : reconstitution à partir de 9 images prises à un grossissement de x20. La barre rouge correspond à 200 μ m. **Vue B** : reconstitution à partir de 4 images prises à x20. La barre rouge correspond à 20 μ m. ox : chiasma optique, SoR : Recessus supra-optique.

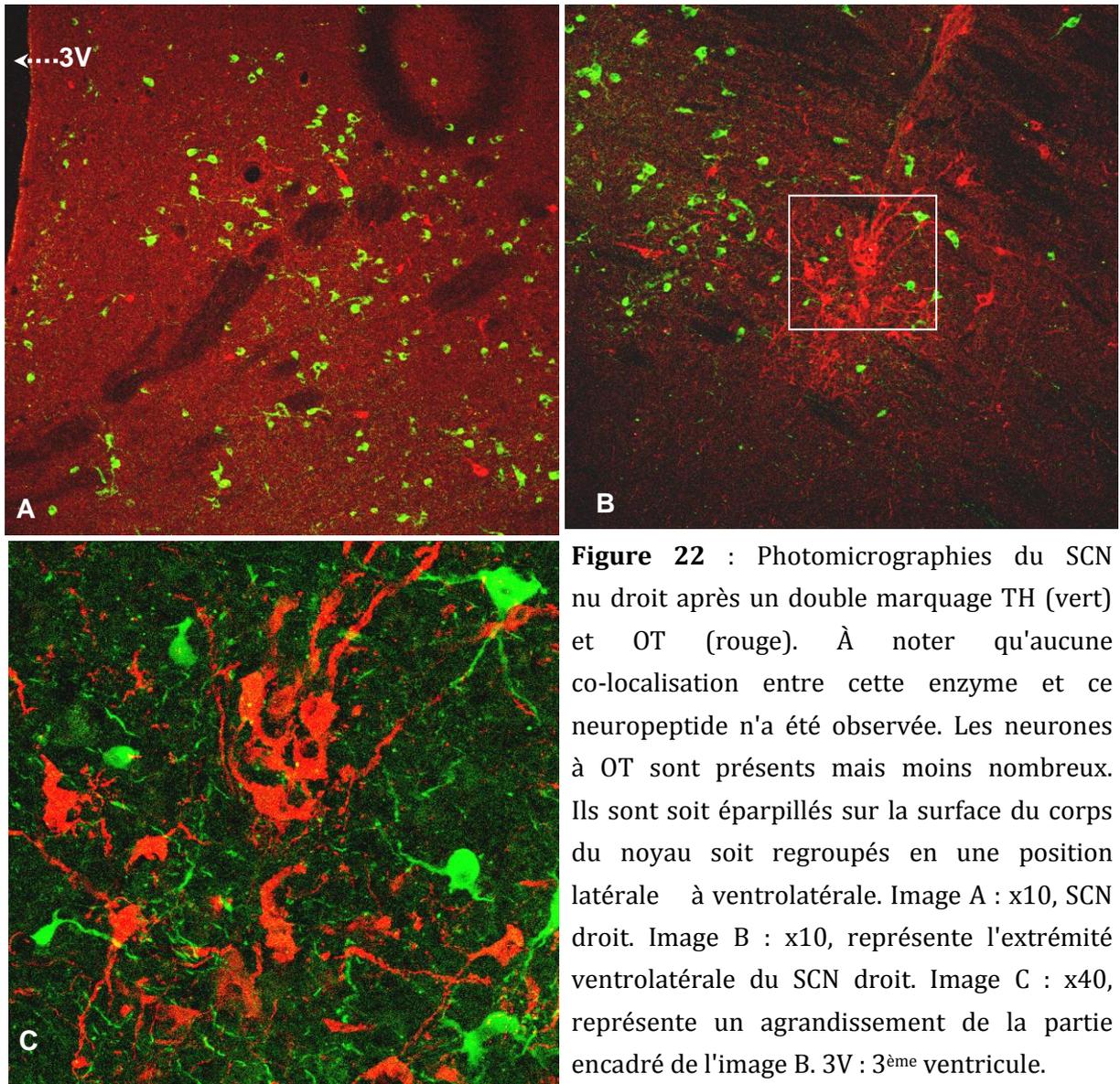
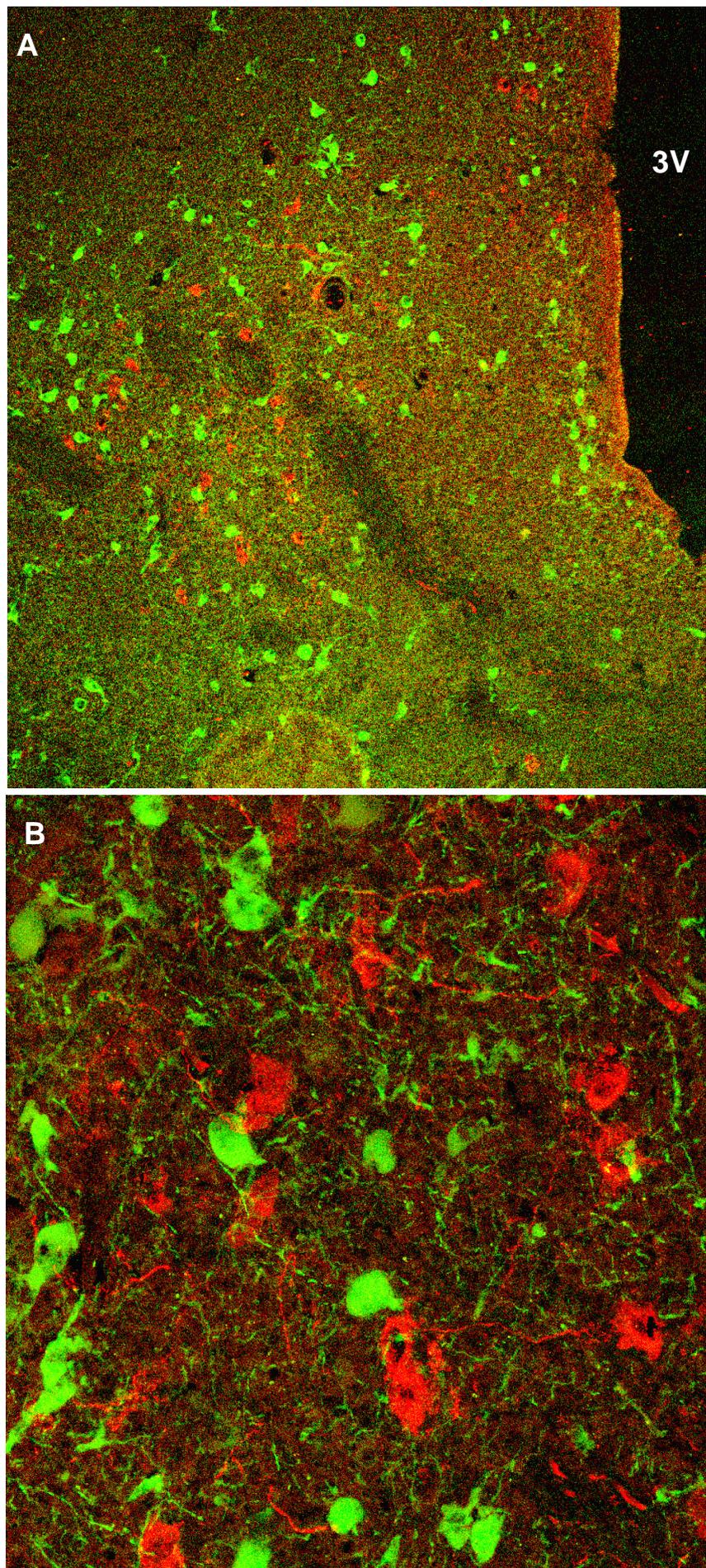


Figure 22 : Photomicrographies du SCN nu droit après un double marquage TH (vert) et OT (rouge). À noter qu'aucune co-localisation entre cette enzyme et ce neuropeptide n'a été observée. Les neurones à OT sont présents mais moins nombreux. Ils sont soit éparpillés sur la surface du corps du noyau soit regroupés en une position latérale à ventrolatérale. Image A : x10, SCN droit. Image B : x10, représente l'extrémité ventrolatérale du SCN droit. Image C : x40, représente un agrandissement de la partie encadré de l'image B. 3V : 3^{ème} ventricule.

Figure 23 :
Photomicrographies
du SCN nu gauche après
un double marquage
d'AVP (rouge) et TH (vert).
Le niveau de coupe
correspondant au plan
H10 de la figure 11.
Chaque
photomicrographie
représente une
superposition d'une prise
en fluorescence verte avec
la même prise en
fluorescence rouge.
Aucune co-localisation
de la TH et l'AVP n'a été
observée. Image A : x10 ;
Image B : x40.
3V : 3ème ventricule.



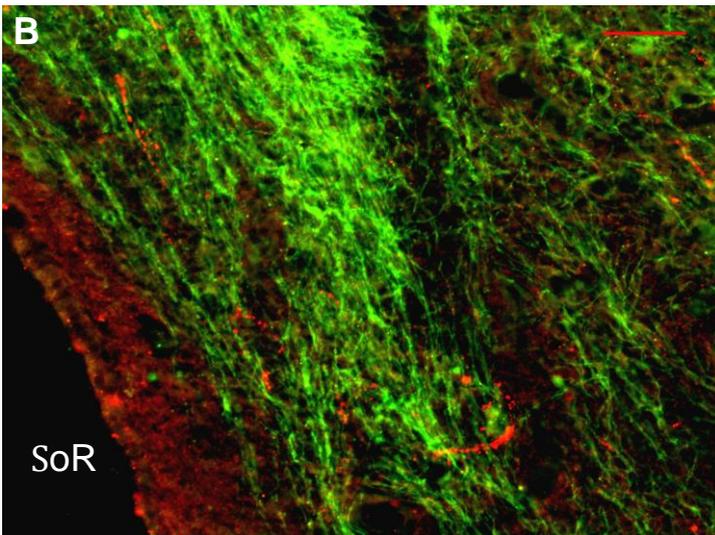
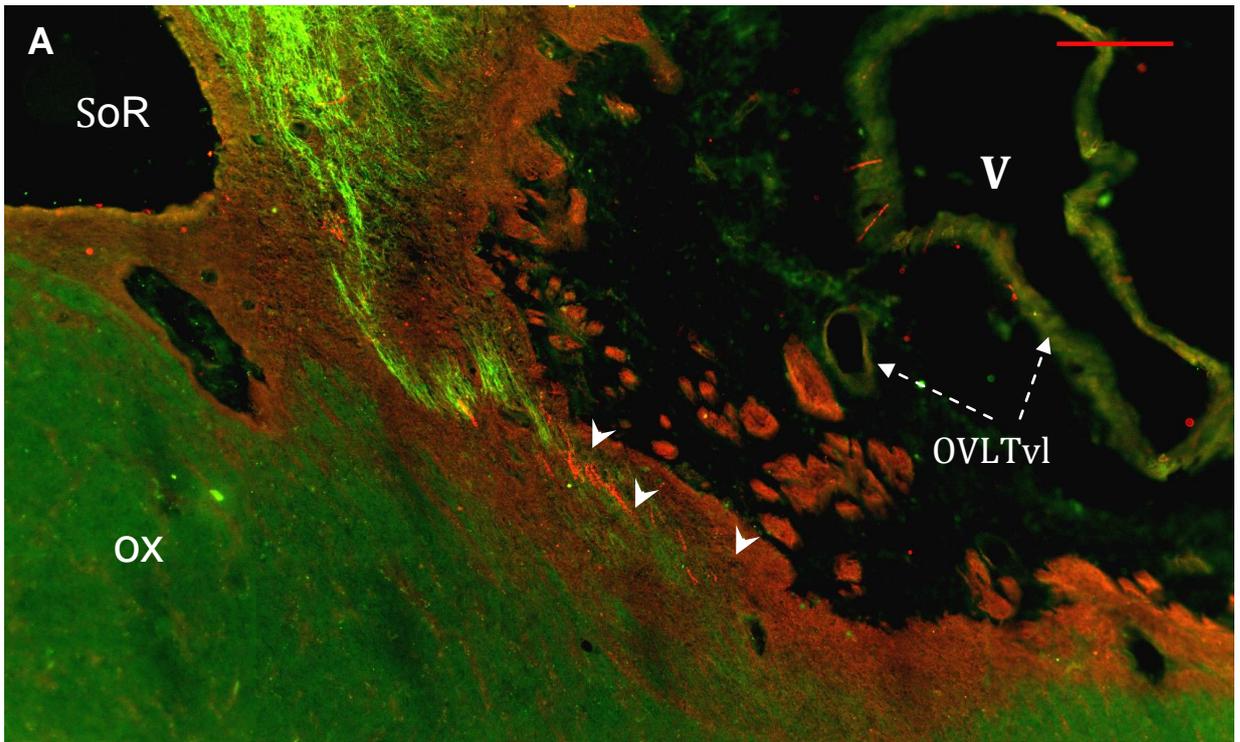


Figure 24 : Photomicrographies de la région suprachiasmatiche latérale après un double marquage VIP (rouge) et TH (vert). Le niveau de coupe correspondant au plan H3 et H4 de la figure 11. Chaque microphotographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. À noter les fibres (têtes de flèches) qui

quittent le SCN, en cheminant dans le prolongement hypothalamique ainsi que les fibres à VIP au niveau des vaisseaux de l'OVLT. Image A : x20, la barre rouge est équivalente à 200µm. Image B : x20, la barre rouge correspond à 50µm. OVLTvl : partie ventrolatérale de l'organum vasculosum de la lamina terminalis. ox : chiasma optique, SoR : récessus supra-optique, V : vaisseau sanguin de l'OVLTvl.

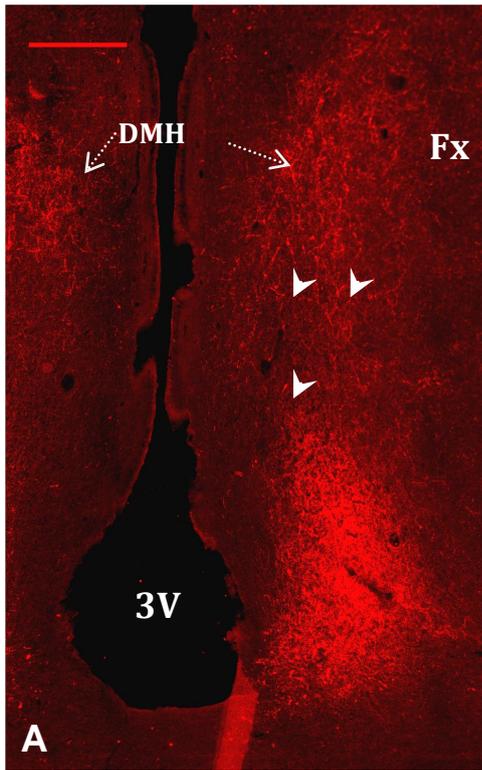
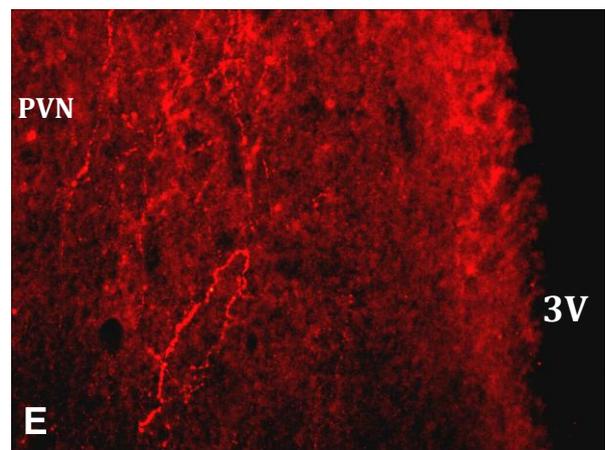
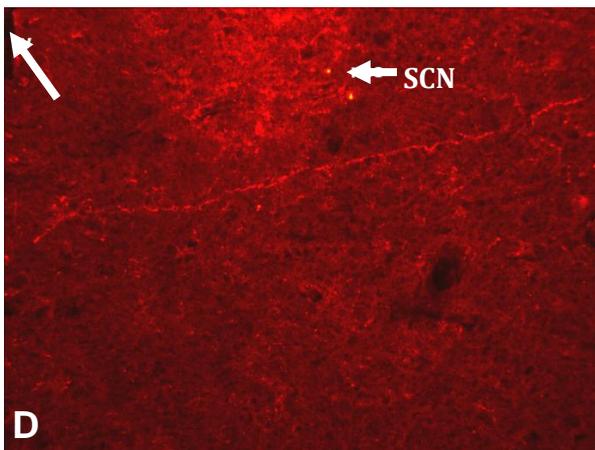
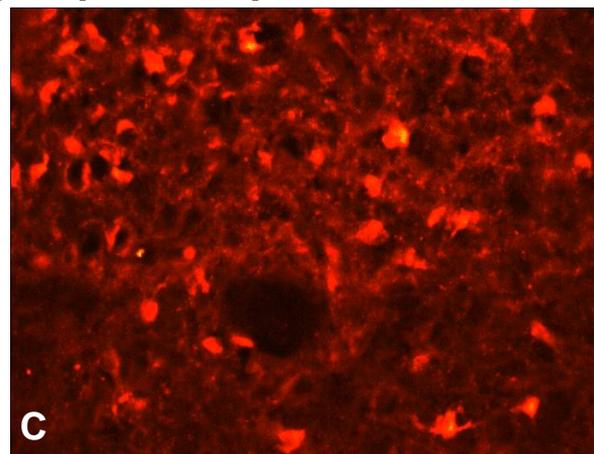
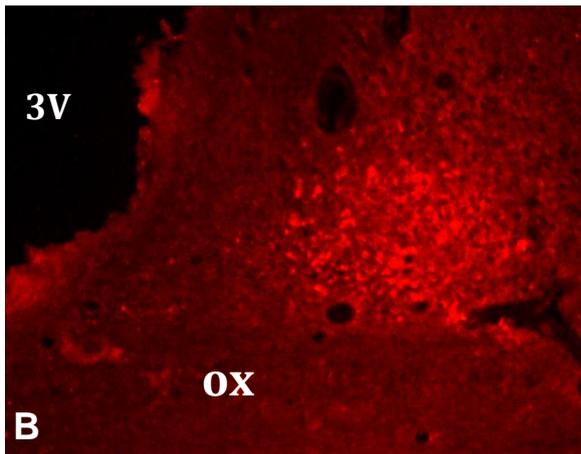


Figure 25 : Photomicrographies des SCN nus après un immunomarquage pour le VIP. À noter la présence des parvoneurones à VIP (Image C) qui sont en position ventrale dans le corps du SCN nu (Images A et B et D). À remarquer également l'existence de fibres à VIP quittant le SCN et se dirigeant dorsalement vers les DMH (têtes de flèches) en contournant le fornix (fx) (Image A) et d'autres allant vers le SON (Image D) ou vers le PVN (Image E). **Image A** : reconstitution à partir de 180 images prises à x10. **Image B** : grossissement x5 montrant la population ventrale de parvoneurones à VIP. **Image C** : grossissement x20, effectué sur la vue B. **Image D** : grossissement x10, montrant de longues fibres à VIP se dirigeant vers le SON controlatéral. **Image E** : grossissement x10, montrant les fibres VIP originaires du SCN qui sont dans PVN gauche. 3V : 3^{ème} ventricule, DMH : noyaux dorsomédians. Fx : fornix, ox : chiasma optique, PVN : noyau paraventriculaire, SCN : noyau supra-chiasmatique.



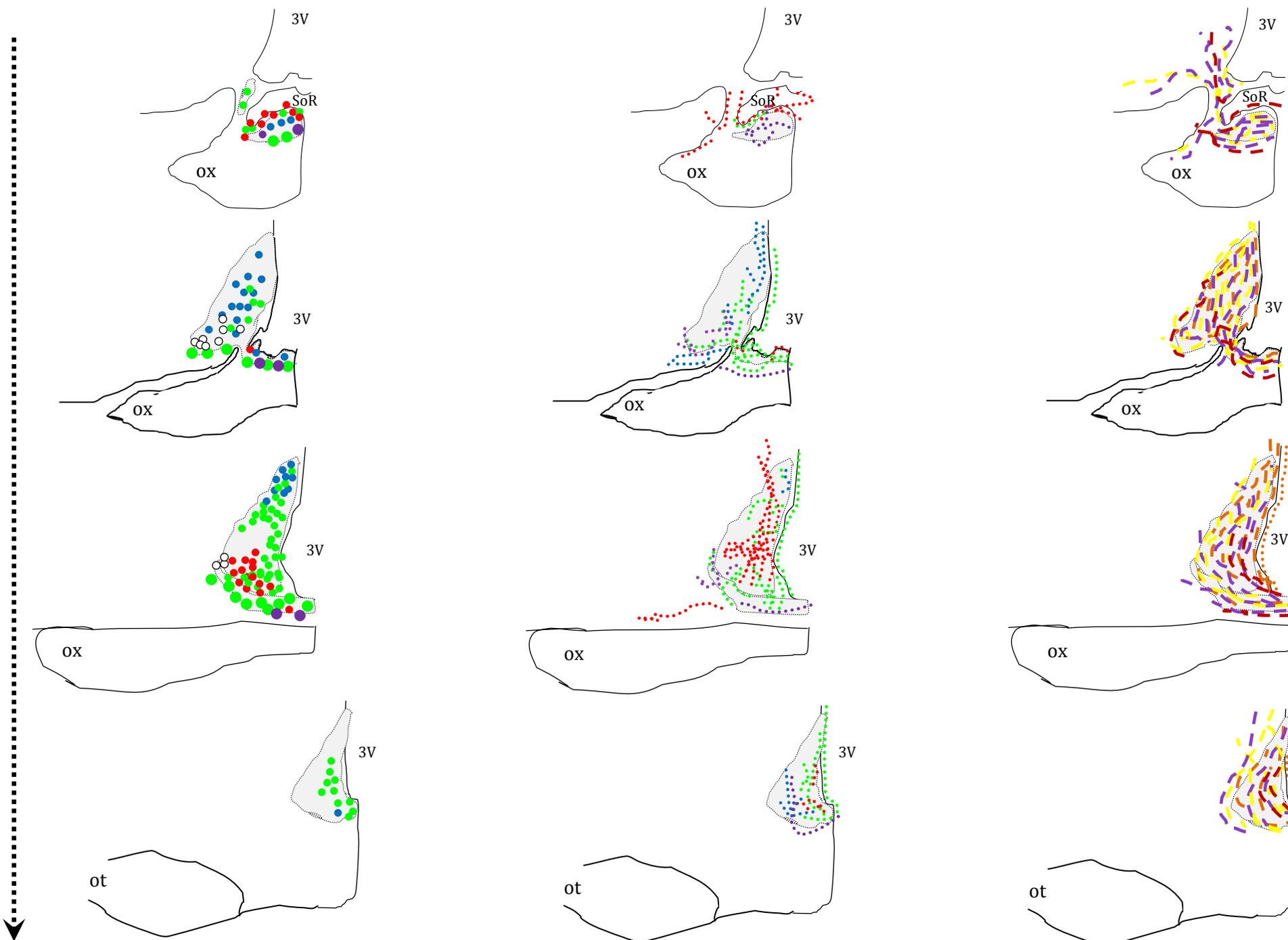


Figure 26 :
 Schéma synthétisant la distribution de la TH et des neuropeptides étudiés dans le SCN du Dromadaire. Le noyau est représenté par des coupes passant à différents niveaux rostro-caudaux : le SCN rostral, le SCN nu et le SCN rétrochiasmatique. Les neurones sont représentés par des grandes (magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères :

● : TH ● : AVP
 ○ : OT ● : VIP.

Les fibres sont représentées par des traits discontinus :
 ----- Quand il s'agit de fibres dont les péricaraxons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets :

----- : Met-enk
 ----- : NPY
 ----- : GAL
 ----- : 5HT.

3V : 3^{ème} ventricule
Ox : chiasma optique
SoR : récessus supra-optique.
Ot : tronc optique

2.2. Noyaux supra-optiques

2.2.1. Description anatomique

Le noyau supra-optique (SON) du Dromadaire est une structure paire et symétrique par rapport au 3V. Il est constitué de deux parties : le SON nu et le SON rétrochiasmatique. Les premiers neurones du SON apparaissent à une distance de 5,5 mm après la fusion des nerfs optiques. Cette apparition se fait à un niveau très médian et juxtaposant le SCN (Figure 11 : plan H6). Par la suite, une seconde population de neurones apparaît dorso-latéralement au chiasma optique, en étant collée à celui-ci (Figure 11 : plan H8). Plus loin, le chiasma optique remonte dorsalement et les deux populations fusionnent pour former le SON nu. Ce noyau migre progressivement vers le côté latéral en augmentant de densité neuronale.

Après la disparition du chiasma optique (Figure 11 : plan H10), les neurones qui forment le SON rétrochiasmatique (SONr) apparaissent, ils juxtaposent les troncs optiques (Figure 11 : photo H). En même temps, le SON nu s'allonge dorsalement au tronc optique. Le SONr augmente de taille et devient nettement individualisé. Sur ces coupes rétrochiasmiques, il est situé latéralement au noyau arqué et ventralement au noyau tubéral (Figure 11 : plan H13, H14, H14', H15, H16 ; Figure 27, 32, 56 et 57). Sur la bordure dorsolatérale des troncs optiques, quelques rares neurones bipolaires relient le SON nu et SONr. L'extension du SON rétrochiasmatique est de l'ordre de 4,3 mm, alors que celle du SON nu est estimée à 5,4 mm et l'extension totale du noyau est de 9,7 mm.

Les deux subdivisions constituant le SON sont formées majoritairement par des neurones magnocellulaires de différentes formes et par quelques parvoneurones (Figure 27). Ces neurones sont d'une affinité tinctoriale très élevée aux colorants utilisés, rendant l'identification de ce noyau plus facile.

2.2.2. Contenu neuropeptidergique

- Population neuronale :

La technique d'immunofluorescence a révélé l'existence d'une forte densité de neurones à OT et à AVP, visibles dans les deux parties du SON. Par ailleurs, la position des neurones à OT est différente de celle à AVP. Les neurones à OT sont en position dorsale alors que ceux à AVP sont ventraux, occupant une surface étirée latéralement et médialement (Figure 28 et 33). Cette disposition de neurones est préservée jusqu'aux coupes caudales du SON nu. A des niveaux plus postérieurs, les neurones ne gardent plus cette disposition, OT dorsale et AVP ventrale. En effet, sur ces niveaux de coupe,

les neurones à AVP sont entourés du côté dorsal et ventral par des neurones à OT (figure 29 et 31). Le SONr présente la même disposition dorsale pour OT et ventrale pour AVP. Dans le SONr, les neurones à AVP sont plus nombreux que ceux à OT (Figures 29 et 30). La communication entre les deux subdivisions du SON est assurée par des fibres et quelques rares neurones majoritairement à AVP. La répartition du contenu AVP et OT n'est pas exclusif dans tous les neurones. En effet, nos observations au microscope confocal montrent l'existence d'une co-localisation de l'OT et de l'AVP dans quelques neurones (Figure 31). Ces neurones ont été estimés à 3% et ils sont plus importants dans le SON rétrochiasmatique.

En plus de l'existence de neurones à OT et à AVP, une forte population de neurones à TH est présente dans ce noyau. Cette population n'existe que dans le SON rétrochiasmatique (Figure 32 et 33). Dans cette subdivision, les neurones à TH coexistent avec ceux à AVP et à OT, mais sans co-localisation.

- *Fibres efférentes :*

Les neurones du SON envoient des fibres qui passent dans l'éminence médiane et descendent dans la neurohypophyse. **Les fibres des neurones OT** du SON rétrochiasmatique se dirigent dorsalement puis médialement accompagnant celles du noyau tubéral (Figure 55). Ces fibres, destinées à la neurohypophyse, empruntent la bordure interne de l'éminence médiane (ME) (Figure 55 et 33). **Par contre, les fibres des neurones à AVP** du SON rétrochiasmatique et celles du noyau tubéral (Figure 30 et 53), sont organisées en deux groupes, une voie qui pénètre la ME par sa bordure externe et une autre voie majoritaire qui emprunte la bordure interne (Figure 33). A ce niveau, un certain nombre de corps de Herring co-localisent les deux neuropeptides.

Les neurones à TH du SONr envoient des fibres pénétrant la ME du côté de la bordure externe.

- *Fibres afférentes :*

Des fibres AVP, OT, TH et VIP afférentes sont particulièrement importantes au niveau du SON :

Des fibres à OT et beaucoup de fibres à AVP forment un véritable tronc en provenance des PVN, des DMH et des VMH, traversant l'hypothalamus latéral en se dirigeant vers le SON (Figure 28, 29, 33, 35, 37, 49 et 50).

Le SON nu reçoit des fibres à VIP (Figures 25, 26, 33) en provenance du SCN. Ces fibres proviennent au début du SCN rostral et plus caudalement du SCN nu et surplombent la population dorsale du SON, qui est immunoréactive à OT.

Des fibres à GAL ont été relevées dans le SON. Elles pénètrent le noyau, en empruntant une voie périventriculaire ou bien en traversant l'hypothalamus latéral. Certaines de ces fibres co-localisent avec l'AVP.

Comme dans plusieurs structures hypothalamiques, les fibres à Met-enk sont très denses dans ce noyau. Elles cheminent ventro-latéralement et se terminent pour la plupart au dessus des neurones à OT du SON nu (Figure 33).

D'autres fibres, à NPY et à TH, ont été relevées au niveau du SON (Figure 33).

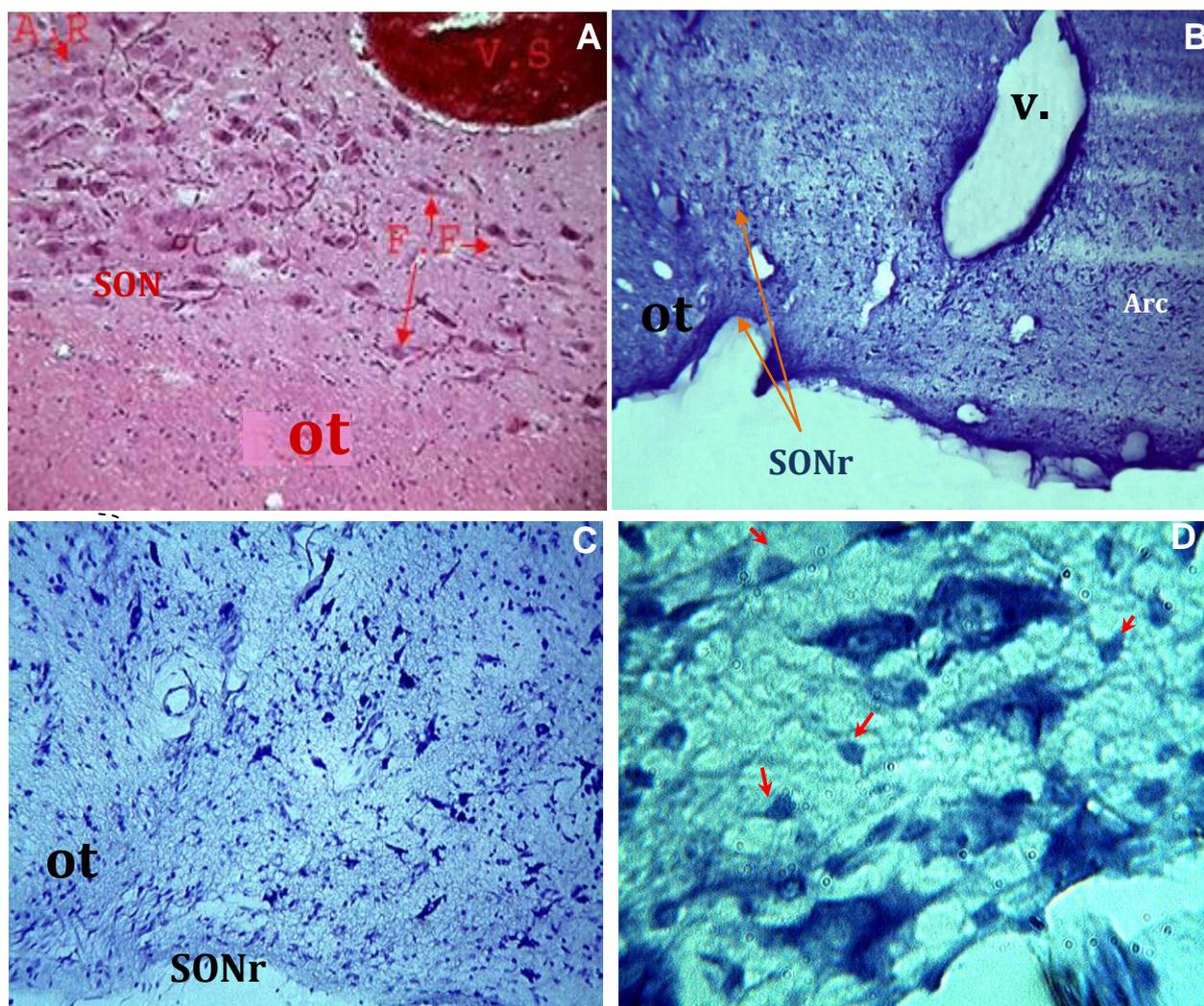


Figure 27 : Photomicrographies du SON nu et SONr après colorations histologiques. À noter la position du SONr par rapport au tronc optique (ot), le noyau arqué (Arc) et tubéral (Tu). À remarquer, également les formes diverses des magnoneurones dans le SON, ainsi que l'existence de parvoneurones (Vue D : flèches rouge). Image A : H&E (x16); Images B(x4), C(x10), D(x40): bleu de Toluidine. FF : neurones fusiformes ; AR : neurones arrondis. V.S : vaisseau sanguin.

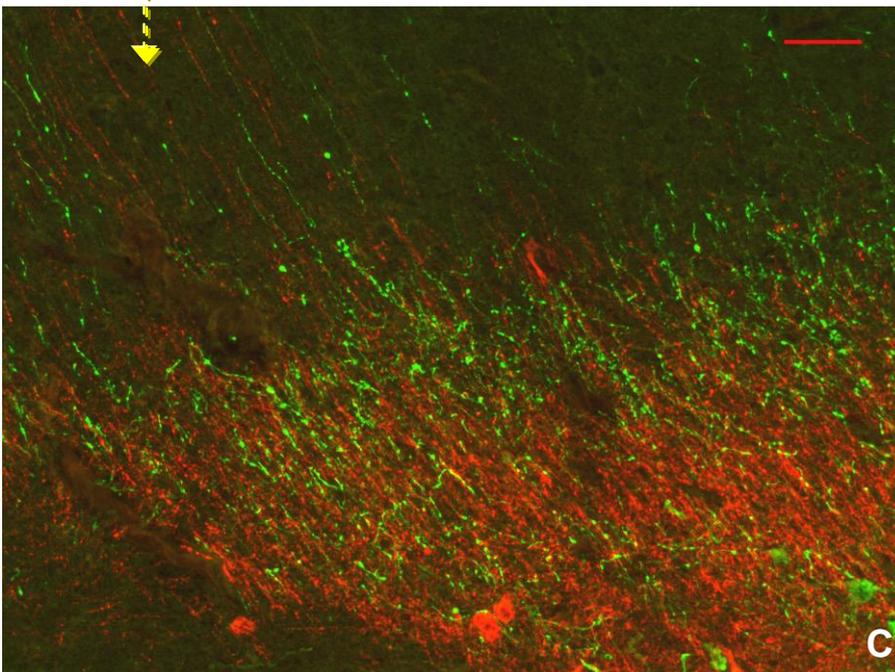
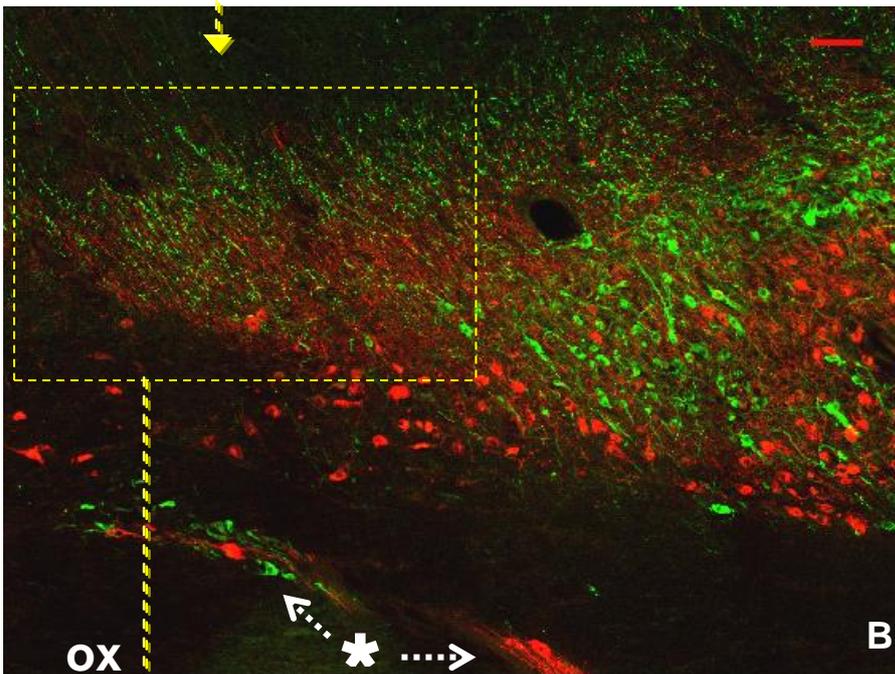
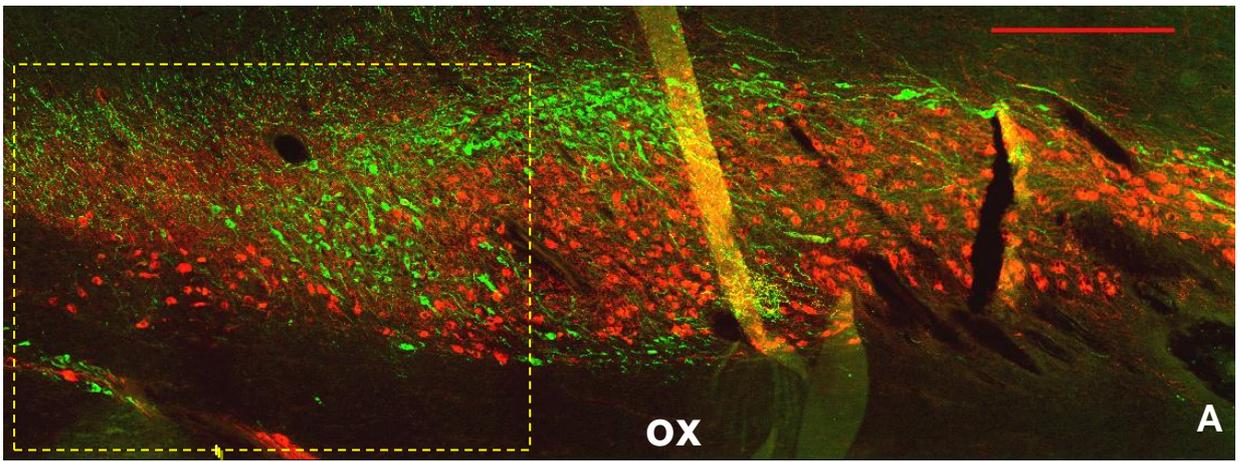


Figure 28 :
Photomicrographies du SON nu après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). Le niveau de coupe correspondant à un niveau situé entre le plan H8 et H9 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge.

Image A : reconstitution à partir de 30 images à un grossissement de x5. La barre rouge correspond à 500 µm.

Image B : Agrandissement de l'image vue A. La barre rouge correspond à 100µm.

Vue C : Agrandissement de l'image A, La barre rouge correspond à 125µm.

À noter sur ces niveaux de coupe rostrale la position majoritairement ventrale des neurones à AVP et l'existence d'une population neuronale isolée (*) et située dorsalement sur le chiasma optique. En se dirigeant caudalement les deux populations vont fusionner.

ox : Chiasma optique
120

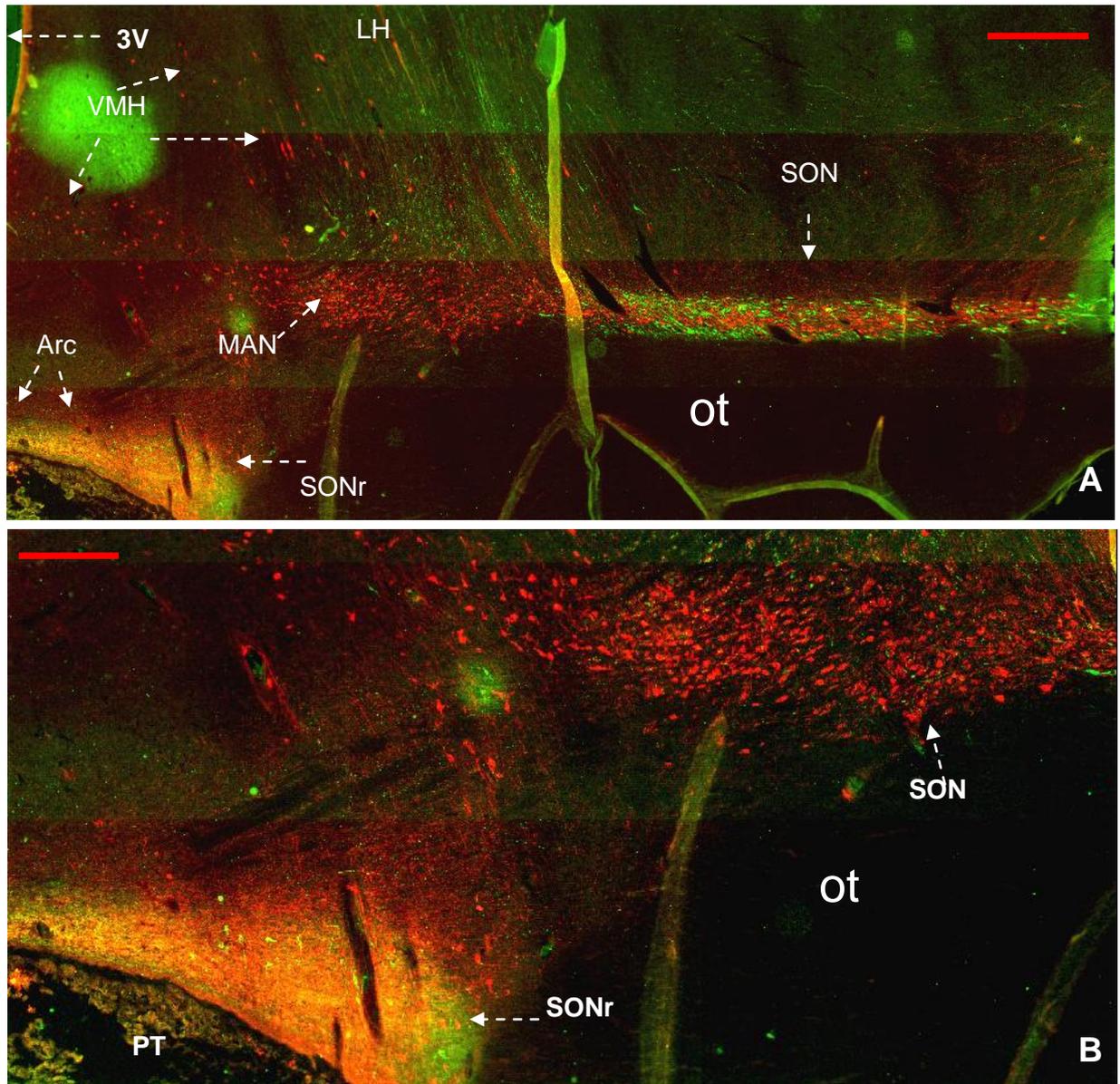


Figure 29 : Photomicrographies du SON après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). Le niveau de coupe correspondant au plan H12 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. Image A : reconstitution à partir de 56 images, prises à un grossissement de x5. La barre rouge est équivalente à 1000µm. Image B : un agrandissement sur l'image A, la barre rouge représente 500µm. À noter que sur ces niveaux caudaux, le SON ne s'élargie et la population AVP s'intercale entre deux populations à OT, dorsale, et ventrale. À noter également la répartition de ces neurones dans le SONr avec les neurones à OT dorsalement et ceux à AVP ventralement (Image B). **3V** : 3^{ème} ventricule, **Arc** : noyau arqué, **LH** : hypothalamus latéral, **MAN** : noyau accessoire magnocellulaire, **ot** : tronc optique, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **SON** : noyau supra-optique, **SONr** : la partie rétrochiasmatisque du SON, **VMH** : noyau ventromédian.

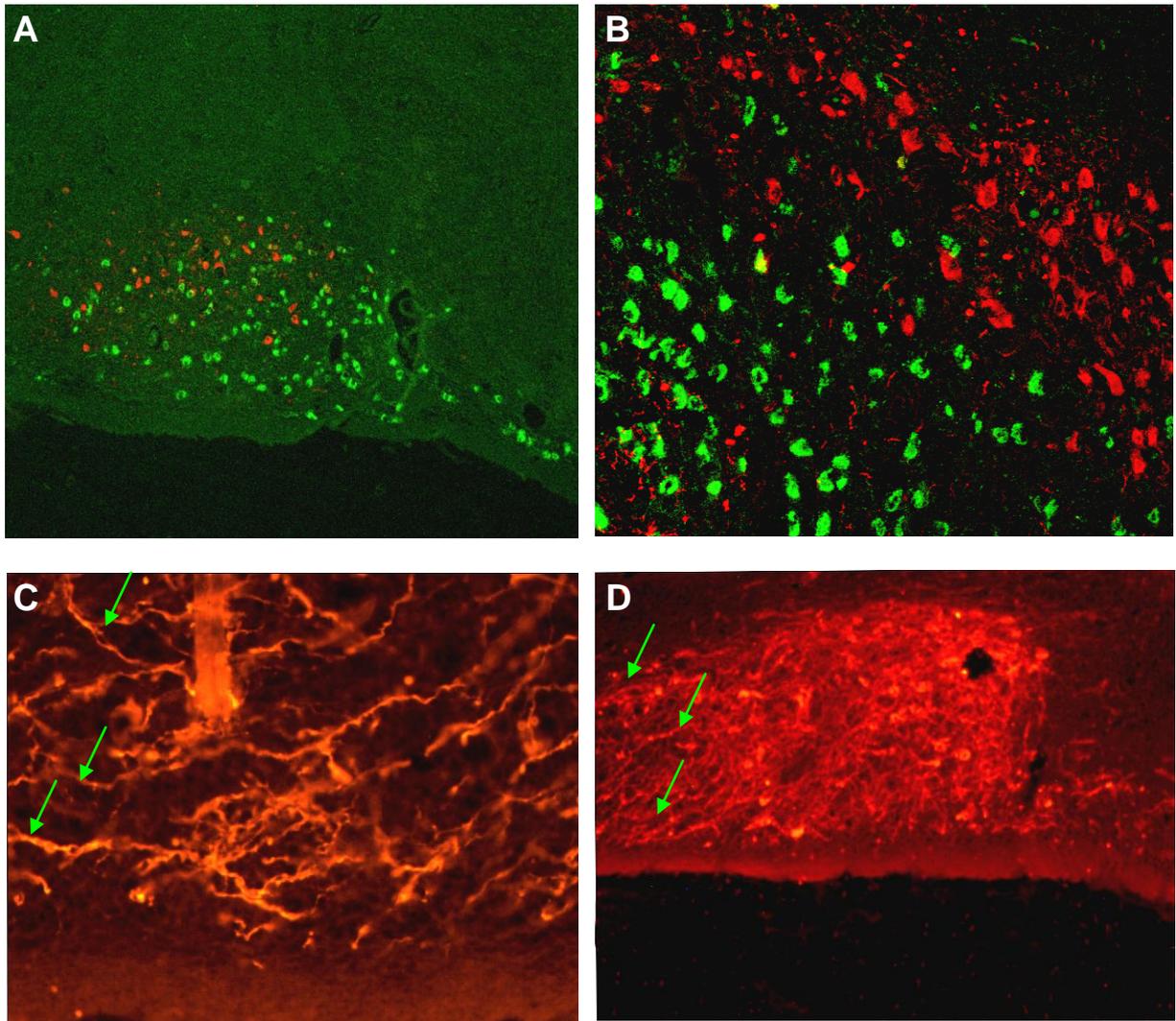


Figure 30 : Photomicrographies du SON rétrochiasmatique sur coupes parasagittales après, un double marquage AVP (vert) et OT (rouge) : Images A et B, ou bien après un immunomarquage simple à l'AVP (rouge) : Image C et D.

Les photomicrographies du double marquage, représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge.

Image A (x10) et Image B (x20), montrent la répartition, dorsale des neurones à OT et ventrale des neurones à AVP. Ces derniers sont seuls à persister caudalement.

Image C (x20) et Image D (x5) représentent des fibres issues (flèches) du SONr et se dirigeant vers le côté caudal où se localise l'éminence médiane.

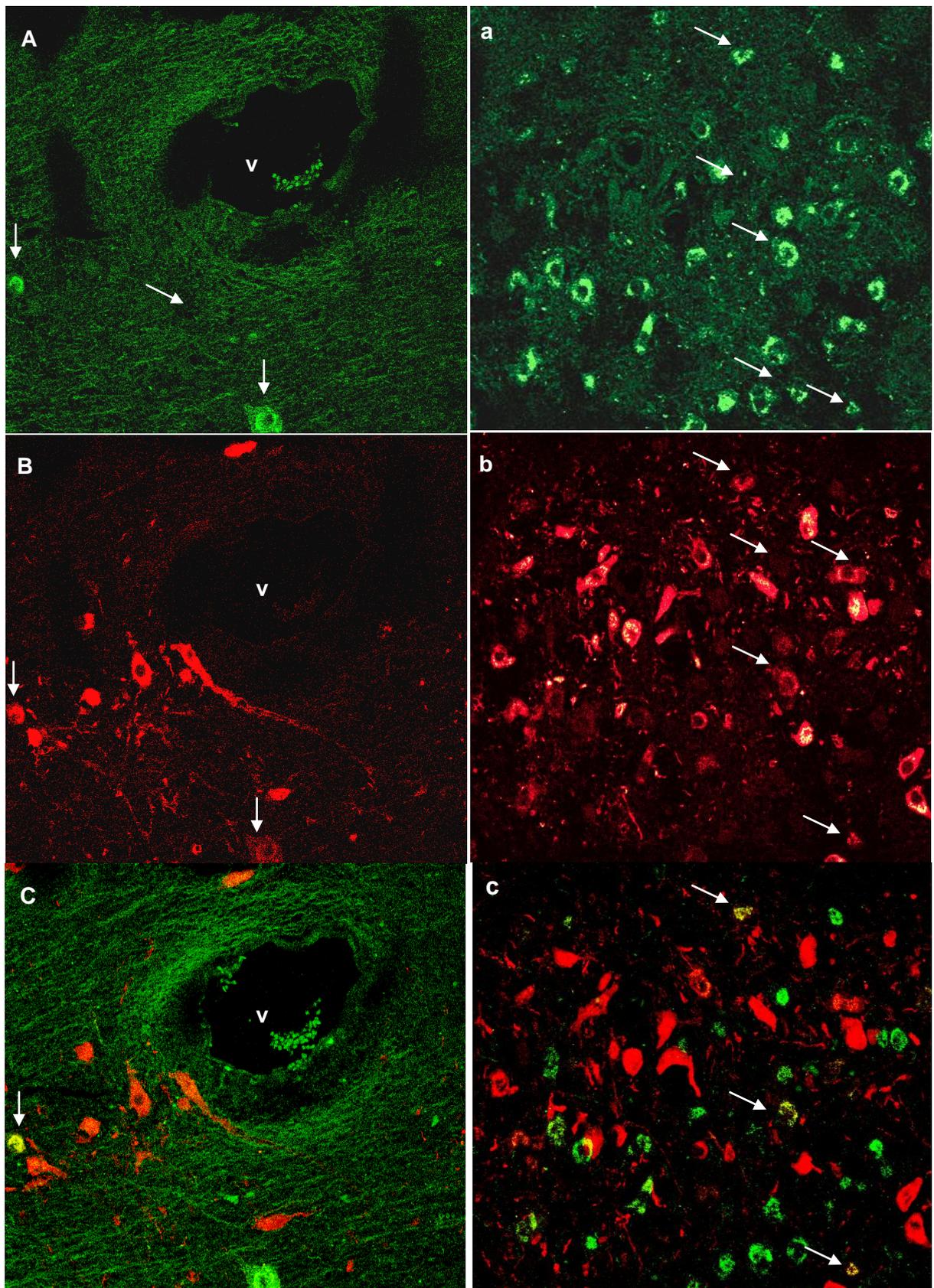


Figure 31 : Photomicrographies du SONr (Images A, B, C) et du SON nu (Images a, b, c) après un double marquage l'AVP (vert) et OT (rouge). Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. L'ensemble des images sont à un grossissement de x40. À noter l'existence de quelques neurones qui co-localisent les deux neuropeptides. (Flèches).

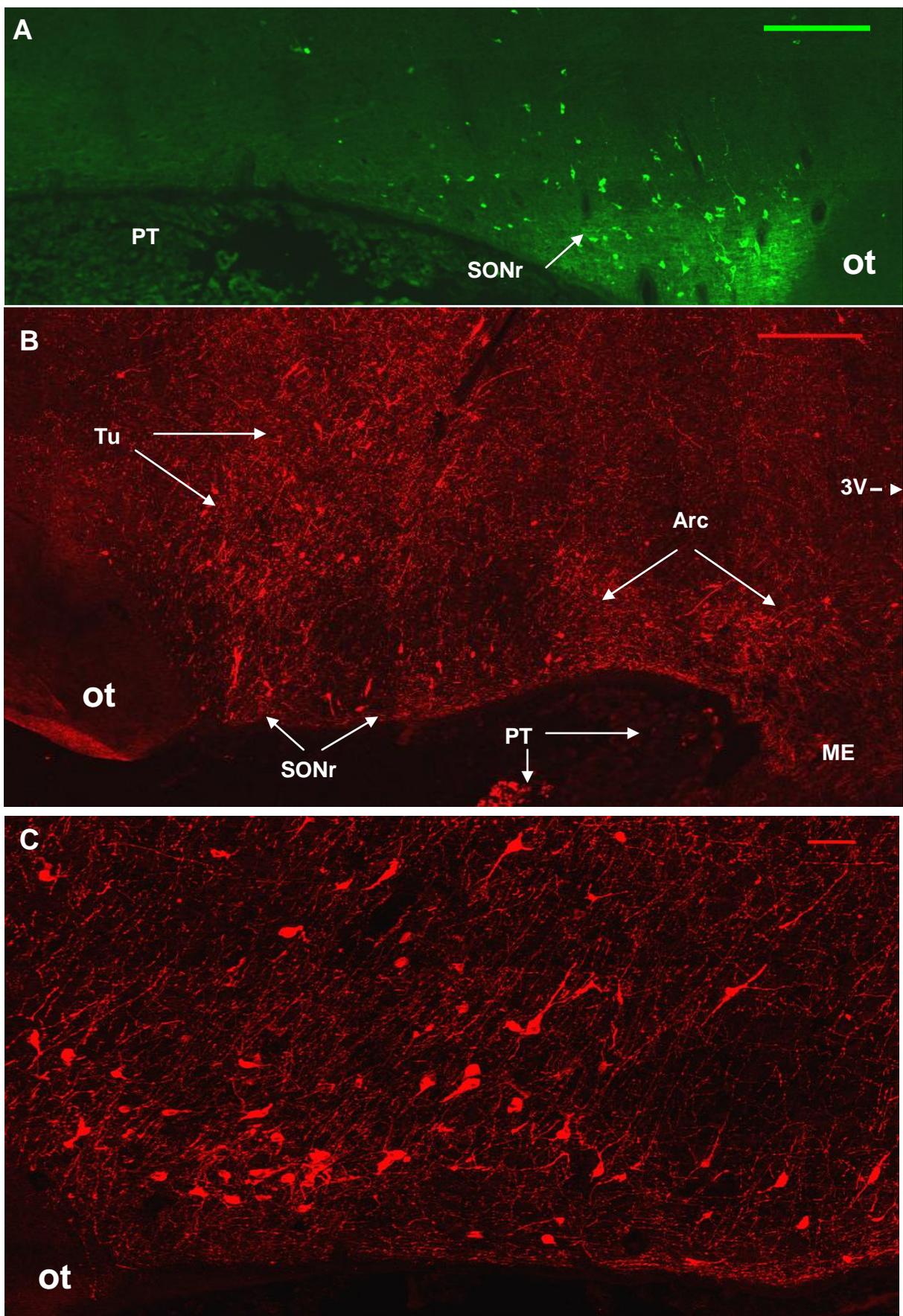


Figure 32 : Photomicrographies du SONr après un immunomarquage de la TH. Le niveau de coupe correspondant au plan H14 de la figure 11. Vue A : reconstitution à partir de 10 images, prises à un grossissement de x10. La barre verte représente 500 μ m. Vue B : reconstitution à partir de 15 images prises à un grossissement de x10. La barre rouge correspond à 500 μ m. Vue C : reconstitution à partir de 16 images prises à un grossissement de x20. La barre rouge est équivalente à 200 μ m. À noter l'existence de neurones à TH dans le SONr et le rapport anatomique qu'entretient celui-ci avec le noyau tubéral (Tu) et le noyau arqué (Arc). **3V** : 3^{ème} ventricule, **Arc** : noyau arqué, **ot** : tronc optique, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **SONr** : la partie rétrochiasmatic du noyau supra-optique, **Tu** : noyau tubéral, **ME** : éminence médiane. Les flèches indiquent l'emplacement des structures mentionnées ci-dessus.

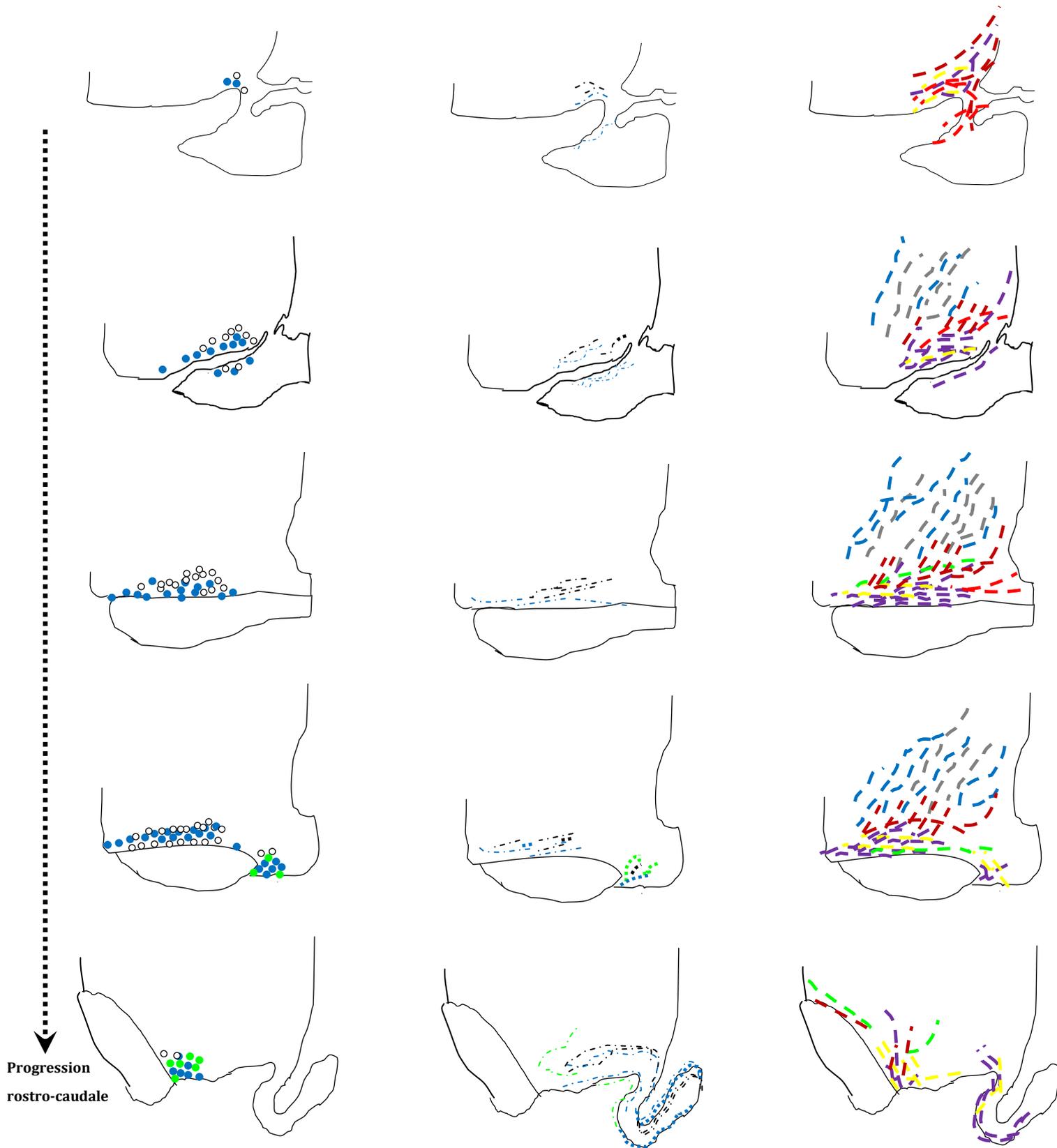


Figure 33 : Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le SON du Dromadaire. Le noyau est représenté par des coupes passant à différents niveaux rostro-caudaux. Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvocellules) sphères ● : TH ● : AVP ○ : OT. Les fibres sont représentées par des traits discontinus : en point-tirets Quand il s'agit de fibres dont les péricaraxons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets :

— : Met-enk — : NPY — : VIP — : TH — : GAL — : AVP — : OT .

2.3. Noyaux paraventriculaires

2.3.1. Description anatomique

Le noyau paraventriculaire (PVN) est une structure paire et symétrique, situé dans la partie dorsale de l'hypothalamus, de part et d'autre du 3V. Sur une série de coupes coronales orientées rostro-caudalement, l'apparition des premiers neurones de ce noyau est notée à une distance de 8,4 mm, après la fusion des deux nerfs optiques (Figure 11 : plan H11). A ce niveau, le noyau est appelé, PVN rostral. Il est constitué : 1) d'une agrégation circulaire de neurones, située dorsalement aux SCN et appelée, pars accessoire du PVN (PanPV) (Figure 11 : plan 11, 12 et photomicrographie G ; figure 34) et 2) d'une colonne de neurones périventriculaires, située dorsalement au PanPV et à proximité du fornix (Fx) (Figure 11 : photomicrographie G ; figure 34D). En se dirigeant caudalement, le PVN gagne progressivement la partie dorsale de l'hypothalamus, sa densité neuronale augmente et la colonne périventriculaire s'élève dorsalement et s'étire latéralement en surplombant le fornix (Figure 11 : plan H13, H14 et photomicrographie I₁). Ces modifications donnent au PVN la forme connue, en aile de papillon (Figures 34A, 35 et 36). Les neurones les plus caudaux appartenant au PVN, se situent à 12,7mm du plan H0 (Figure 11 : plan H17). L'extension moyenne du PVN est donc relativement courte, elle est de 4,3 mm.

Le PVN du Dromadaire est constitué de parvoneurones et de magnoneurones, caractérisés par une affinité tinctoriale élevée aux colorations utilisées. Ceci rend l'identification de ce noyau très facile. Les deux types de neurones sont repartis dans des subdivisions (certaines plus identifiables en immunofluorescence qu'en histologie classique). Dans le PVN un très grand nombre de parvoneurones, de faible densité sont observés parallèlement aux murs du 3V, constituant la subdivision des parvoneurones médiaux du PVN (PanMP) (Figure 34A et figure 36B). En s'éloignant latéralement du 3V, la taille des neurones augmente, faisant apparaître une région hétérogène de parvoneurones et de magnoneurones sous forme d'un tronc descendant obliquement vers le ventricule et constituant le PVN ventral (PanV) (Figure 11 : photomicrographie I₁ ; figure 34A et figure 36A). Dorsalement, des neurones périventriculaires forment un amas qui s'étend vers le plafond du 3V, c'est la subdivision dorsale du PVN (PanDC) (figure 34C, figure 36). La région latérale du PVN montre une zone bien individualisée, marquée par une majorité de magnoneurones, délimitant la pointe triangulaire du noyau, c'est la subdivision latérale des magnoneurones du PVN (PanLM) (Figures 35 et 36A). Sur des coupes caudales, les quatre subdivisions disparaissent, seul persiste une population de neurones périventriculaires, formant la subdivision postérieure du PVN (PanPO) (Figure 11 : plan H 17).

2.3.2. Contenu neuropeptidergique

- Population neuronale :

Les PVN du Dromadaire contiennent des neurones à OT à AVP (Figure 35, 36 et figure 40). Ces neurones constituent deux populations distinctes. Sur les coupes rostrales du PVN, apparaît, la subdivision paPVN qui est circulaire et qui est constituée majoritairement de neurones à OT. Par la suite la colonne périventriculaire forme la subdivision PanMP qui est également constituée majoritairement de parvoneurones ocytocinergique (Figure 35, 36 et figure 40). Plus caudalement des neurones à AVP apparaissent, ils coexistent avec ceux à OT. Dans le PanV, les neurones à OT occupent le centre et la partie médiale de la subdivision ; alors que les neurones à AVP occupent la partie latérale (Figure 35 ; figure 36 : A et B ; et figure 40). Une majorité de magnoneurones à AVP avec des neurones ocytocinergiques médiaux sont observés dans la subdivision PanLM (Figure 35, figure 36 : G et F ; et figure 40). La population ocytocinergique dans le PanMP se prolonge dorsalement vers le plafond du 3V pour former la subdivision du PanDC (Figure 35 ; figure 36 : C, D et E ; figure 40) et ventralement pour se confondre avec le noyau périventriculaire. Plus caudalement, dans le PanPO, seuls les neurones OT persistent (figure 38 et 40).

Dans le PVN du Dromadaire, l'ocytocine semble être prédominante par rapport à la vasopressine et ce en regard d'une distribution rostro-caudale plus étendue. En effet, l'OT apparaît en premier sur les coupes rostrales au niveau du paPVN et de la colonne périventriculaire et disparaît en dernier au niveau du PanPO alors que la vasopressine est limitée aux coupes de niveaux intermédiaires correspondant au PVN moyen.

Des neurones à TH apparaissent à partir des coupes du niveau du PVN moyen. Ils occupent à la fois le PanMP et PanV (Figure 38A, B et C ; figure 40). Ce sont majoritairement des parvoneurones (Figure 49 D). En se dirigeant caudalement, quelques neurones à TH apparaissent au niveau du PanLM. Par la suite, les neurones à TH disparaissent de la région périventriculaire (Figure 52) et apparaissent en grandes densités, latéralement dans la subdivision PanPO. Sur ces niveaux caudaux de la subdivision PanPO, la TH est latérale et l'OT est périventriculaire alors que l'AVP n'existe plus.

Quelques rares neurones à VIP apparaissent le long de la partie périventriculaire du PanV (Figure 46). De même de très rares neurones à Méth-enk apparaissent au niveau de ce noyau ; alors qu'aucun immunomarquage à la sérotonine, Galanine, NPY n'a été détecté.

- Fibres efférentes :

Les fibres des neurones à AVP mais aussi à OT du PVN, forment un véritable plexus, se distribuant dans différentes régions de l'hypothalamus et dans l'éminence médiane. Les fibres des neurones à OT parcourent la région latérale vasopressinergique (PanLM) (Figure 36: B et G, figure 37A). Elles s'entremêlent avec des fibres AVPergiques et pénètrent ensemble dans le fornix où elles le contournent (Figure 35, figure 36 : A et B, figure 37B) pour descendre obliquement vers l'hypothalamus latéral (LH). Ces fibres forment un véritable tronc oblique (Figure 35C) qui traverse d'abord le LH pour rejoindre par la suite le SON, où les fibres se terminent au dessus de la population OT (Figures 28, 29, 35 et 50). Les fibres OT et AVP situées latéralement à ce tronc, contournent dorsalement l'hypothalamus latéral et pénètrent le *globus pallidus*. Dans la partie ventrale de ce dernier, ces fibres coexistent avec des grands magnoneurones à AVP (Figures 37D). Il est à noter que ces fibres OT et AVP issues du PVN sont les seules, parmi celles observées dans l'hypothalamus du Dromadaire, à montrer un parallélisme presque parfait. D'autres fibres à OT et à AVP issues de PVN empruntent la voie périventriculaire pour pénétrer la bordure interne de l'éminence médiane et se distribuer dans la neurohypophyse.

Les neurones à TH du PVN envoient des fibres périventriculaires (Figure 40) qui descendent et rejoignent celles du noyau périventriculaire pour emprunter à la fin la bordure externe de l'ME. D'autres fibres à TH sont supra-ependymaires et descendent le long du 3V. Par ailleurs, nous avons relevé également, l'existence de fibres à TH qui quittent les PVN en se dirigeant dorsalement ou dorso-latéralement vers d'autres structures cérébrales, que nous n'avons pas étudiées dans ce travail.

- Fibres afférentes :

Les principales fibres afférentes dans les PVN du Dromadaire (Figure 40), sont :

- * Celles à Met-enk et NPY, qui sont très denses dans ce noyau.
- * Celles à GAL, elles sont nombreuses et cheminent dorsalement et ventralement au PVN, en empruntant la voie périventriculaire.
- * Celles provenant des neurones à VIP du SCN. Celles-ci remontent d'abord vers le DMH (forte densité), quelques une pénètrent dans le PVN.
- * Celles à sérotonine, elles sont périventriculaires provenant de structures dorsales.
- * Et enfin, celles à TH juxtaposant la *zona incerta* et provenant du noyau subthalamique (STh).

Par ailleurs, des fibres à AVP relient le PVN et le SCN sans pouvoir indiquer si ce sont des projections du SCN ou du PVN.

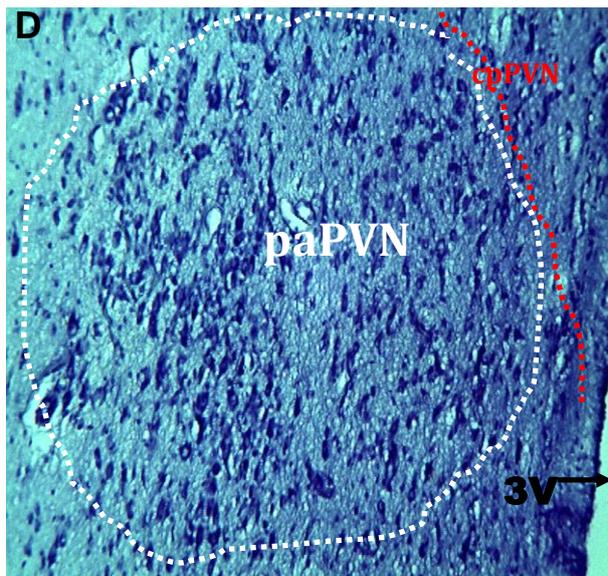
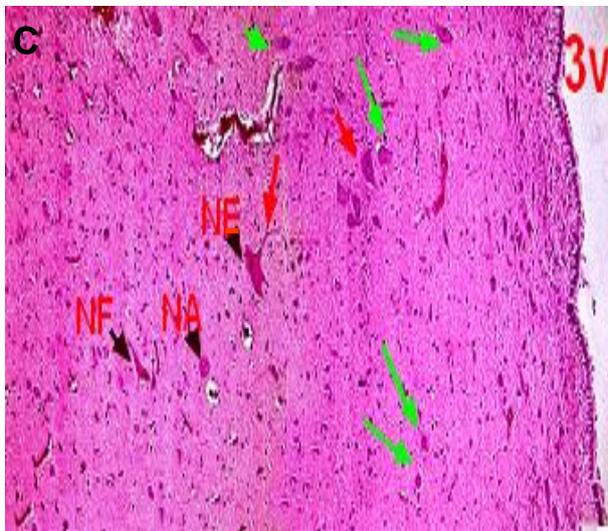
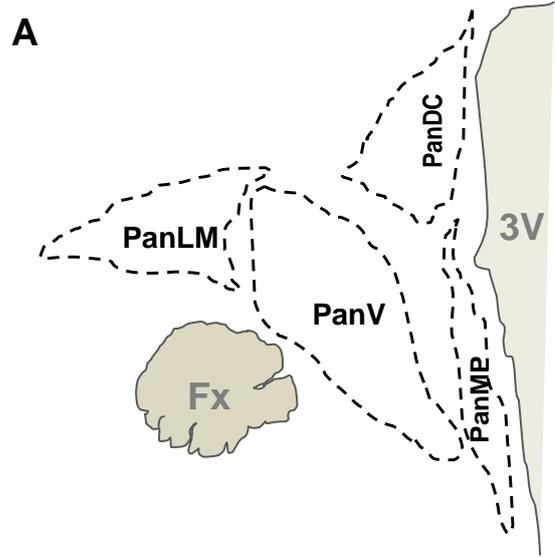
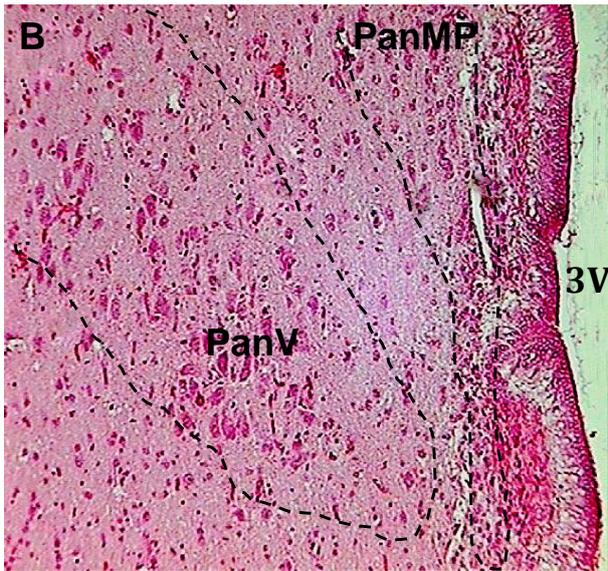


Figure 34 : Photomicrographies des différentes subdivisions du PVN moyen chez le Dromadaire.

Image A : Schéma représentant la position du PVN et ses quatre subdivisions cellulaires.

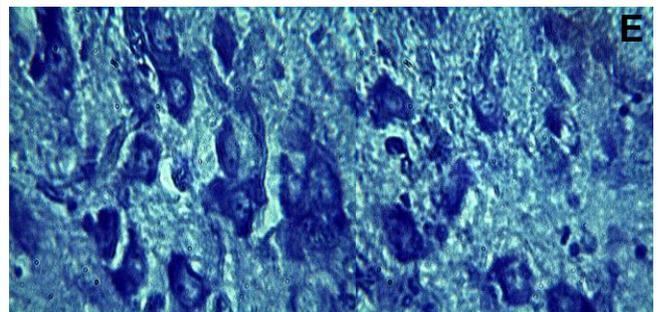
Image B : photomicrographie de la subdivision du PVN ventral (**PanV**) et de la subdivision des parvocellules médiales (**PanMP**) (H&E, x16).

Image C : photomicrographie de la subdivision dorsale (**PanDC**) avec des magnocellules (flèches rouges) et des parvocellules (flèches vertes) (H&E, x10), représentés par différentes formes : NF : fusiforme ; NA : arrondie, NE : étoilés.

Image D : photomicrographie du PVN rostral avec la subdivision de la pars accessoire (**paPVN**) et de la colonne périventriculaire (**cpPVN**) (bleu de Toluidine, x4).

Image E : photomicrographie montrant la constitution cellulaire en magnocellules et en parvocellules du paPVN, (bleu de Toluidine, x20).

3v : 3^{ème} ventricule, **Fx** : fornix, **PanLM** : subdivision latérale des magnocellules du PVN



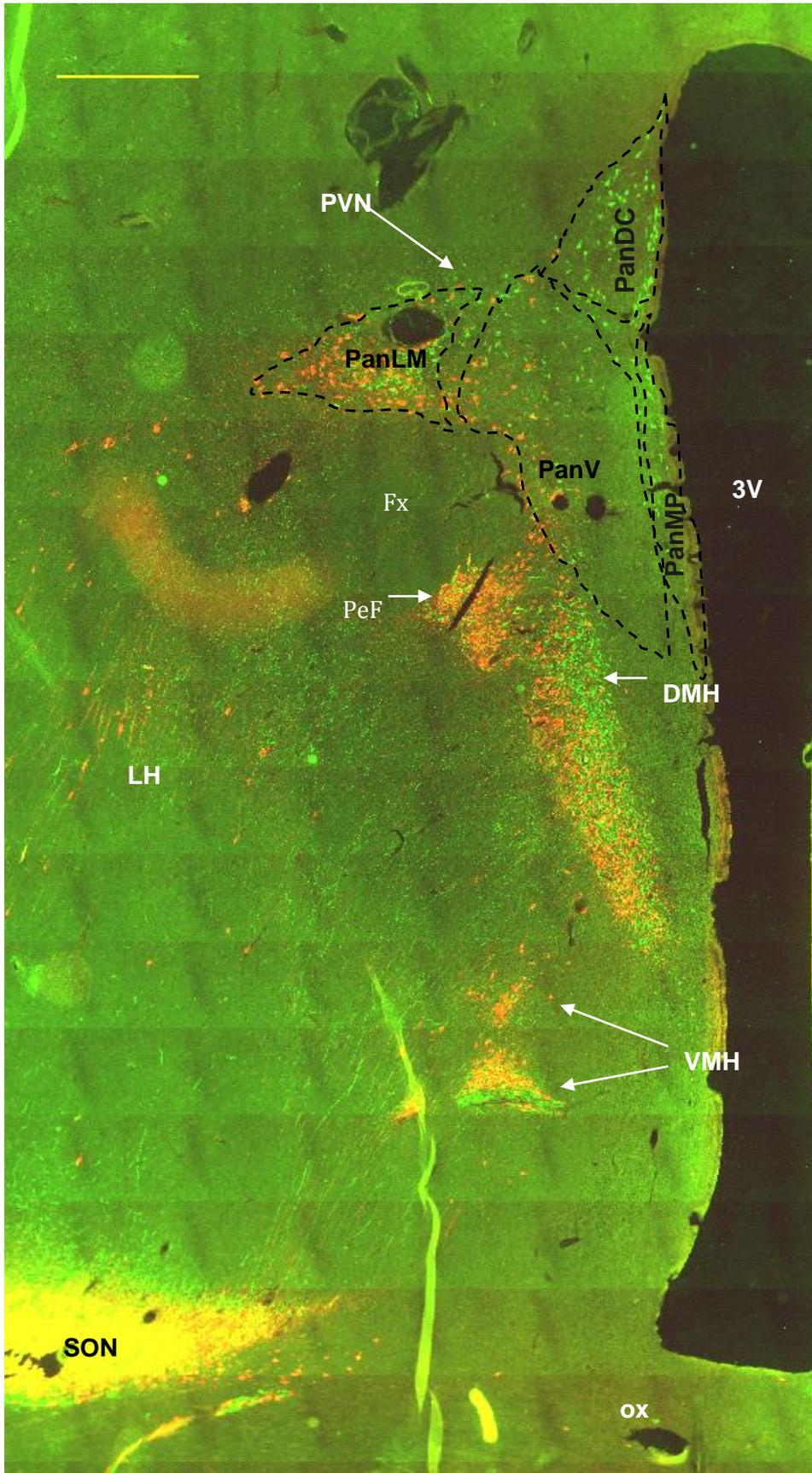


Figure 35 :

Photomicrographie des noyaux de l'hypothalamus antérieur après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). La figure est une reconstitution de 119 images d'un grossissement de x10. Les prises ont été effectuées en fluorescence verte ensuite en fluorescence rouge et ensuite superposées. Le niveau de coupe correspond au plan H14 de la figure 11. A noter qu'à ce niveau de coupe il ya un chevauchement des noyaux de la subdivision antérieure et tubérale. L'ensemble de ces noyaux sont immunoréactifs à l'OT et AVP. À noter également le contenu en ces deux neuropeptides dans les quatre subdivisions du PVN ainsi que l'importance de fibres à OT et à AVP quittant le PVN et se dirigeant dans l'hypothalamus latéral et vers le SON. **3v** : 3ème ventricule, **DMH** : noyau dorsomédian, **Fx** : fornix, **LH** : hypothalamus latéral, **ox** : chiasma optique, **PVN** : noyau paraventriculaire,

PanV : subdivision ventrale du PVN, **PanMP** : subdivision des parvoneurones médiaux du PVN, **PanDC** : subdivision dorsale du PVN, **PanLM** : subdivision latérale des magnoneurones du PVN. **PeF** : noyau périfornical, **SON** : noyau supra-optique. **VMH** : noyau ventromédian.

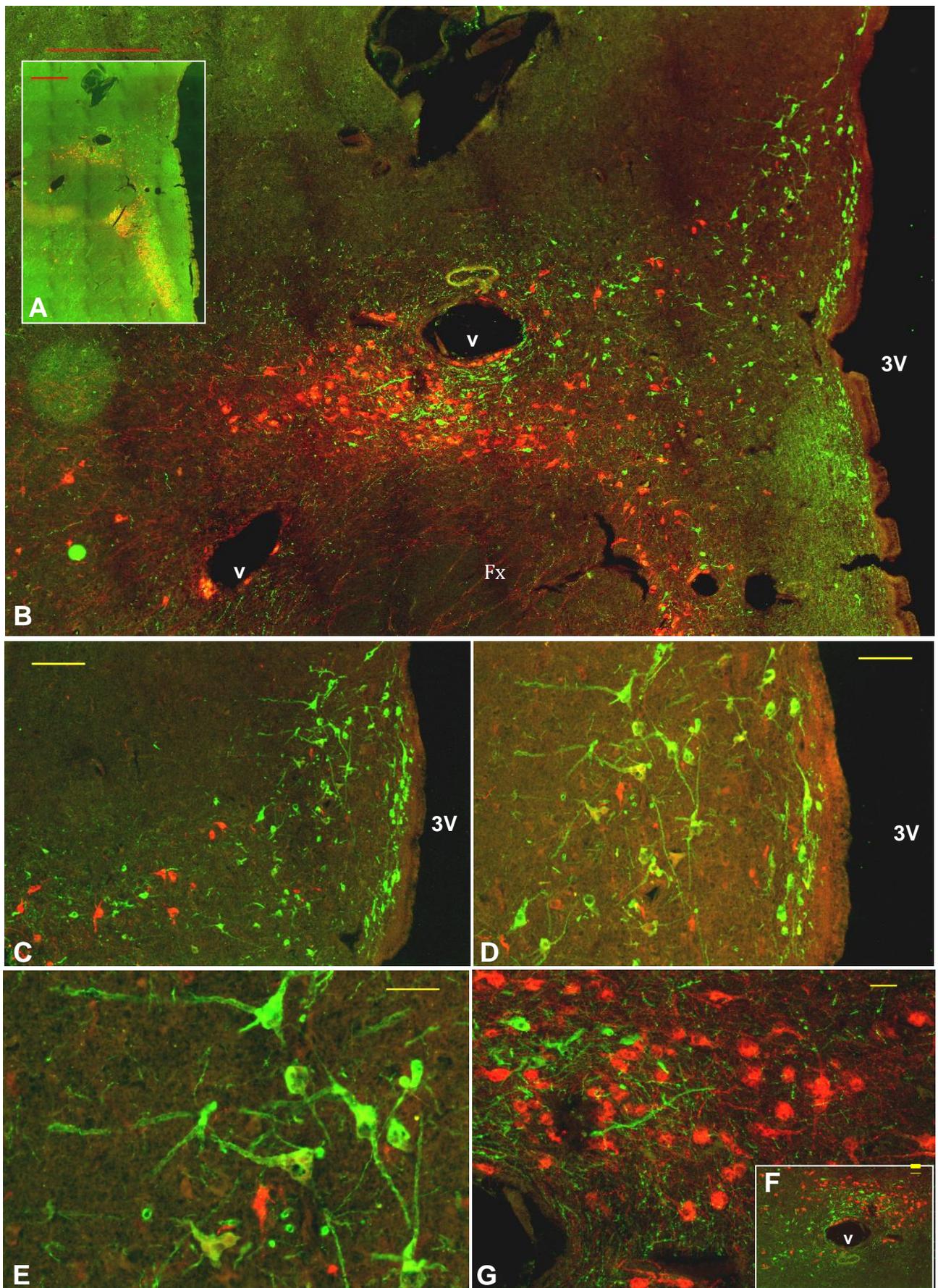
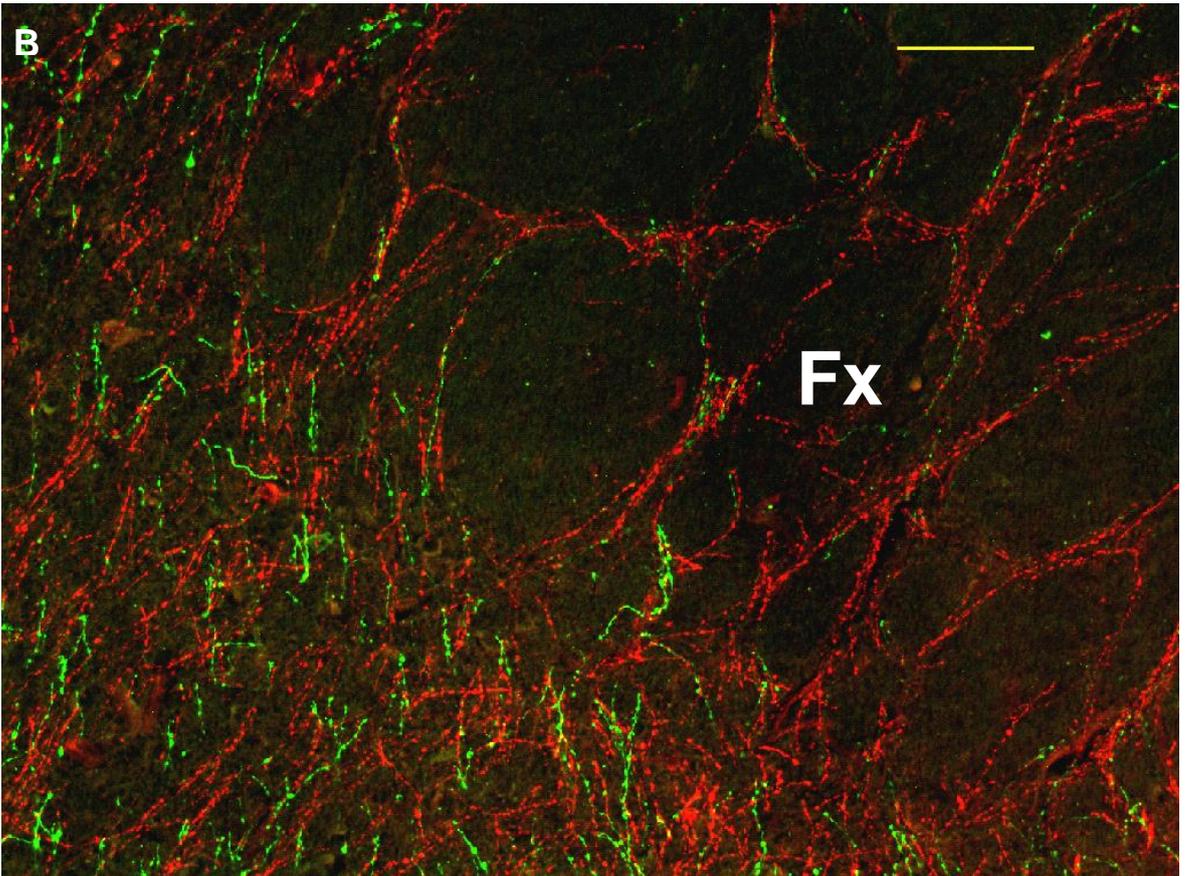
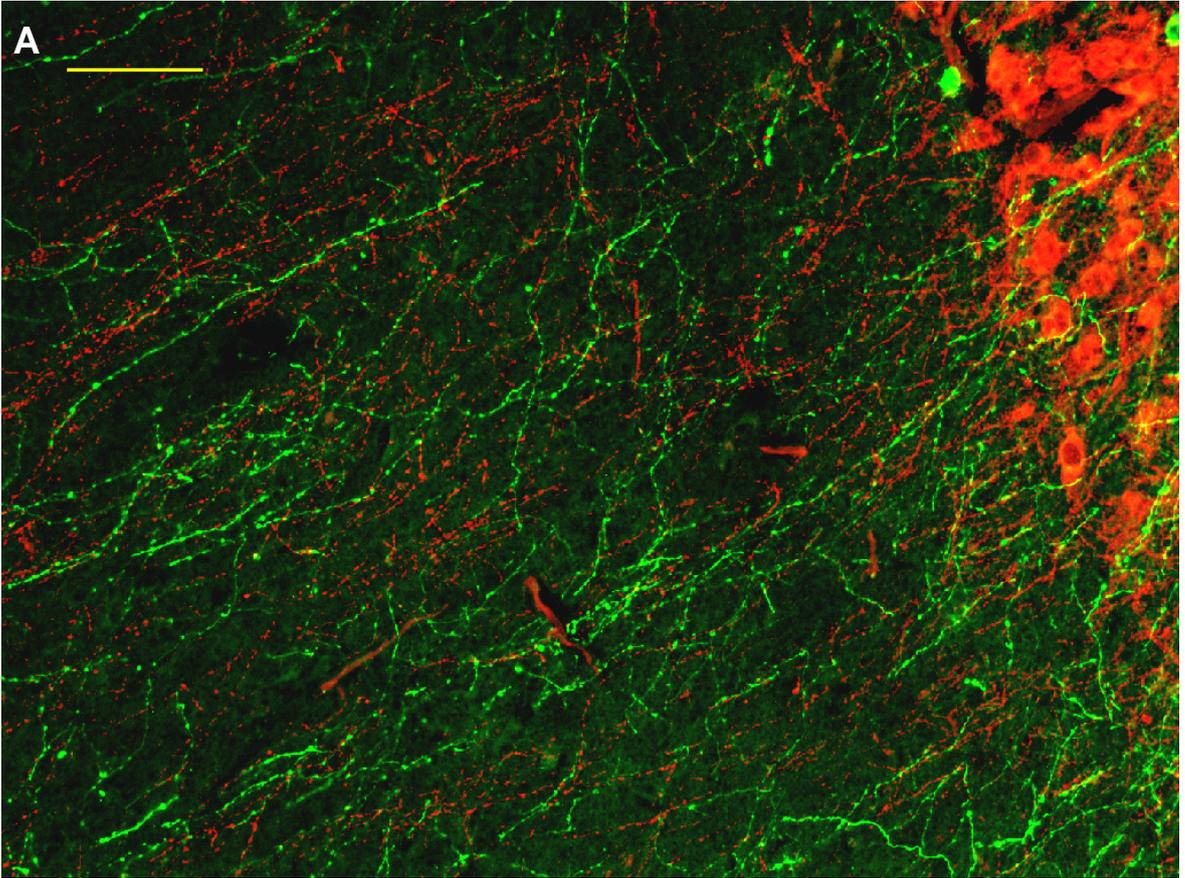


Figure 36 : Photomicrographies du PVN après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). **Image A** : reprise de la figure 35 avec un agrandissement, la barre rouge correspond à 1000 μ m. **Image B** : agrandissement de l'image A, la barre rouge correspond à 90 μ m. **Image C** : PanDC et parties dorsales du PanLM et PanV, grossissement x5, la barre jaune correspond à 200 μ m. **Image D** : PanDC, et partie dorsale du PanLM, grossissement x10, agrandissement de l'image C, la barre jaune correspond à 100 μ m. **Image E** : PanDC, grossissement x20, agrandissement de l'image D, la barre jaune correspond à 50 μ m. **Image F** : PanLM droit : grossissement x5, la barre jaune correspond à 100 μ m. **Image G** : PanLM droit, grossissement x10, agrandissement de l'image F, la barre jaune correspond à 50 μ m. **3V** : 3^{ème} ventricule, **Fx** : fornix, **V** : vaisseau sanguin.



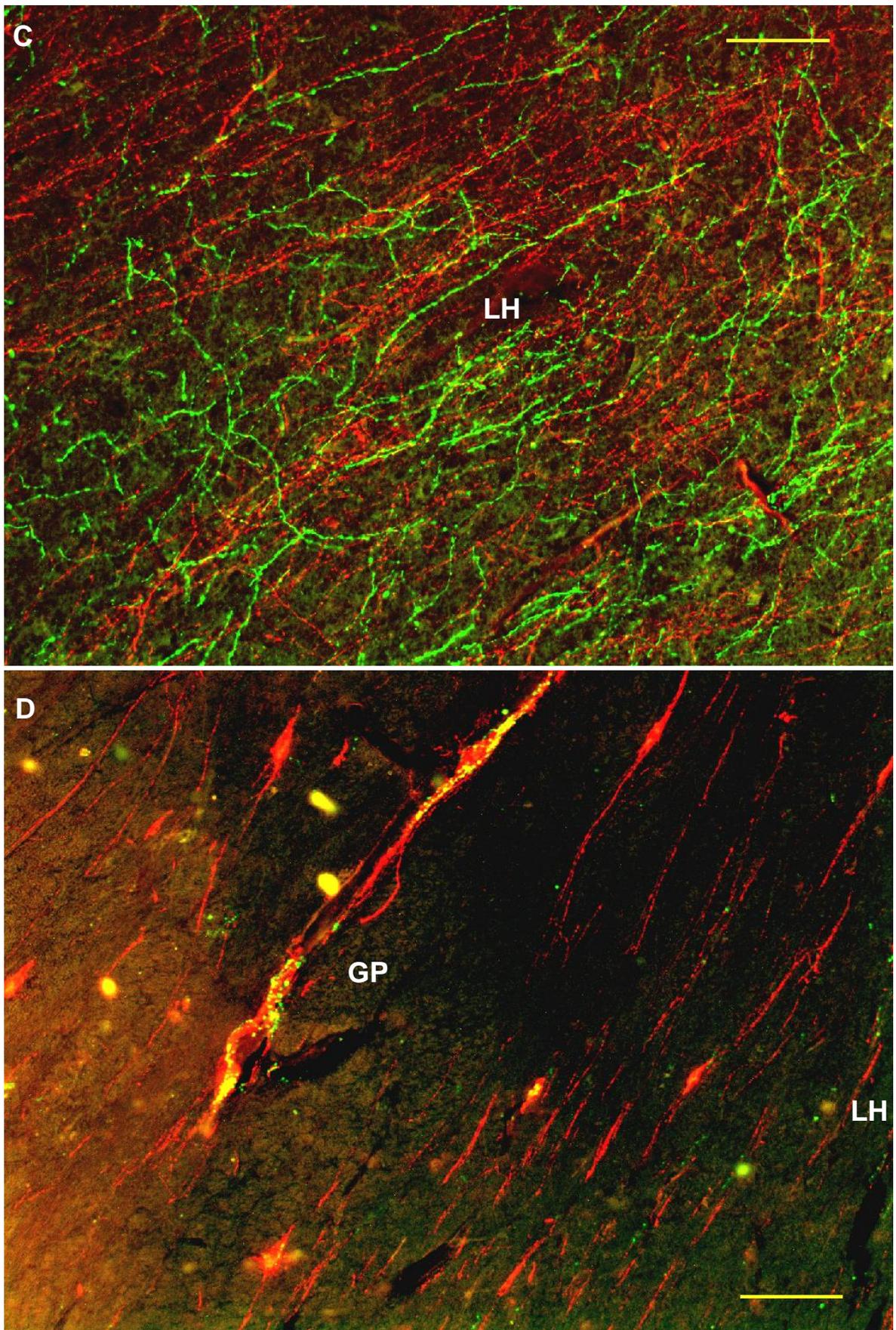


Figure 37 : Photomicrographies d'un double marquage montrant les fibres à AVP (rouges) et à OT (vert) originaires des PVN. Les fibres à OT traversent la subdivision des neurones à AVP : PanLM (Image A), certaines de ces fibres à OT et à AVP pénètrent le fornix (Image B) et parcourant l'hypothalamus latérale (Images C et D), d'autres contournent l'hypothalamus latéral et pénètrent le *globus pallidus*, où des magnoneurones à AVP sont alignés avec les fibres. **Image A** : x20, la barre jaune correspond à 100 μ m. **Image B** : x20, la barre jaune correspond à 90 μ m. **Image C** : x20, la barre jaune correspond à 100 μ m. **Image D** : x20, la barre jaune correspond à 80 μ m. **Fx** : fornix, **GP** : *globus pallidus*, **LH** : hypothalamus latéral.

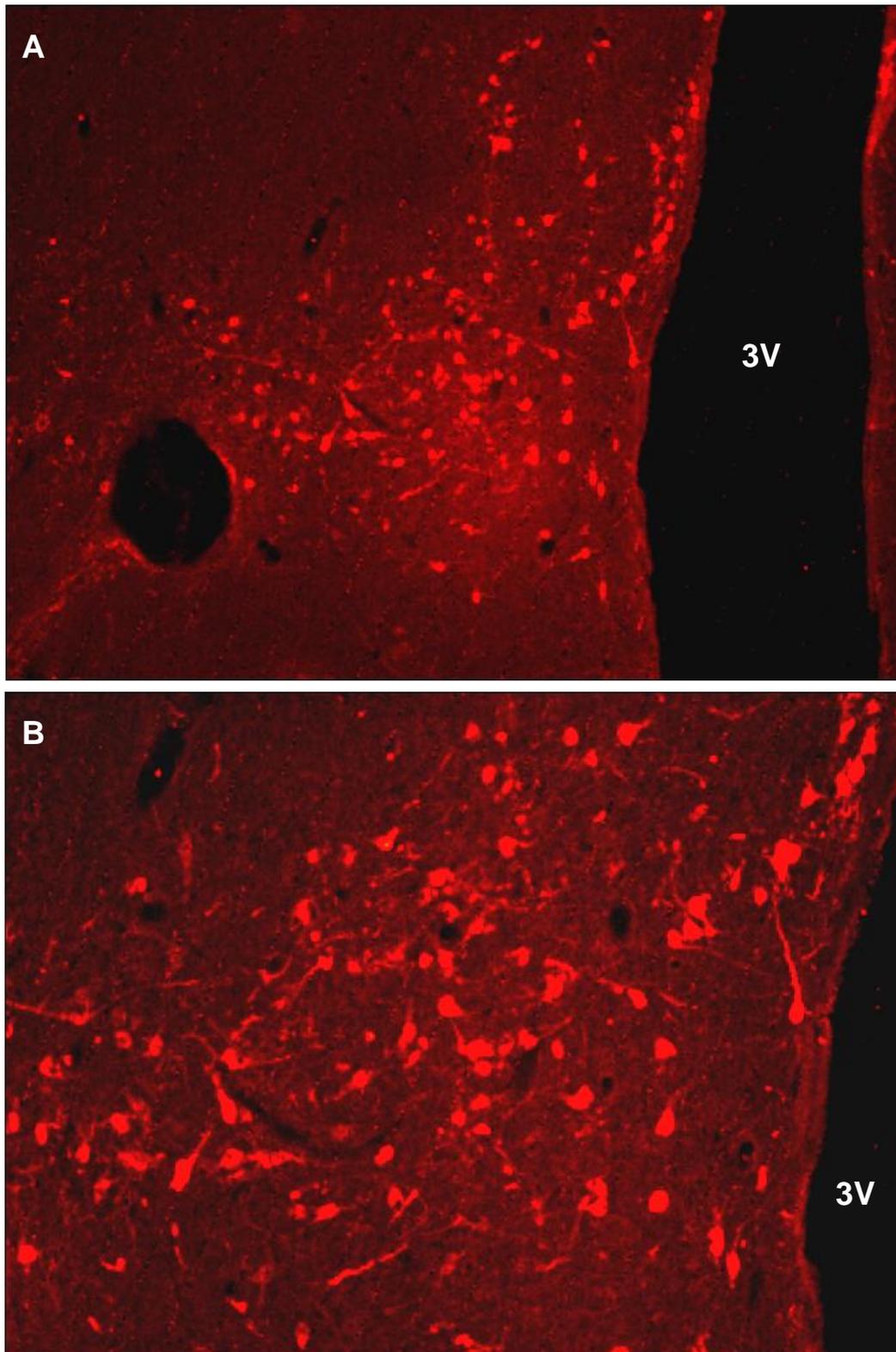


Figure 38 : Photomicrographies de la subdivision PanPO du PVN caudal après un immunomarquage pour l'OT. Le niveau de coupe correspond au plan H17 de la figure 11. À noter que sur ce niveau caudal, les neurones à OT persistent au niveau du PanPO. Image A : x 10 ; Image B. **3V** : 3^{ème} ventricule.

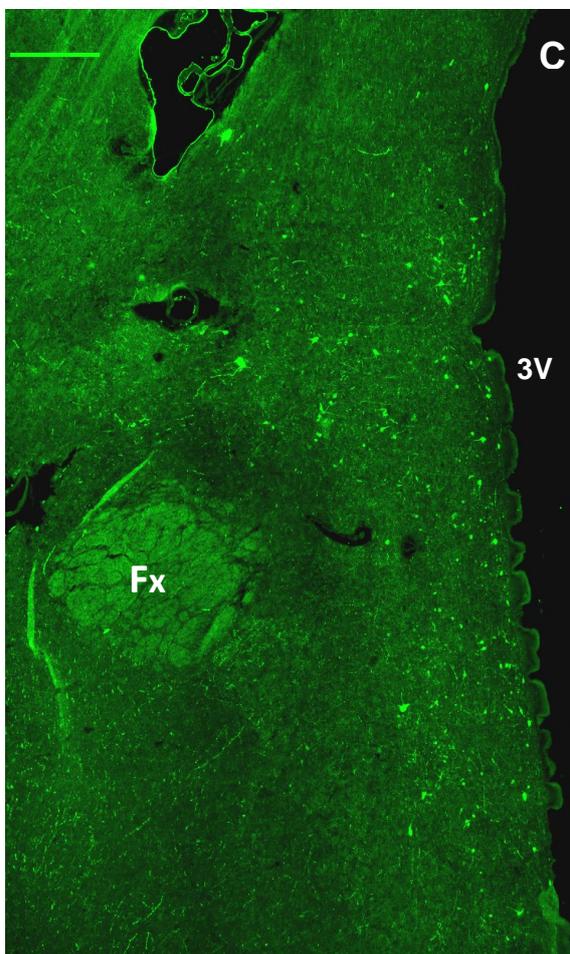
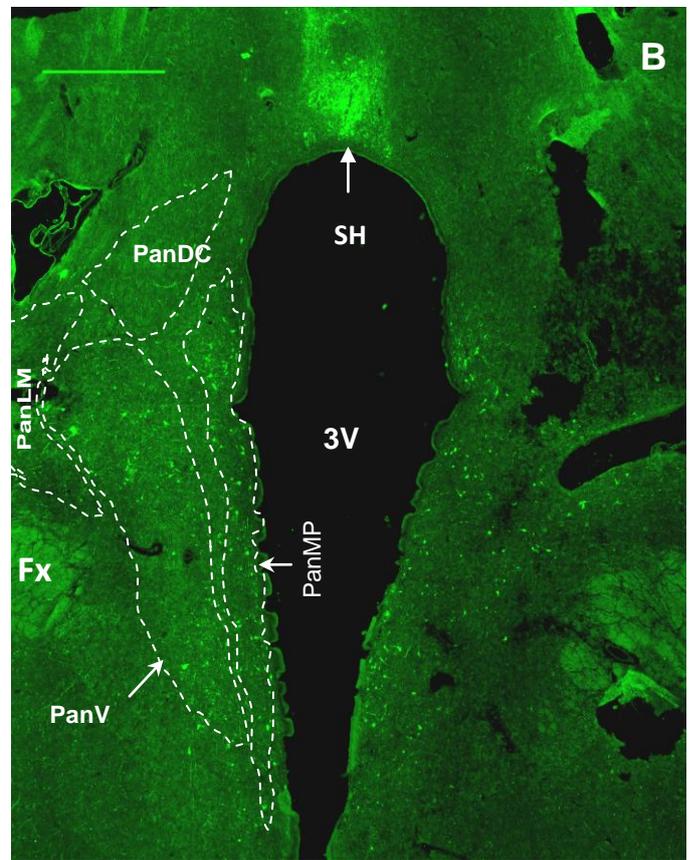
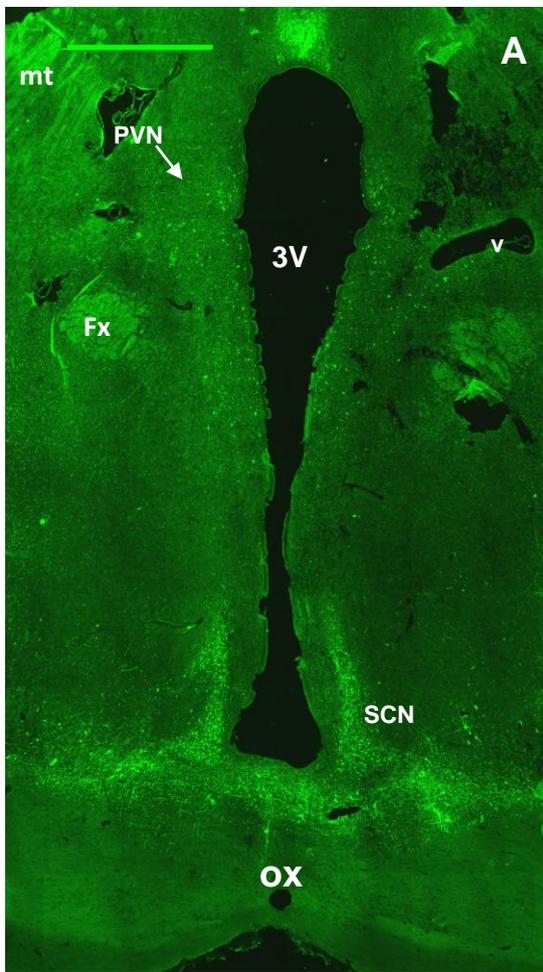
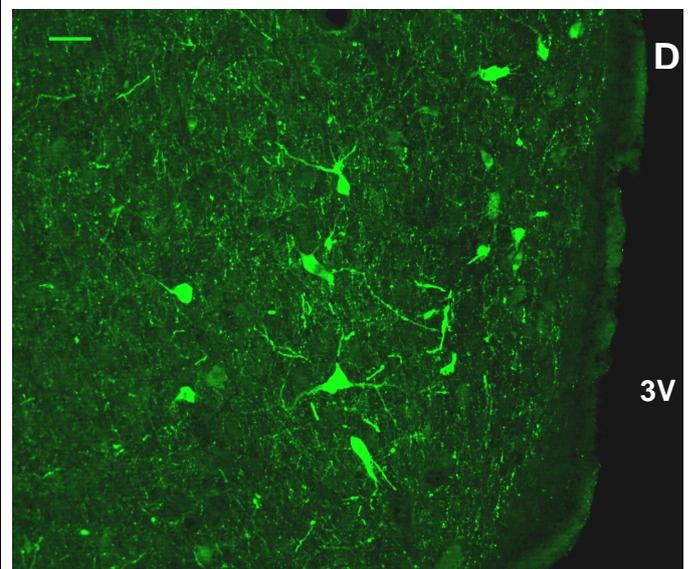


Figure 39 : Photomicrographies du PVN après un immunomarquage de la TH. Le niveau de coupe correspond au plan H9 de la figure 11. **Image A** : reconstitution à partir de 88 images, prises à un grossissement de x5, la barre verte correspond à 2000 μ m. **Image B** : agrandissement de l'image A, montrant les différentes subdivisions du PVN, la barre verte correspond à 1000 μ m. **Image C** : agrandissement de l'image B, montrant le marquage de la TH dans les neurones du PVN, la barre verte correspond à 500 μ m. **Image D** : grossissement de x10, la barre verte correspond à 50 μ m. Il est à noter que sur ce niveau de l'hypothalamus, les neurones à TH occupent les subdivisions PanLM et PanV du PVN. À noter également l'existence de neurones à TH avec une forte immunoréactivité dans le noyau septal (SH) : flèche indiquant 'SH' dans l'image B. **3V** : 3^{ème} ventricule, **Fx** : fornix, **ox** : chiasma optique, **mt** : tronc mamillo-thalamique, **PVN** : noyau paraventriculaire, **PanV** : subdivision ventrale, **PanMP** : subdivision des parvoneurones médiaux, **PanDC** : subdivision dorsale, **PanLM** : subdivision latérale des magnoneurones. **SCN** : noyau suprachiasmatique. **SH** : noyau septal, **V** : vaisseau sanguin.



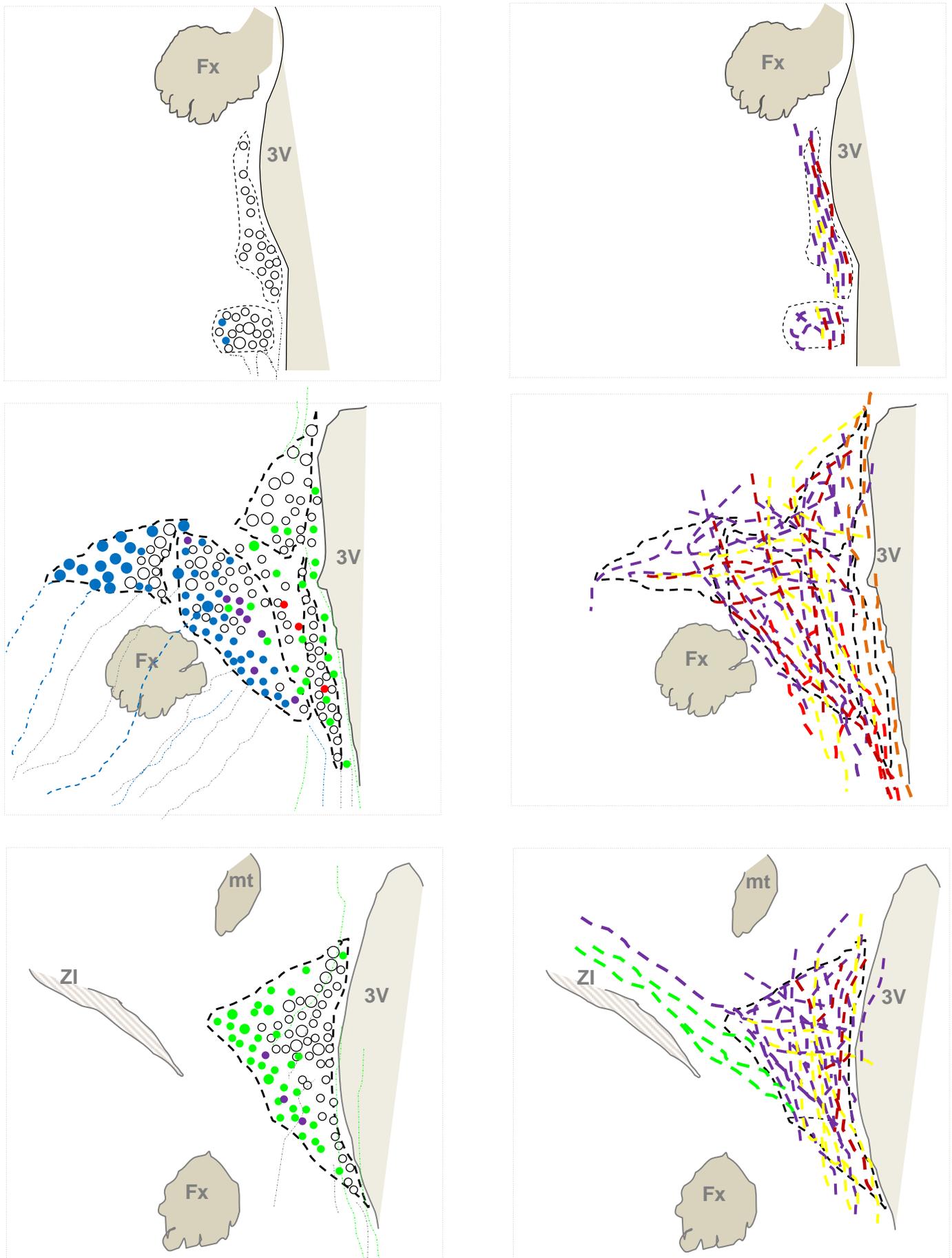


Figure 40 : Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le PVN du Dromadaire. En allant du haut vers le bas, le noyau est représenté par des coupes passant à différents niveaux rostro-caudaux. Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères ● : TH ● : AVP ○ : OT ● : VIP ● : Met-enk. Les fibres sont représentées par des traits discontinus : en point-tirets - - -. Quand il s'agit de fibres dont les péricaroyons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets : - - - : Met-enk - - - : TH - - - : VIP - - - : GAL - - - : 5HT - - - : NPY. 3V : 3^{ème} ventricule, Fx : fornix, mt : tronc mamillo-thalamique, ZI : zona incerta.

3. Hypothalamus médiobasal ou tubéral

3.1. Noyaux dorsomédians

3.1.1. *Description anatomique*

Le noyau dorsomédian (DMH) du Dromadaire est une structure paire, appartenant à la division tubérale de l'hypothalamus. Les DMH gauche et droit sont formés d'un amas de neurones localisés symétriquement de part et d'autre du 3V. L'apparition des premiers neurones du DMH, se fait ventro-médialement au fornix, à 10,5 mm de distance par rapport au plan de fusion des deux nerfs optiques (Figure 11 : plan H13). L'apparition du DMH coïncident avec la fin du PVN rostral et le début du PVN moyen qui est caractérisé par les quatre subdivisions (PanMP, PanV, PanDC et PanLM). En se dirigeant caudalement la densité des neurones augmente progressivement, et le noyau s'allonge longitudinalement en s'inclinant ventro-médialement. Il est caractérisé par sa forme allongée et sa direction oblique avec une extrémité ventro-médiale prolongée vers le 3V. Sur les différents niveaux de coupe rostro-caudale, le DMH entretient des rapports anatomiques constants qui permettent son identification. En effet son extrémité dorsolatérale est en contact avec le fornix et le corps du noyau juxtapose le PVN du côté dorsomédial : au niveau de la colonne périventriculaire rostralement, ensuite à la subdivision ventrale (PanV), caudalement (Figure 11 : plan 14 ; figure 35). Plus caudalement encore, le fornix continue sa descente ventrolatérale dans l'hypothalamus et le DMH se retrouve intercalé entre le fornix et le PVN (Figure 11 : plan H14', photomicrographie I₁ ; Figure 41).

En allant caudalement, le DMH garde la même forme allongée et oblique, mais se positionne un peu plus dorsalement et dorso-latéralement (Figure 11 : plan H15). Plus caudalement encore, la densité neuronale du DMH diminue. La disparition du noyau est notée au niveau du plan H17 à une distance de 12,7mm du niveau de la fusion des deux nerfs optiques (plan H0). Le DMH est un noyau important chez le Dromadaire mais très court. Son extension totale est de 2,2 mm.

Les neurones de DMH sont caractérisés par une affinité tinctoriale très élevée aux colorants utilisés. Cette affinité combinée aux rapports anatomiques du noyau avec le PVN et le fornix, rendent l'identification de celui-ci très facile. Les neurones du DMH correspondent à une majorité de magnoneurones mais aussi à une population de parvoneurones (Figure 41).

3.1.2. Contenu neuropeptidergique

- *Population neuronale :*

Les résultats des analyses par immunofluorescence montrent qu'une majorité de neurones de DMH sont des neurones à l'AVP et à l'OT. Ces deux neuropeptides se répartissent différemment dans ce noyau. Sur l'extrémité ventro-médiale juxtaposant le 3V, les neurones à AVP cohabitent avec ceux à OT (Figure 42). Mais en se dirigeant dorsalement, les neurones à AVP constituent une colonne longitudinale latérale à laquelle répond une autre colonne médiale et parallèle aux neurones à OT (Figure 42 : vue A et C ; figure 47). Les neurones à AVP les plus dorsaux, présentent une continuité avec des neurones similaires à AVP en position subfornicale qui appartiennent probablement au noyau périfornical (Figure 42 : vue A et C). La présence d'OT est importante dans le DMH, mais l'AVP présente une densité neuronale plus élevée.

Comme dans le cas du PVN, le DMH est formé rostralement par des neurones à OT et à AVP et ce n'est que caudalement que les neurones à TH apparaissent. Toutefois, ces neurones sont peu nombreux, ils s'entremêlent à des fibres qui sont plus nombreuses (Figure 44 ; 45 et 47).

De très rares neurones à met-enképhaline ont été également relevés dans le DMH du Dromadaire (Figure 47). Par contre, nous n'avons pas relevé de neurones immunoréactives aux autres neuropeptides étudiés à savoir le VIP, la GAL, 5HT et le NPY (Figure 47).

- *Fibres efférentes et afférentes :*

Des fibres à AVP et OT prennent origine dans le DMH et descendent obliquement (Figure 43) vers le VMH et le SON pour rejoindre celles provenant du PVN (Figure 35). Un nombre élevé de ces fibres traverse aussi le VMH (Figure 35, figure 42A). D'autres fibres à OT et AVP descendent ventralement vers l'ME (Figure 47).

Le DMH du Dromadaire est particulièrement innervé par des fibres à VIP. En effet, comme nous l'avons souligné précédemment, ce noyau reçoit un plexus de fibres en provenance du SCN. Celles-ci pénètrent le DMH et prennent la forme inclinée de ce noyau (Figure 46). Cette innervation n'est pas la seule à être importante ; car il y'a également des fibres à Met-enk, très denses qui arrivent et pénètrent ce noyau constituant également un paquet de fibres, de forme inclinée (Figure 45). D'autres fibres apparaissent également importantes dans ce noyau, notamment celles à NPY (Figure 45).

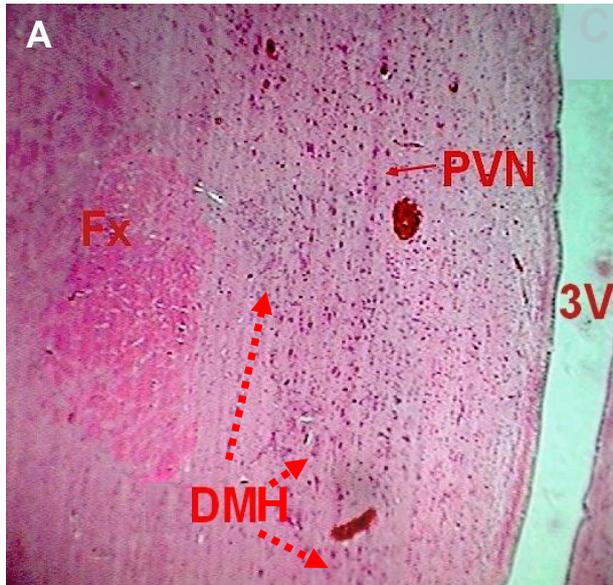


Figure 41 : photomicrographies illustrant la position et la cytologie du DMH. Le niveau de coupe correspond au plan H14 de la figure 11. À noter la position intercalée de ce noyau entre le fornix et le PVN et la forme allongée et oblique du noyau (A). Les neurones du DMH sont caractérisés par une affinité tinctoriale aux colorants utilisés (B et C). Les magnoneurones sont majoritaires par rapport aux parvoneurones (B et C). **3V** : 3^{ème} ventricule, **Fx** : fornix, **PVN** : noyau paraventriculaire, **DMH** : noyau dorsomédian. Image A : x4, H&E ; Image B : x16, H&E ; Image C : x40, H&E.

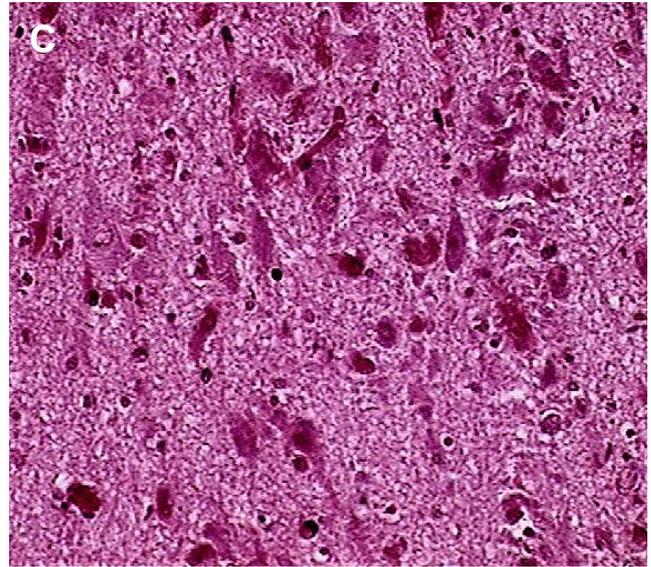
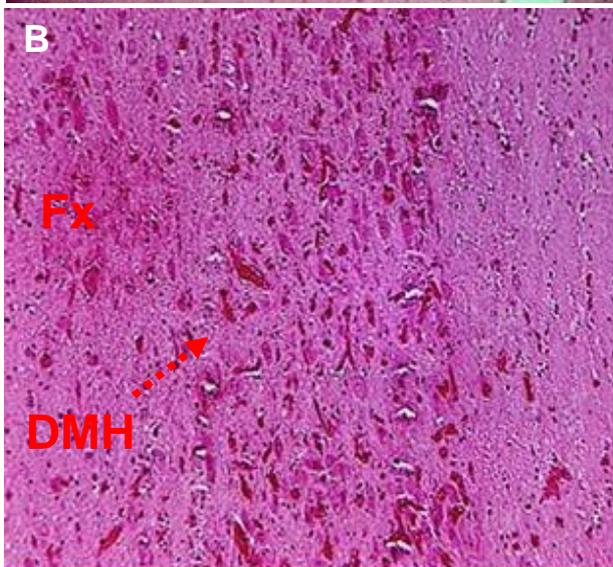
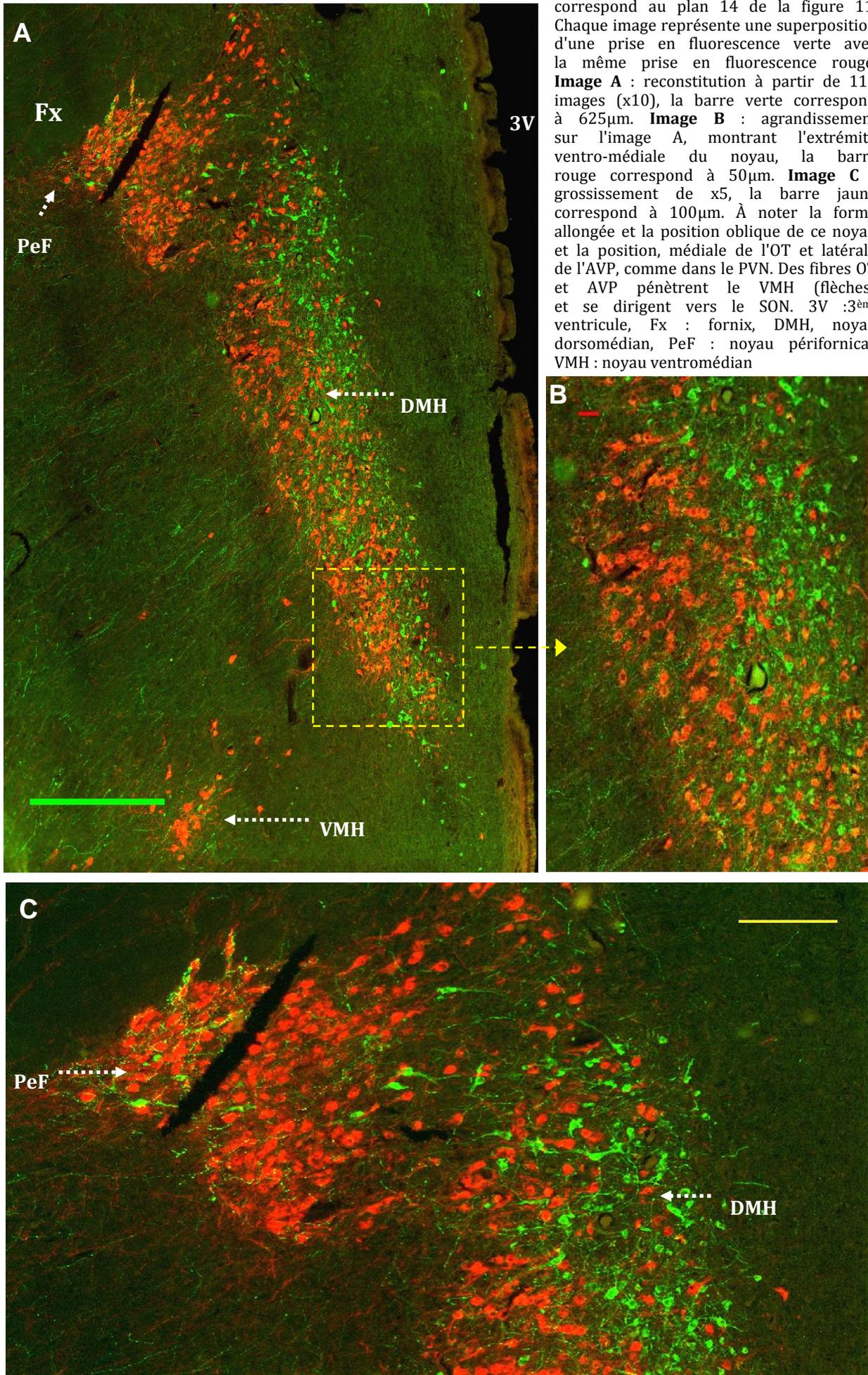


Figure 42 : Photomicrographies du DMH après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). Le niveau de coupe correspond au plan 14 de la figure 11.



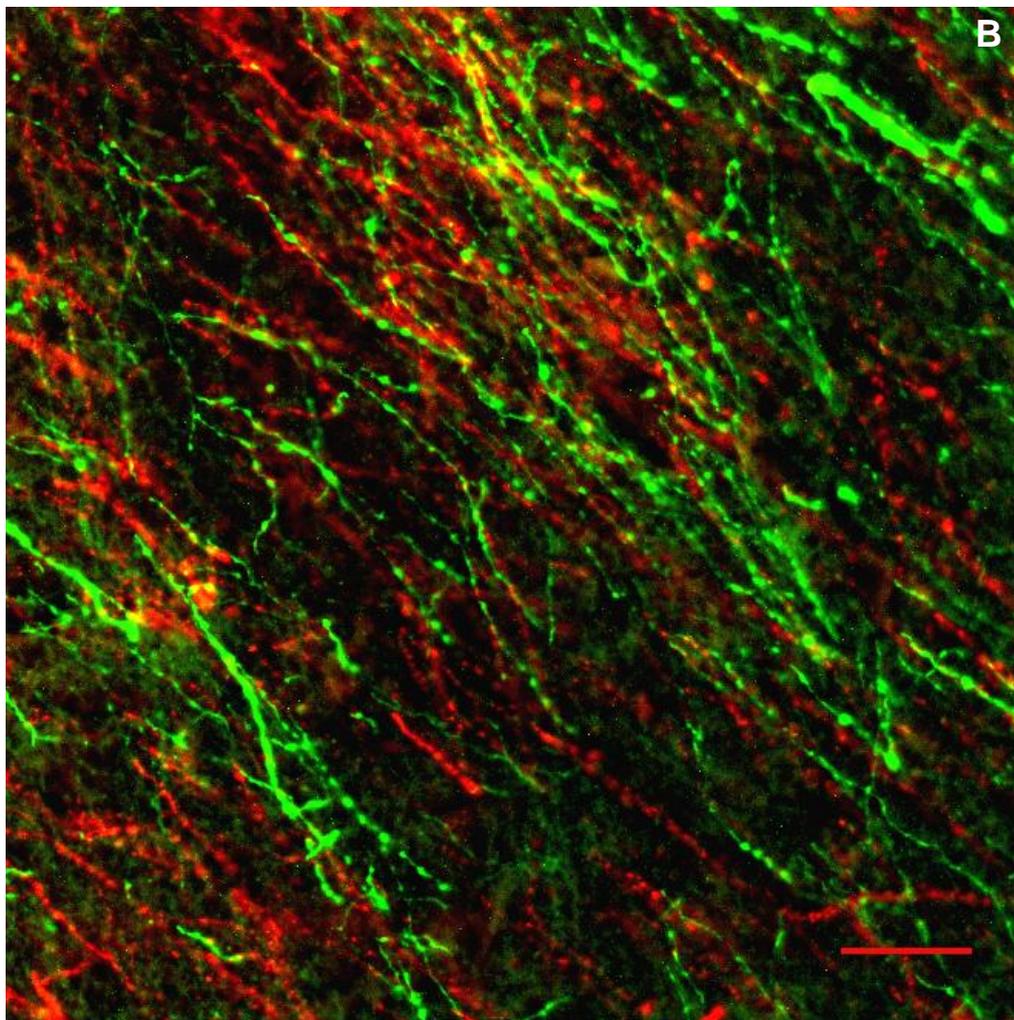
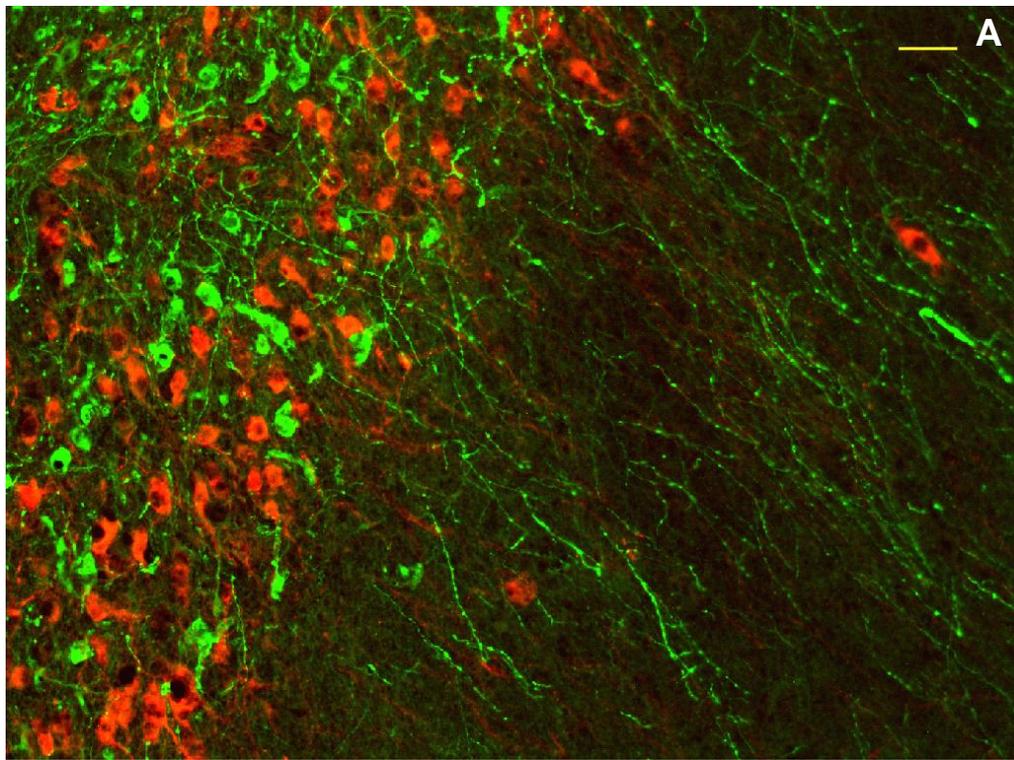


Figure 43 : Photomicrographies due DMH après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). Le niveau de coupe correspond au plan 14 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. **Image A** : grossissement x10, la barre jaune correspond à 50 μ m. **Image B** : agrandissement de l'image A, la barre rouge correspond à 50 μ m. À noter, la présence de magnocellulaires et parvocellulaires et la densité des fibres qui quittent le noyau.

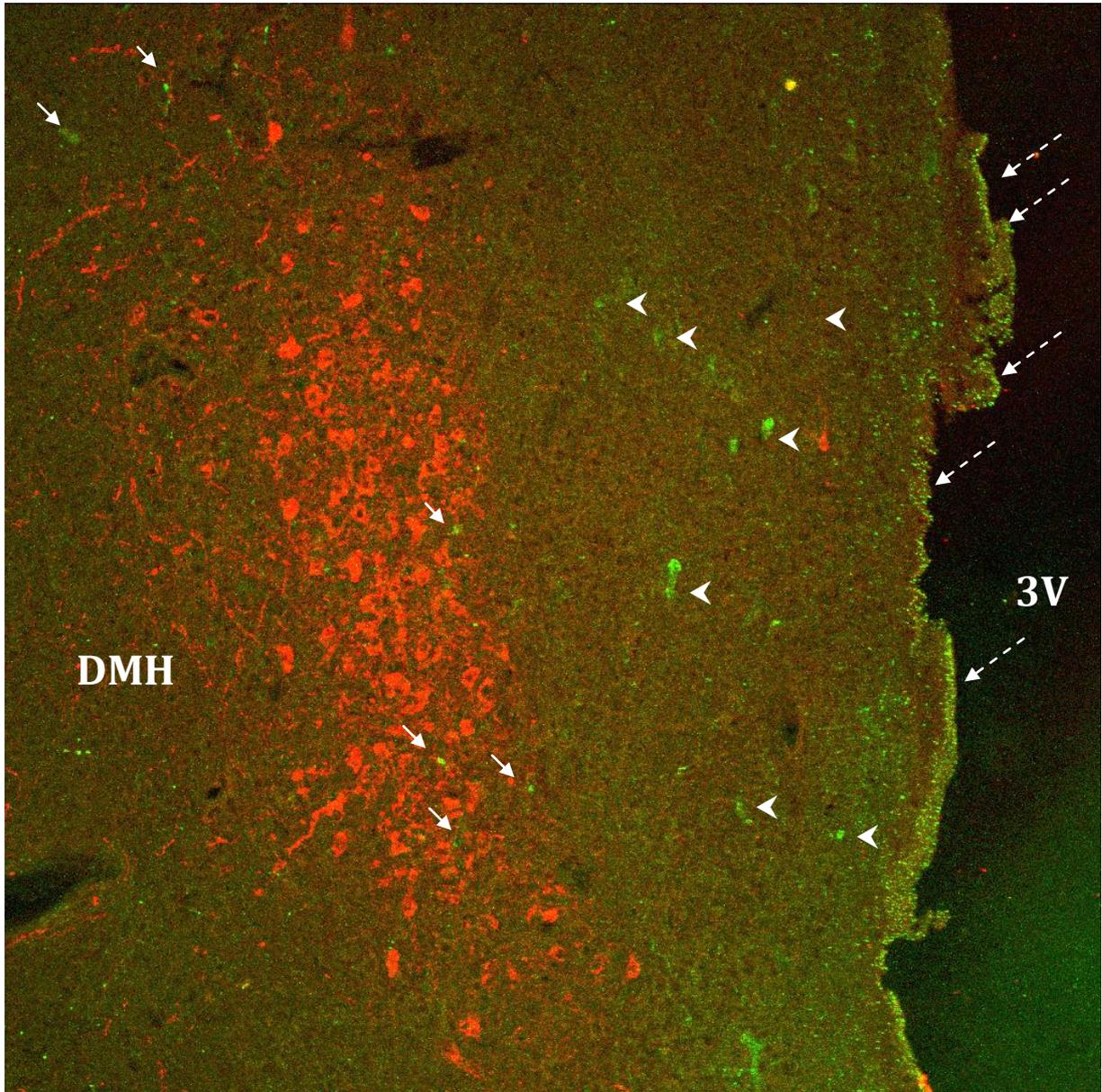


Figure 44 : Photomicrographie du DMH après un double marquage OT (rouge) et TH (vert) : grossissement x10. La coupe correspond à un niveau situé entre les plans 13 et 14 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. À noter, l'importance de la population de neurones à OT, et la présence de quelques neurones à TH dans le DMH (flèches) et dans la colonne périventriculaire du PVN (têtes de flèches). Des fibres supra-ependymaires à TH existent également le long du 3V (flèches discontinuées). 3V : 3^{ème} ventricule, DMH : noyau dorsomédian.

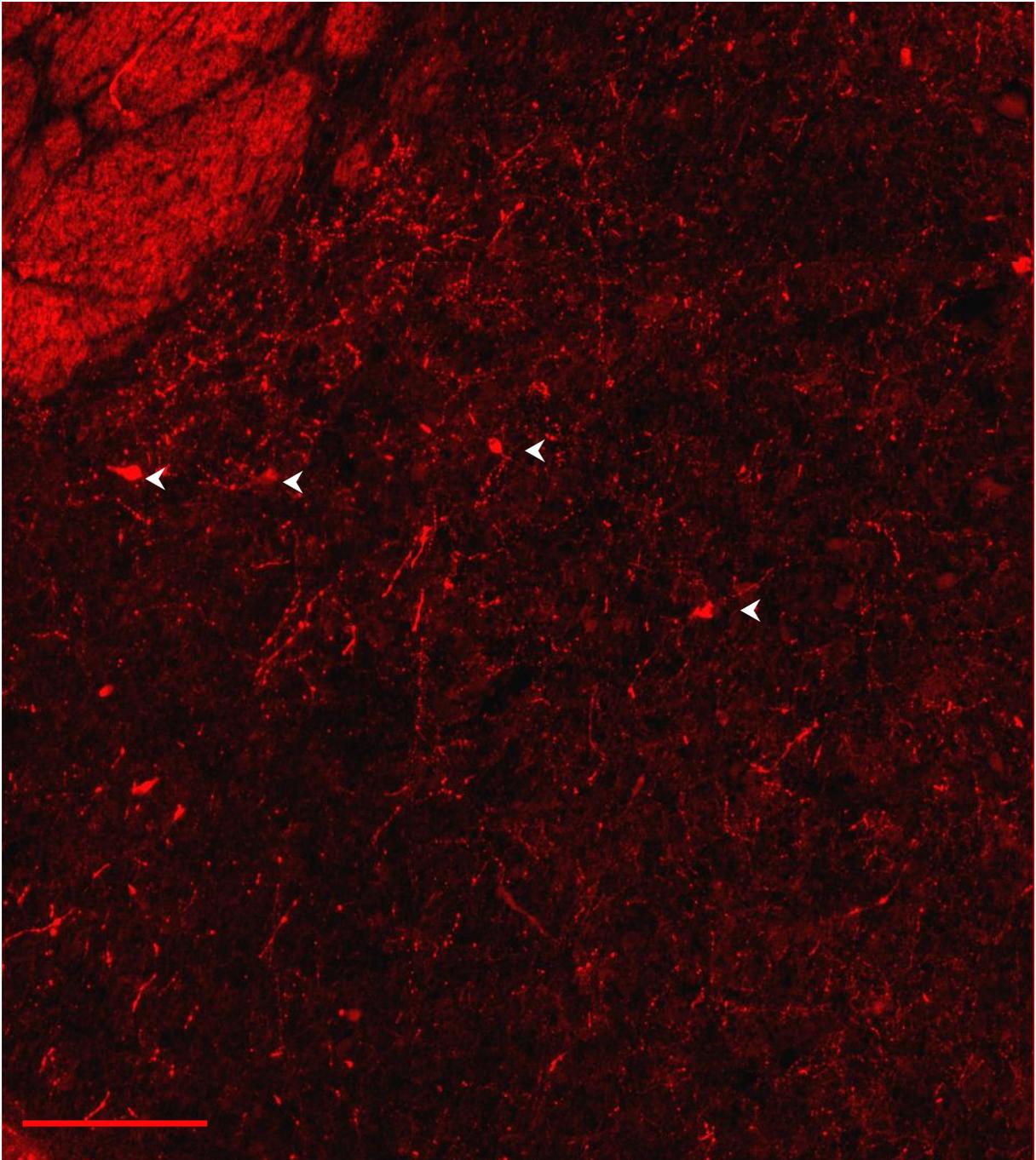


Figure 45 : Photomicrographie du DMH après un immunomarquage de TH (rouge). Il s'agit d'un agrandissement sur une reconstitution de 150 images, prises à un grossissement de x5, la barre rouge correspond à 200 μ m. À noter la présence de quelques rares neurones à TH (têtes de flèches) mais également d'un réseau dense de fibres immunoréactives dans ce noyau.

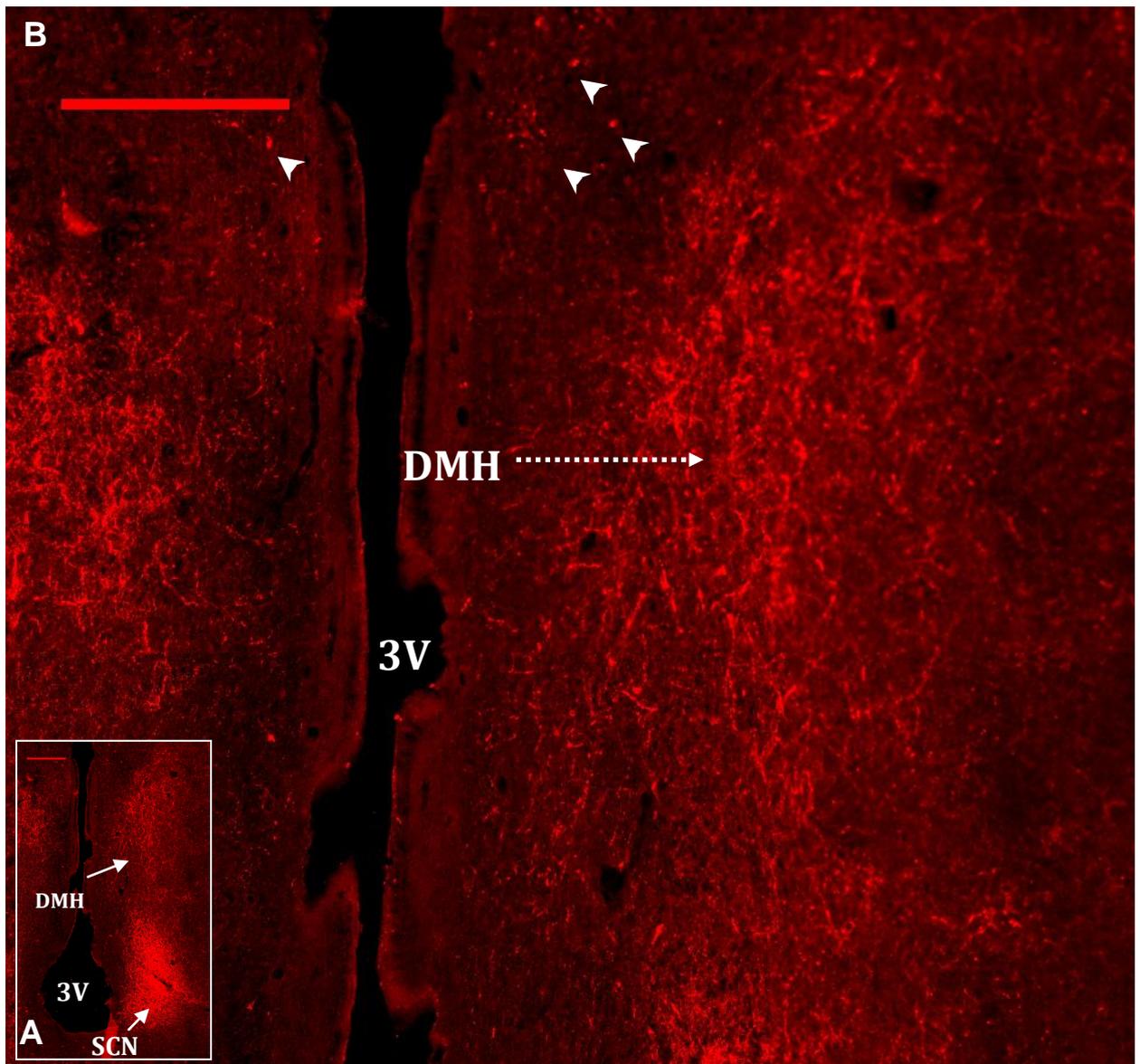


Figure 46 : Photomicrographie du DMH après un immunomarquage du VIP (rouge). **Image A** : reconstitution à partir de 180 images, prises à un grossissement de x10, la barre rouge correspond à 500 μ m. **Image B** : agrandissement sur l'image A, la barre rouge correspond à 500 μ m. À noter la densité des fibres à VIP originaires du SCN et pénétrant le DMH, en prenant sa forme inclinés. À noter également l'existence de quelques rares neurones à VIP dans le PVN (Têtes de flèches). **3V** : 3^{ème} ventricule, **DMH** : noyau dorsomédian, **SCN** : noyau suprachiasmatique.

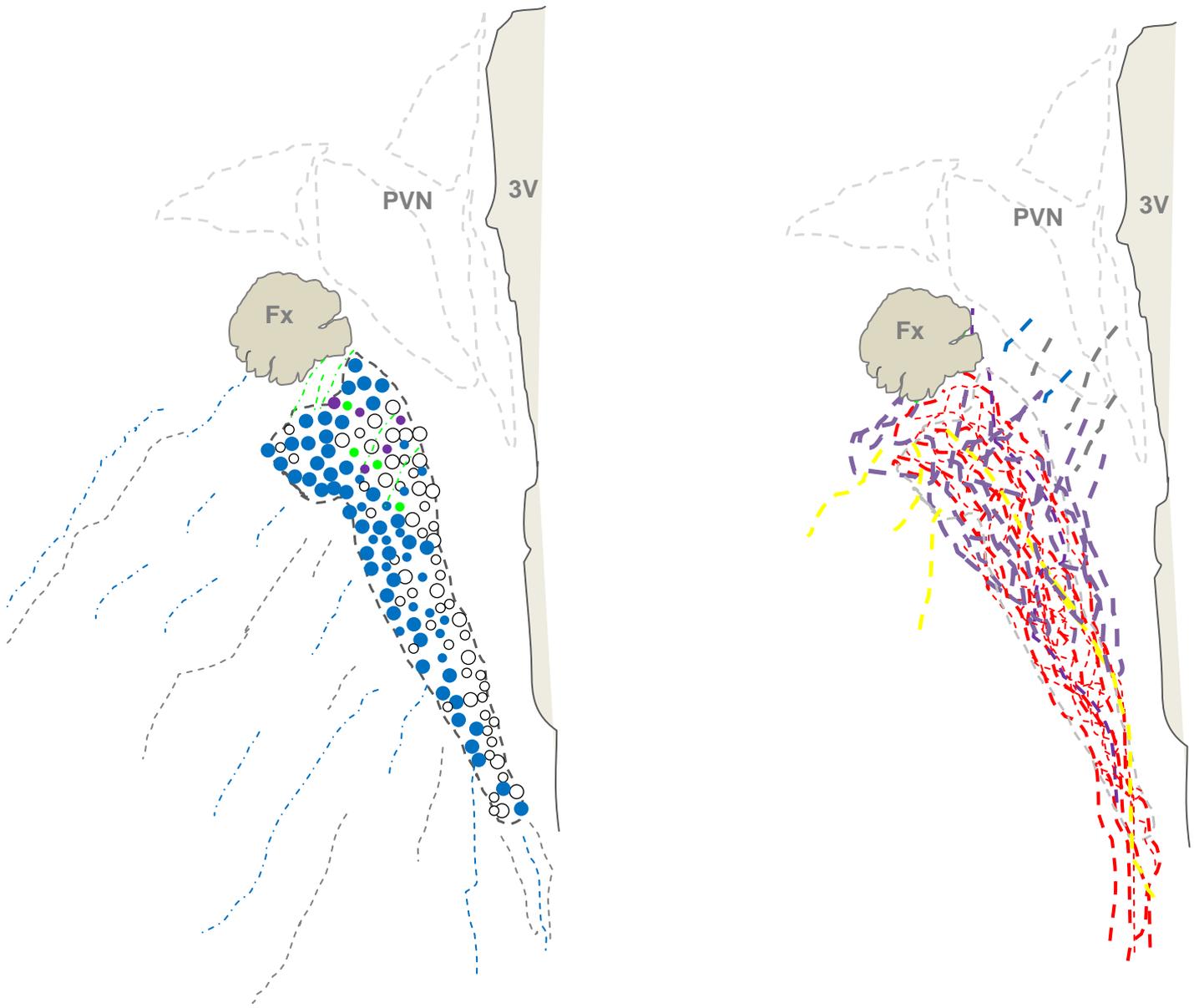


Figure 47 : Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le DMH du Dromadaire. Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères :

● : TH ● : AVP ○ : OT ● : Met-enk. Les fibres sont représentées par des traits discontinus : en point-tirets - - - . Quand il s'agit de fibres dont les péricaraxons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets : — — — : Met-enk — — — : VIP — — — : AVP — — — : OT — — — : NPY. **3V** : 3^{ème} ventricule, **Fx** : fornix, **PVN** : noyau paraventriculaire.

3.2. *Noyaux ventromédians*

3.2.1. *Description anatomique*

Le noyau ventromédian (VMH) appartient au groupe des noyaux de l'hypothalamus médiobasal, bien que chez le Dromadaire, sa partie rostrale appartient à l'hypothalamus antérieur. Ce noyau, paire, est le plus volumineux de cette région. Il évolue dans la partie hypothalamique ventrale, symétriquement par rapport au 3V. Sur une série de coupes coronales orientées rostro-caudalement, l'apparition du VMH est notée à une distance de 10,5 mm du plan de la fusion des deux nerfs optiques, H0 (Figure 11 : plan H13). En progressant caudalement, le volume du noyau augmente et montre d'autres populations neuronales mais plus diffuses. A ces niveaux de coupes, le noyau se confond avec l'hypothalamus latéral et les noyaux avoisinants (Figure 11 : plan H14). La régression du VMH est notée dans la région caudale de la subdivision hypothalamique tubérale. Ce stade est situé en moyenne à 14,4 mm du plan H0. L'extension totale du VMH est estimée à 4mm.

Le VMH est constitué de trois divisions distinctes :

- La partie ventrolatérale (VMHnVL) : elle apparaît en premier. Ses neurones ont une grande affinité tinctoriale et sont donc facilement reconnaissables (Figure 11 : plan H13 ; Figure 48). Au début, cette partie répond, dorsalement à la subdivision paPVN du PVN, latéralement à l'hypothalamus latéral (LH) et à son noyau accessoire magnocellulaire (MAN) et ventralement aux SCN (Figure 11 : plan13 et 51). Sur les coupes caudales, le VMHnVL répond, ventralement au noyau arqué et tubéral, latéralement au LH et MAN, et dorsalement aux deux autres parties du VMH (Figure 11 : plan13, 14, 14',15 ; figures 49, 51, 52, 53).

- En se dirigeant caudalement, les deux autres parties du VMH apparaissent : la partie intermédiaire ou centrale (VMHnC) et la partie dorso-médiane (VMHnDM) (Figure 11 : plan 14 ; figure 48, 49, 51, 52, 53 et 54). Les neurones de ces deux dernières parties sont diffus (coloration histologique) mais restent distinguables par immunofluorescence. Le VMHnC et VMHnDM présentent les rapports anatomiques suivants : ventralement avec la partie VMHnVL, dorsalement avec le DMH, dorso-latéralement avec le fornix et à son noyau (PeF), médialement avec le noyau périventriculaire et latéralement avec l'hypothalamus latéral et l'aire du *tuber cinereum* (caudalement) (Figure 11 : plan 14 à 17 ; figures 49, 51, 53 et 54).

3.2.2. Contenu neuropeptidergique

Comme le SON, PVN et DMH, le VMH est un noyau riche en neurones à AVP et à OT. Sur des niveaux rostraux (niveau du plan 14 de la figure 11) ceux-ci ne sont présents que dans les subdivisions VMHnDM et VMHnC (Figure 49 et 54). Dans ces deux subdivisions la répartition des neurones est différente. Le VMHnDM contient des neurones immunoréactifs uniquement à l'AVP alors que le VMHnC comprend à la fois des neurones à AVP et des neurones à OT (Figure 49 et 54). Les neurones à AVP sont situés dorso-médialement et ceux à OT ventro-latéralement. Ce n'est que caudalement que des neurones immunoréactives à AVP apparaissent dans l'autre subdivision du VMH, la VMHnVL. En effet, sur les niveaux de coupe correspondant au plan 14' de la figure 11 les neurones à AVP apparaissent et occupent une large surface du VMHnVL (Figure 51 et 54). Cette subdivision reste par contre dépourvue de neurones à OT. Sur ces mêmes niveaux de coupe (plan 14'), le VMHnDM contient encore quelques neurones à AVP et OT alors que le VMHnC est dépourvu de ce type de neurones.

Une grande densité de neurones immunoréactifs à la TH a été observée dans le VMH (Figure 52, 53 et 54). Rostralement, ces neurones à TH occupent particulièrement le VMHnVL et VMHnC (Figure 52 et 54) ; caudalement, la plus grande densité de ces neurones occupe une large surface correspondant au VMHnC (Figure 53 et 54). Plus caudalement encore, une nouvelle population composée de grands magnoneurones fusiformes à TH apparait, elle est située entre le VMH et le noyau tubéral.

Comme a été rapporté précédemment, certaines fibres OT et AVP du VMH descendent obliquement vers le SON tandis que d'autres projettent dans l'éminence médiane. De même des fibres à TH empruntent la bordure externe de l'éminence médiane. Par ailleurs, des fibres denses à Met-enk et NPY ont été relevées dans le VMH du Dromadaire (figure 54). Il est à souligner que quelques fibres à GAL ont été observées dans ce noyau, mais leur densité reste insignifiante par rapport aux mêmes fibres dans les autres noyaux notamment ceux qui sont périventriculaires (SCN, DMH, PVN).

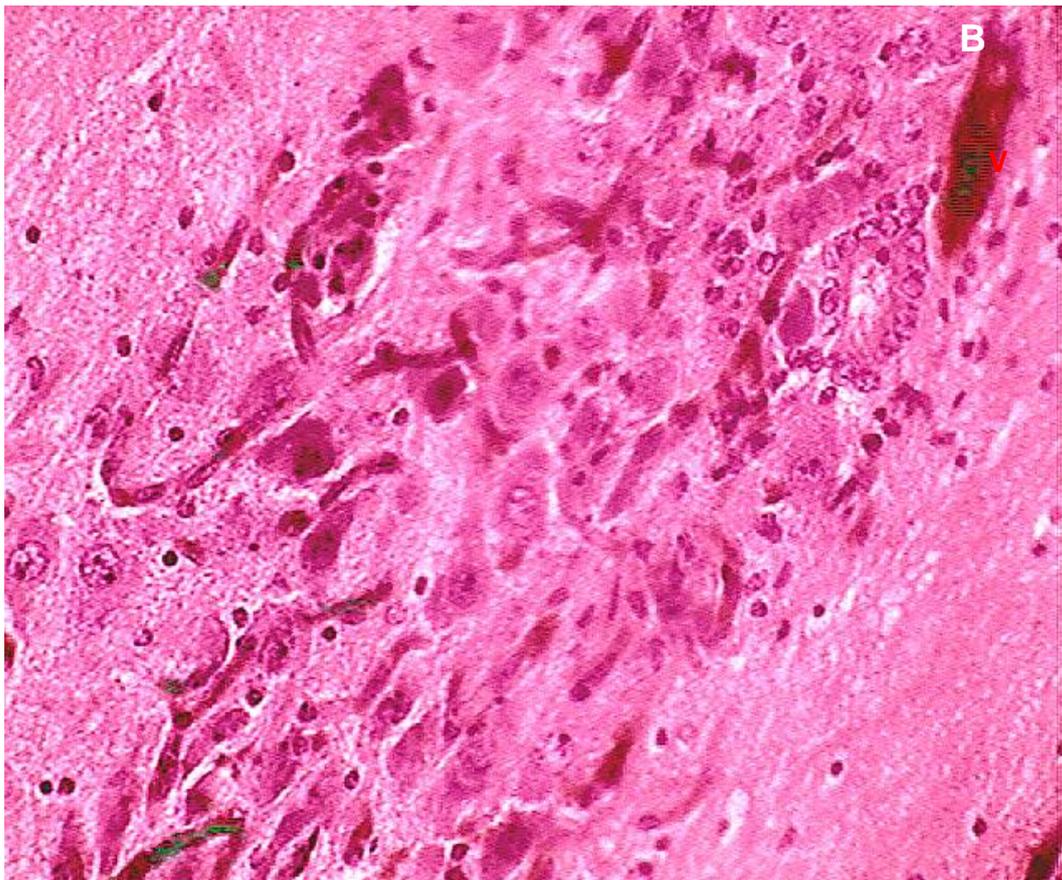
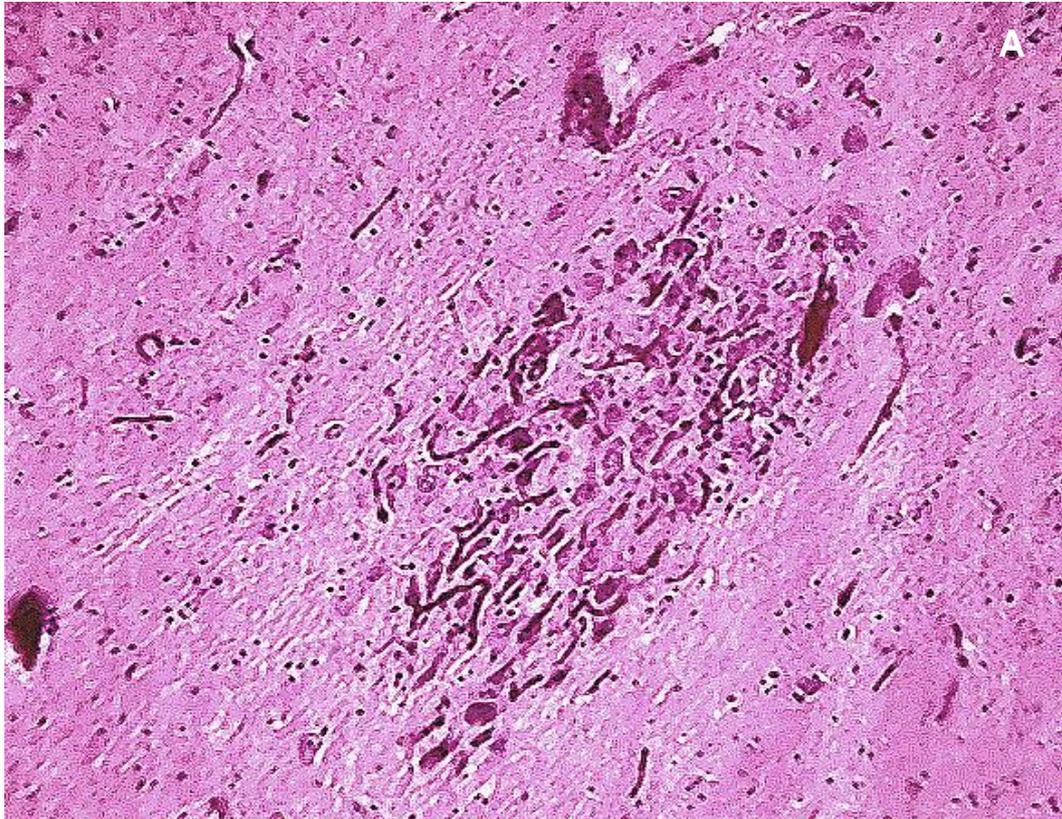


Figure 48 : photomicrographies du début du VMH avec l'apparition de la partie ventrolatérale (VMHnVL). Le niveau de la coupe correspond au plan 13 de la figure 11. À noter l'existence d'une majorité de magnoneurones. V : vaisseau sanguin. Image A : grossissement x16, H&E. Image B : grossissement x40, H&E.

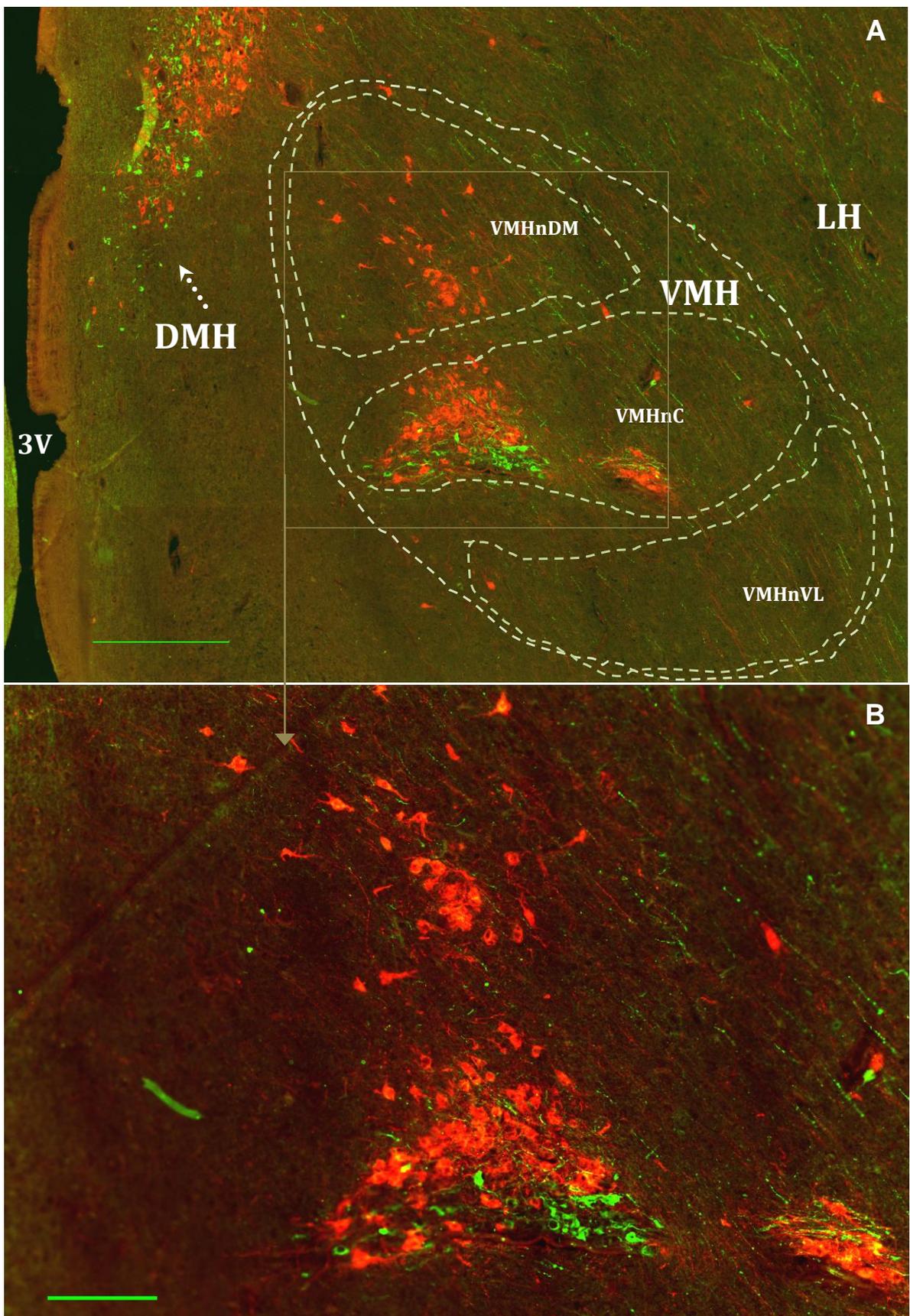


Figure 49 : Photomicrographies du VMH après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). Le niveau de coupe correspond au plan 14 à 14' de la figure 15. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. **Image A** : reconstitution à partir de 16 images, prises à un grossissement de x10, la barre verte correspond à 500 μ m, les pointillés correspondent à limite du VMH et ses subdivisions. **Image B** : tirée d'une reconstitution de 16 images prises à x20 ; elle représente un agrandissement (partie encadré) sur l'image A, la barre verte correspond à 200 μ m. À noter l'importance des neurones AVP dans le VMHnDM et VMHnC et l'absence sur ces niveaux de coupe rostrale, de marquage dans le VMHnVL. À noter aussi, les fibres provenant du DMH et descendant obliquement vers le SON. **3V** : 3^{ème} ventricule, **DMH** : noyau dorsomédian, **LH** : hypothalamus latéral, **VMH** : noyau ventromédian avec ses trois subdivisions : La partie ventrolatérale (**VMHnVL**), la partie intermédiaire ou centrale (**VMHnC**) et la partie dorso-médiane (**VMHnDM**).

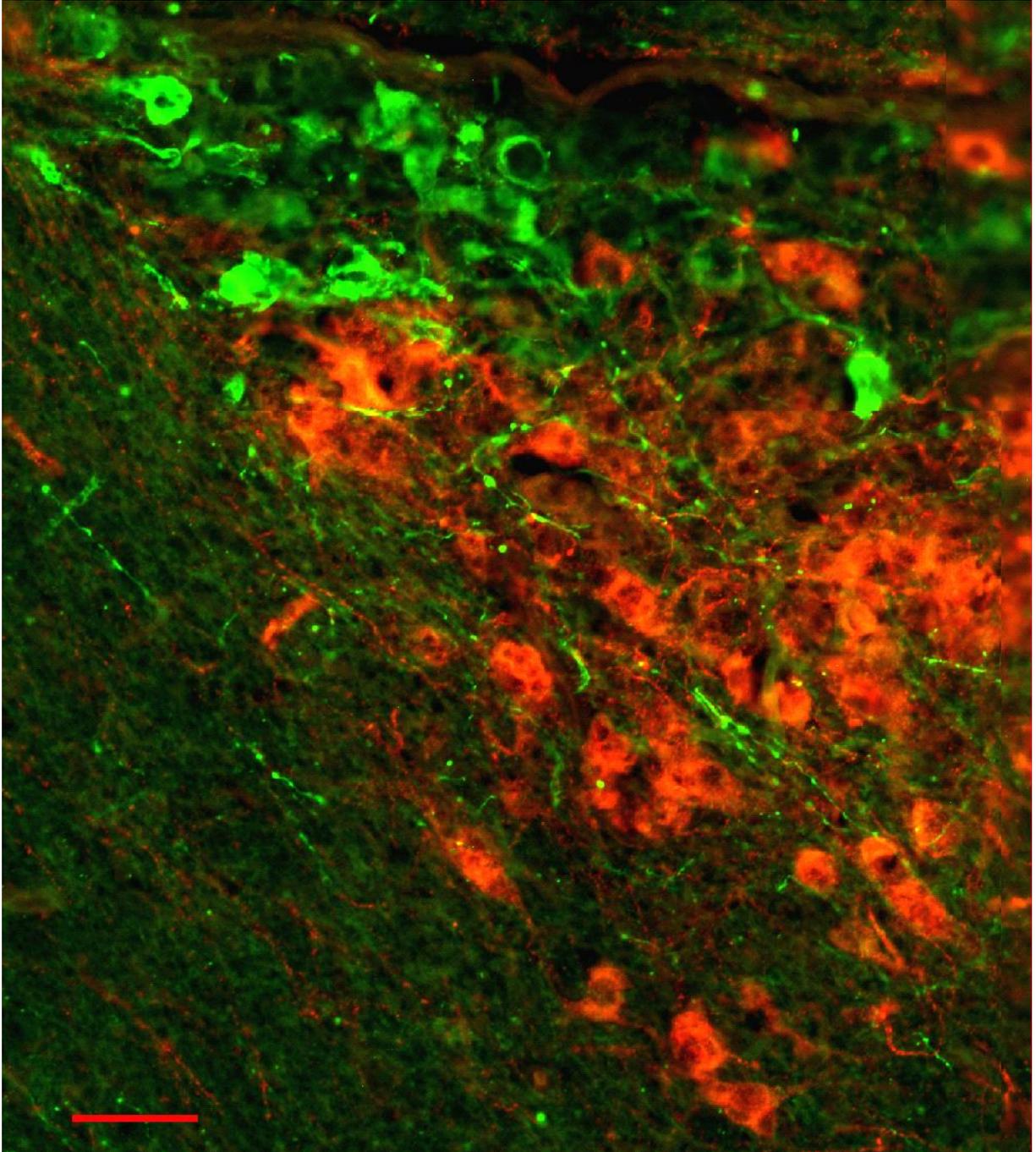


Figure 50 : Photomicrographie des neurones du VMHnC après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). L'image est un agrandissement de l'image B de la figure 49 et représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. La barre rouge correspond à 50 μ m. Il est à souligner la prédominance de magnoneurones à AVP dans cette partie du VMH.

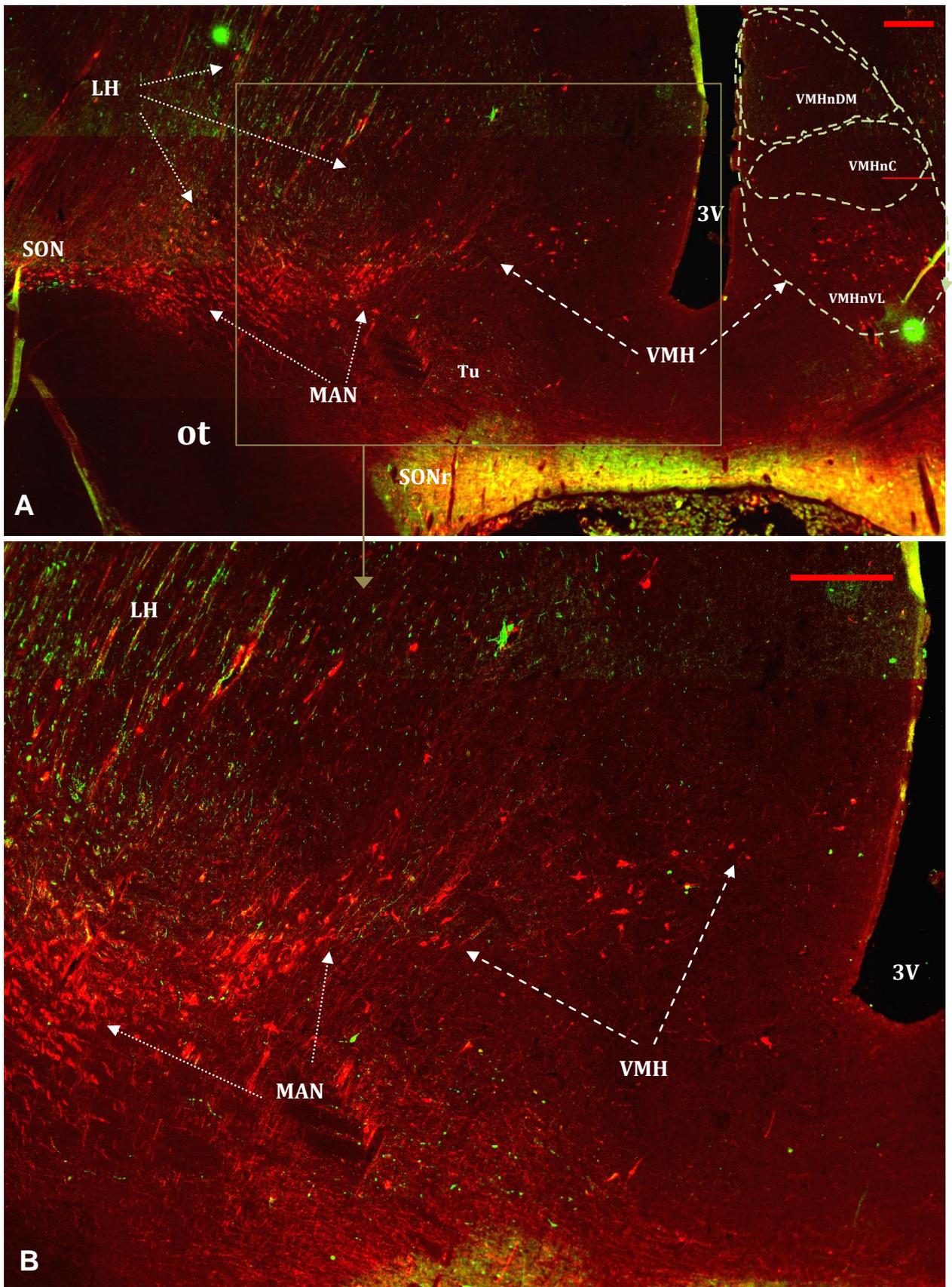


Figure 51 : Photomicrographies de la subdivision VMHnVL du noyau ventromédian après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). La coupe correspond à un niveau intermédiaire entre les plans 14' et 15 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. **Image A** : reconstitution à partir de 20 images, d'un grossissement de x5, la barre rouge correspond à 500µm. **Image B** : agrandissement (partie encadrée) sur l'image A, la barre rouge correspond à 500µm. Il est à noter que le VMHnVL ne contient pas de neurones OT, seuls des neurones à AVP existent. À noter également, l'existence de magnoneurones AVP dans le noyau accessoire magnocellulaire de l'hypothalamus latéral (MAN). 3V : 3^{ème} ventricule, LH : hypothalamus latéral, MAN : noyau accessoire magnocellulaire, ot : tronc optique, SON : noyau supra-optique, SONr : partie rétrochiasmatique du SON, VMH : noyau ventromédian, sa partie ventrolatérale (VMHnVL), sa partie intermédiaire ou centrale (VMHnC) et sa partie dorso-médiane (VMHnDM).

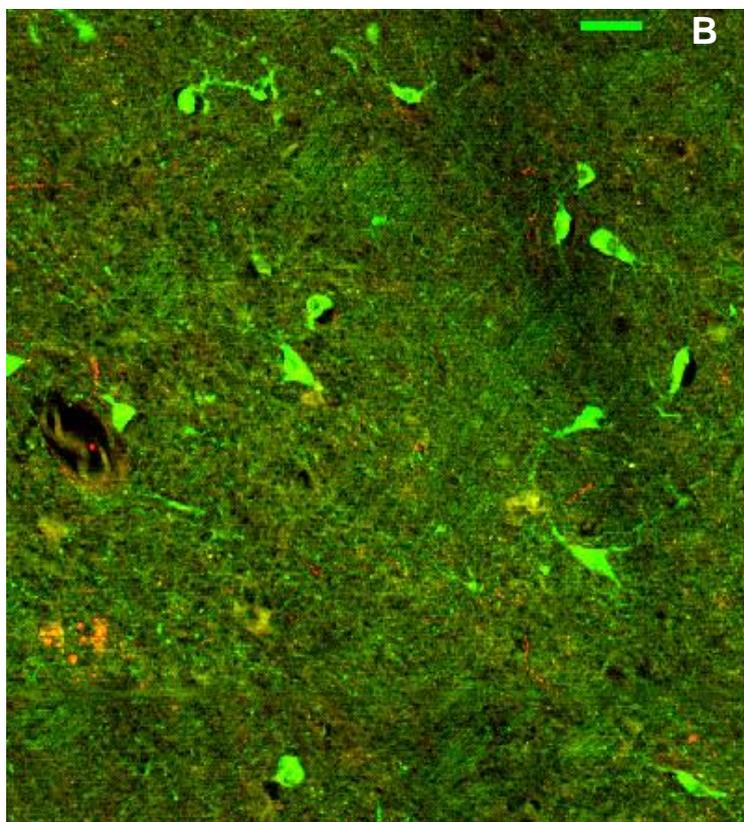
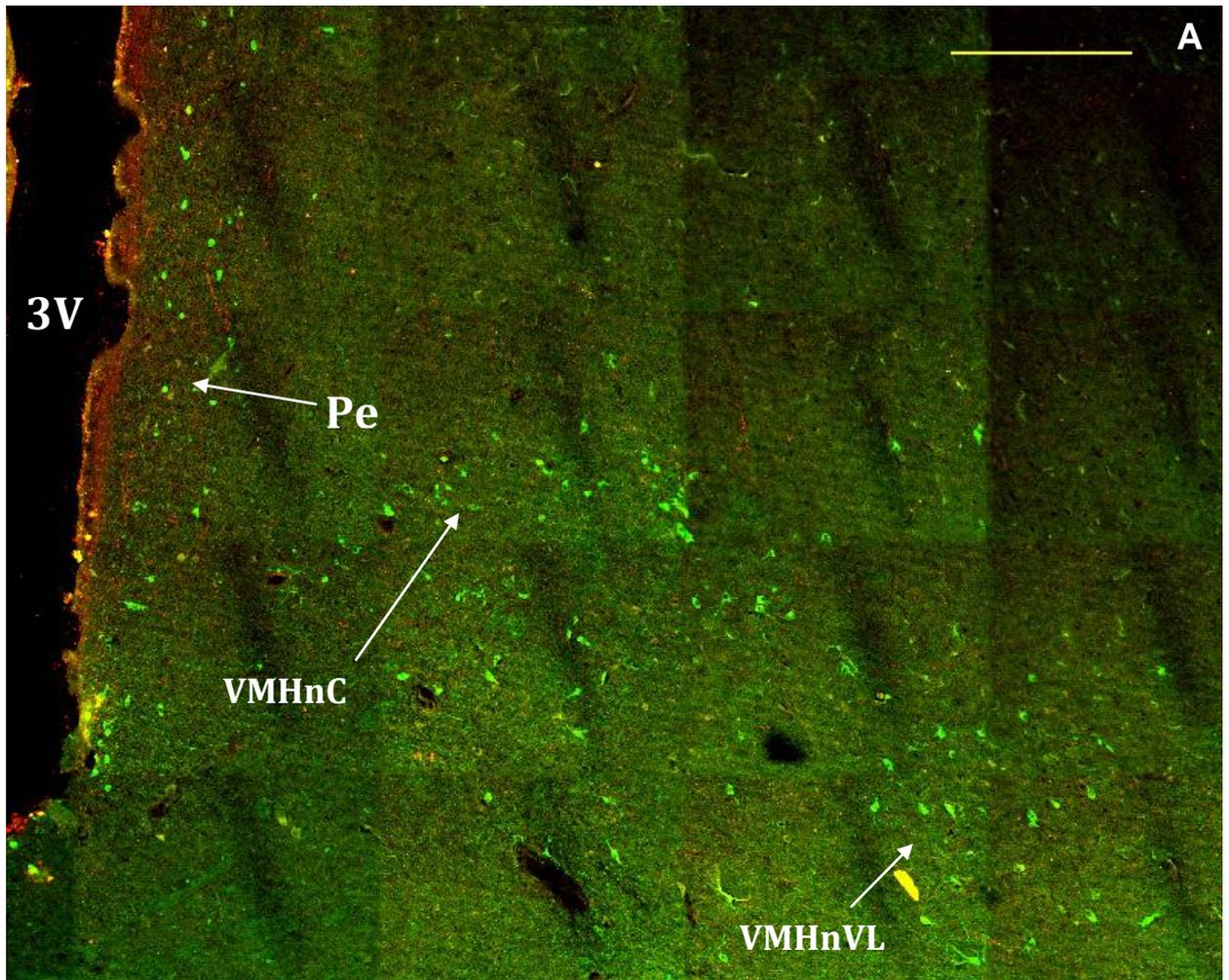


Figure 52 : Photomicrographies du VMH après un double marquage TH (Vert) et VIP (rouge). La coupe correspond à un niveau intermédiaire entre les plans 13 et 14 de la figure 11. Chaque photomicrographie représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. **Image A** : reconstitution à partir de 16 images prises à un grossissement de x10, la barre jaune correspond à 500 μ m. **Image B** : agrandissement sur l'image A, la barre verte correspond à 50 μ m. À noter la présence de parvoneurones et magnoneurones à TH dans le VMHnVL ainsi que des neurones à TH dans le SCN rétrochiasmatique et le noyau périventriculaire. Seules quelques fibres à VIP existent sur ces niveaux. **3V** : 3^{ème} ventricule, **Pe** : noyau périventriculaire, **VMHnVL** : partie ventrolatérale du noyau ventromédian (VMH), **VMHnC** : partie intermédiaire ou centrale du VMH.

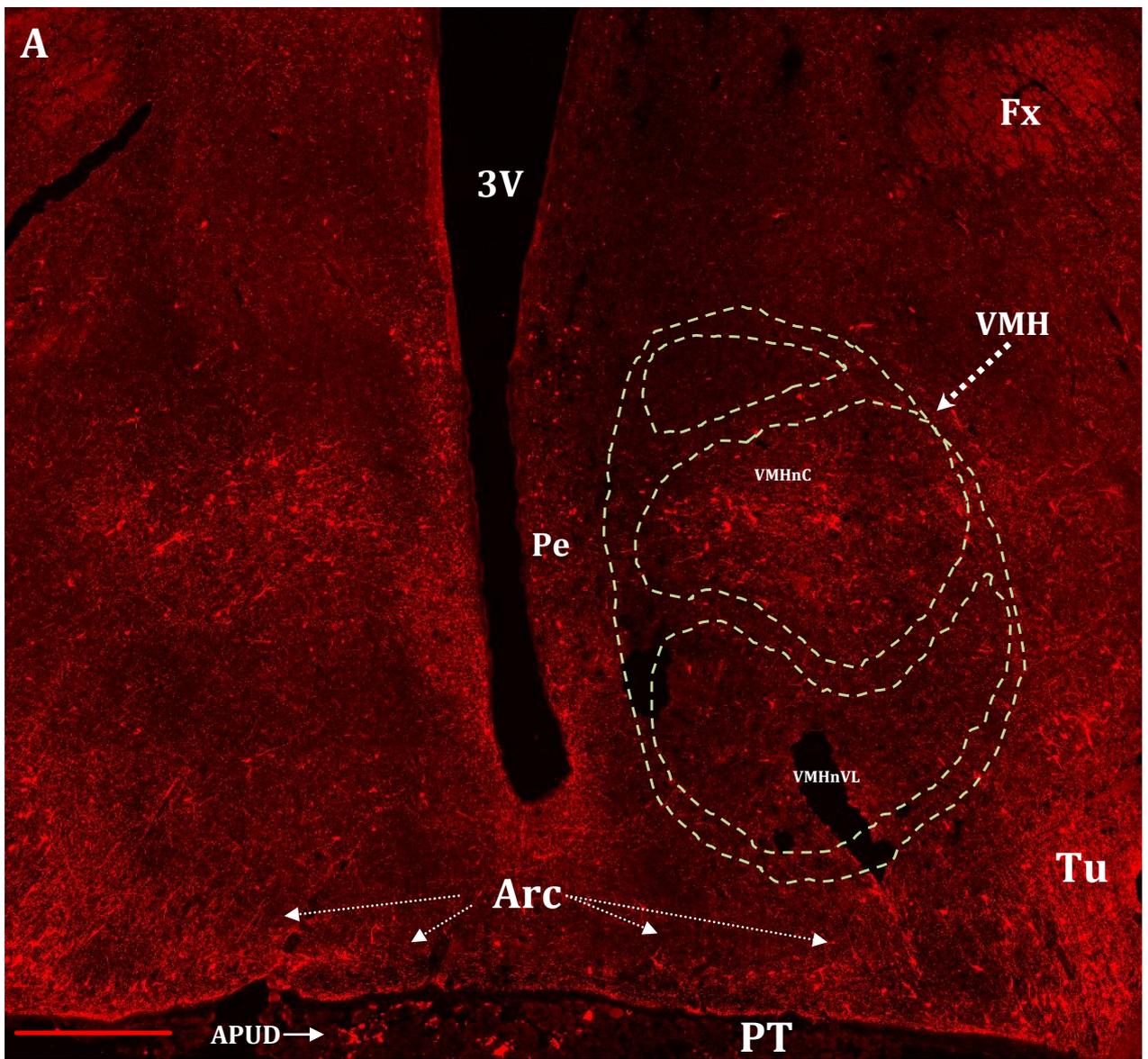
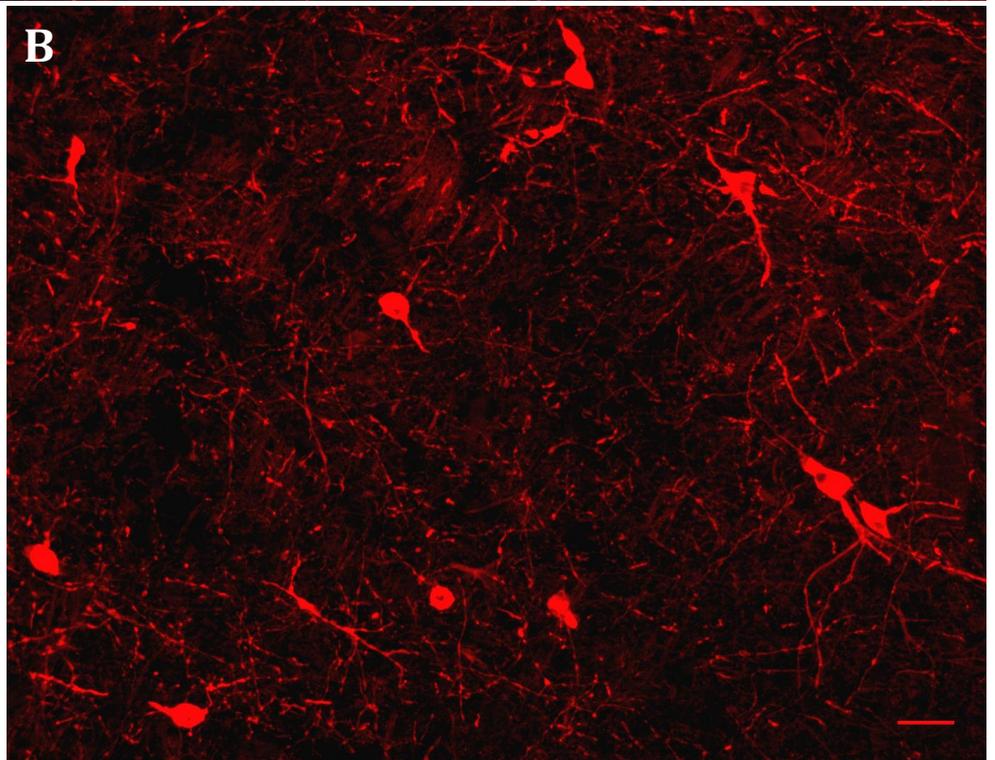


Figure 53 : Photomicrographies du VMH après un immunomarquage de la TH. Coupe correspondant à un niveau intermédiaire entre le plan 14'et 15 de la figure 11. **Image A** : reconstitution à partir de 256 images prises à x5. La barre rouge correspond à 1000µm. Les pointillés correspondent à la limite du VMH et ses subdivisions. **Image B** : x10 représentant une partie (encadrée) de l'image A, la barre rouge correspond à 50µm. À noter que sur ces niveaux caudaux, la plus importante population des neurones TH dans le VMH existe au niveau de la subdivision, VMHnC. A



noter également, l'importance des neurones à TH dans le noyau arqué et le noyau tubéral et l'existence de quelques cellules de la pars tuberalis (PT) immunoréactives à la TH : ce sont des cellules de type APUD (Amine precursor uptake decarboxylase cell). 3V : 3^{ème} ventricule, Arc : noyau arqué, Fx : fornix, Pe : noyau périventriculaire, PT : pars tuberalis de l'adénohypophyse, Tu : noyau tubéral, VMH : noyau ventromédian, sa partie ventrolatérale (VMHnVL) et sa partie intermédiaire ou centrale (VMHnC),

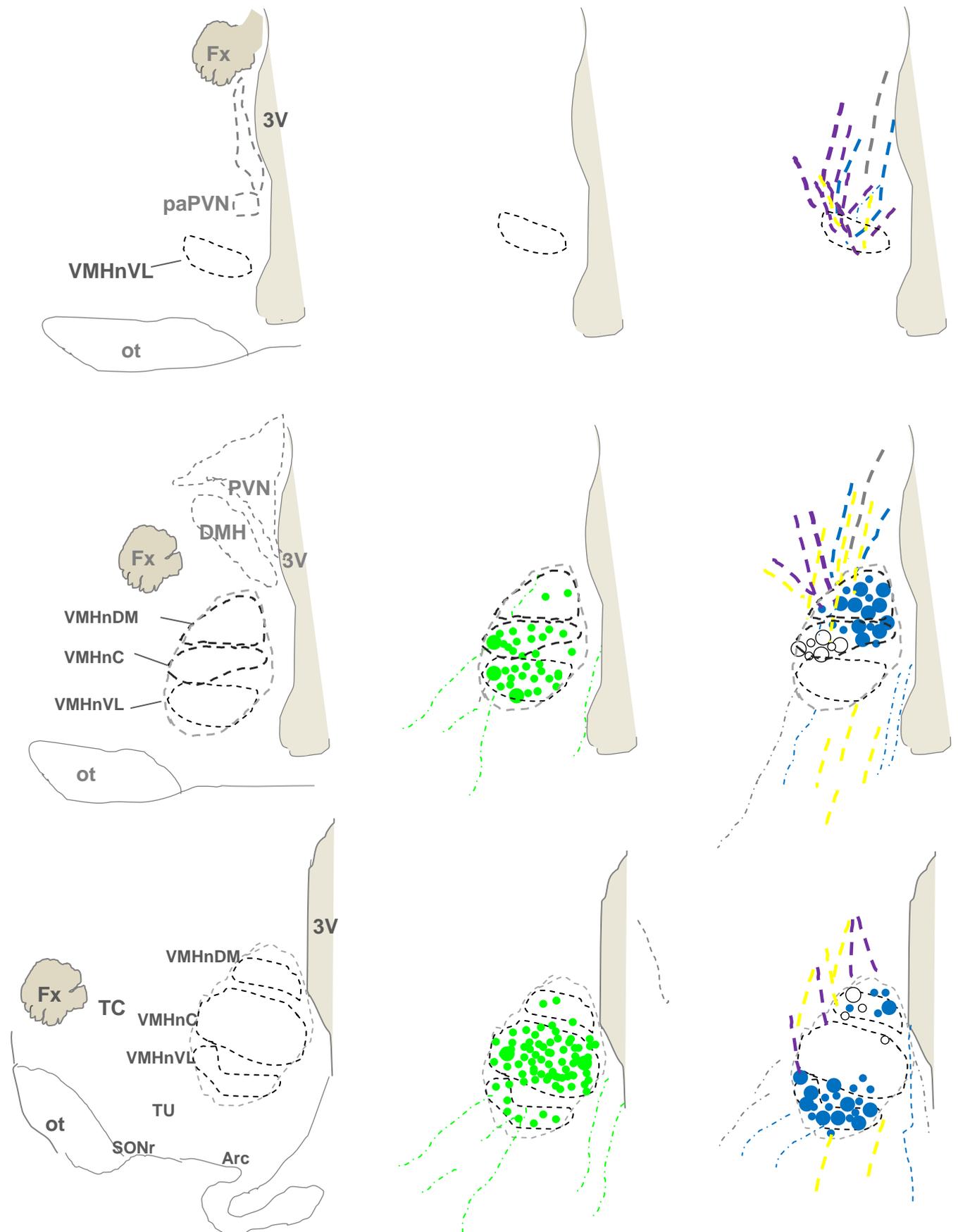


Figure 54 : Schéma résumant la distribution des neuropeptides étudiés et de la TH dans le VMH du Dromadaire. En allant du haut vers le bas, le noyau est représenté par différents niveaux de coupes rostro-caudales. Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères ● : TH ● : AVP ○ : OT . Les fibres sont représentées par des traits discontinus : en point-tirets - . - . Quand il s'agit de fibres dont les péricaraxons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets : - - - : Met-enk - - - : NPY - - - : AVP - - - : OT. **3V** : 3^{ème} ventricule, **Arc** : noyau arqué, **DMH** : noyau dorsomédian, **Fx** : fornix, **ot** : tronc optique, **PVN** : noyau paraventriculaire et sa partie accessoire (**paPVN**), **SONr** : partie rétrochiasmaticque du noyau supra-optique, **TC** : aire du tuber cinereum, **Tu** : noyau tubéral, **VMH** : noyau ventromédian, sa partie ventrolatérale (**VMHnVL**), sa partie intermédiaire ou centrale (**VMHnC**) et sa partie dorso-médiane (**VMHnDM**).

3.3. Noyau arqué

3.3.1. Description anatomique

Chez le Dromadaire, Le noyau arqué (Arc) ou infundibulaire, est situé dans la région de l'infundibulum. Il correspond à une agrégation impaire de neurones. L'apparition des premiers neurones de l'Arc se fait dans l'espace rétrochiasmatique, immédiatement après la disparition du chiasma optique (Figure 11 : plan H12). Le noyau occupe une position médiane et évolue à la bordure ventrale de l'hypothalamus, ventralement au 3V (Figure 11 : plan H13, H14, H14'). Sur ces niveaux rostraux, le noyau coexiste avec les trois noyaux antérieurs : SCN, PVN, et SON. Il est séparé dorsalement du SCN par quelques travées résiduelles du chiasma optique et se prolonge latéralement pour se mettre en rapport de chaque côté avec les neurones formant, le SONr, et le noyau tubéral caudalement (Figure 11 : plan H12, H13, H14, H14' ; figure 55C ; figure 56). A ce niveau, l'Arc et le SONr sont séparés par des vaisseaux longitudinaux qui se prolongent vers le plancher hypothalamique (Figure 11 : plan H12 ; figure 55C ; figure 56). Plus caudalement, l'apparition du sulcus tubéro-infundibulaire (TIS : la bifurcation de la base du 3V) et le détachement de l'éminence médiane, divisent ce noyau en deux portions gauche et droite (Figure 11 : plan H17, H18, H19, H20 ; figure 55D ; figure 57A ; figure 59). Sur ces coupes caudales l'Arc est limité dorso-latéralement par le noyau tubéral (Figure 11 : H19, H20 ; figure 57A ; figure 59). Le noyau arqué se prolonge jusqu'à la subdivision postérieure, où il cohabite avec les noyaux pré-mamillaires, et où il entoure la base du récessus mamillaire du 3V (MRe) (Figure 11 : plan 21). Ce noyau s'étend donc sur les trois subdivisions hypothalamiques. Il est le plus long noyau de l'hypothalamus, avec une étendue moyenne estimée à 11,4mm.

Le noyau arqué est formée de neurones parvocellulaires de taille moyenne et de très rares magnoneurones qui sont dispersés (figure 55). L'affinité tinctoriale de ses neurones reste faible au point que sur certaines coupes, le noyau apparaît diffus et sans délimitation apparente.

3.3.2. Contenu neuropeptidergique

- Population neuronale :

Le contenu neuropeptidergique est marqué par la présence de l'OT et de l'AVP. Au niveau de l'Arc rostrale, appartenant à la subdivision hypothalamique antérieure, une population de neurone à OT est disposée latéralement en deux importants groupes vers les extrémités du noyau (Figure 56 et 61). Ce n'est que caudalement que les neurones à AVP apparaissent et commencent à devenir nombreux (Figure 61).

Sur les coupes postérieures, où le noyau juxtapose le sulcus tubéro-infundibulaire, les neurones à OT et AVP persistent mais restent peu nombreux devant leurs équivalents du noyau tubéral (Figure 57 et 61). Ces neurones ont une disposition, dorsale pour l'OT et ventrale pour l'AVP (Figure 57).

Des neurones à TH existent dans l'Arc. Ces neurones ont été observés sur des niveaux rostraux (Figure 53, 58 et 61) mais aussi sur des niveaux caudaux (Figure 59 et 65). Il est à noter que ces neurones à TH dans l'Arc sont plus nombreux que ceux à OT et à AVP et qu'aucune co-localisation de ces deux neuropeptides avec cette enzyme, n'a été observée.

À côté de l'OT, AVP et TH, le noyau arqué présente une densité importante en parvoneurones marqués au NPY (figure 60 et 61). Ces parvoneurones à NPY existent sur les coupes rostrales et caudales. Ils envoient un nombre important de fibres qui semblent se distribuer vers les noyaux avoisinants.

Chez le Dromadaire, le noyau arqué est dépourvu de neurones à Mét-enképhaline. Les autres neuropeptides et amines étudiés (VIP, GAL, 5HT) sont absents (Figure 61).

- Fibres efférentes et afférentes :

Des fibres efférentes issues des neurones à AVP et à OT de l'Arc, empruntent la bordure interne de l'éminence médiane pour rejoindre les autres fibres homologues provenant du noyau tubéral et du SONr et descendant dans la neurohypophyse (figure 57 et 61). D'autres fibres issues des neurones à TH et à NPY empruntent la bordure externe de l'éminence médiane (figure 61).

Par ailleurs, un nombre très élevé de fibres à Met-enképhaliniques et à GAL arrivent dorsalement pour innerver le noyau arqué.

3.4. Noyau tubéral (Tu)

3.4.1. Description anatomique

Le noyau tubéral (Tu) est une structure paire, bien individualisée et constituée par une population de grands neurones qui surplombent la partie caudale du SON rétrochiasmatique et qui délimitent dorso-latéralement le noyau arqué (Figure 11 : Plan 14, 14', 15, 16, 17 ; figure 55C). Son identification se base sur ses rapports anatomiques avec le SONr et le Arc, sa position dorsale et par l'existence caractéristique de neurones disposés de manière verticale ou oblique se prolongeant par des fibres également de la même disposition. Il ne peut pas être confondu avec le SONr qui à ce niveau, est formé de magnoneurones et de parvoneurones juxtaposant le tronc optique

et formant une population ventrale, étirée le long de la limite ventrale de l'hypothalamus. Le début du noyau tubéral se fait caudalement par rapport au noyau arqué. En effet, ses premiers neurones sont observés au niveau du plan H14 (Figure 11). Son étendue moyenne est estimée à 6,2mm.

Le noyau tubéral contient beaucoup de magnoneurones mais également des parvoneurones qui sont disposés avec leurs fibres de manière verticale. Plus caudalement des magnoneurones de formes fusiformes apparaissent dorsalement au Tu et ventralement au VMH.

3.4.2. Contenu neuropeptidergique

Les neurones de ce noyau ont été révélés immunopositifs à l'OT, l'AVP et à la TH. Comme pour le SON et l'Arc, les neurones à OT sont disposés dorsalement et ceux à AVP sont disposés ventralement (Figure 57). Ces neurones à OT et à AVP envoient des fibres longitudinales verticales ou obliques, se dirigeant dorsalement et ventralement (Figure 57) ou latéro-ventralement pour pénétrer l'éminence médiane par sa bordure interne (OT et AVP) et externe (AVP) (figure 57 et 61). En regard de son étendue, de sa densité neuronale, de son contenu en AVP et en OT, mais aussi de sa projection vers la bordure interne de l'ME, ce noyau semble être donc chez le Dromadaire beaucoup plus important que les noyaux conventionnels constituant le système hypothalamo-neurohypophysaire chez les autres Mammifères.

Les neurones à TH sont très abondants dans ce noyau et présentent aussi une disposition de fibres verticales ou obliques (Figure 53, 56, 58, 59 et 61). Certaines de ces fibres pénètrent la bordure externe de l'éminence médiane.

Aucune immunoréactivité à NPY, 5-HT, GAL, VIP ni à la Met-enk n'a été relevée dans les neurones de ce noyau. Par contre un fort plexus de fibres immunoréactives à NPY et à Met-enk et à GAL a été observé (Figure 61).

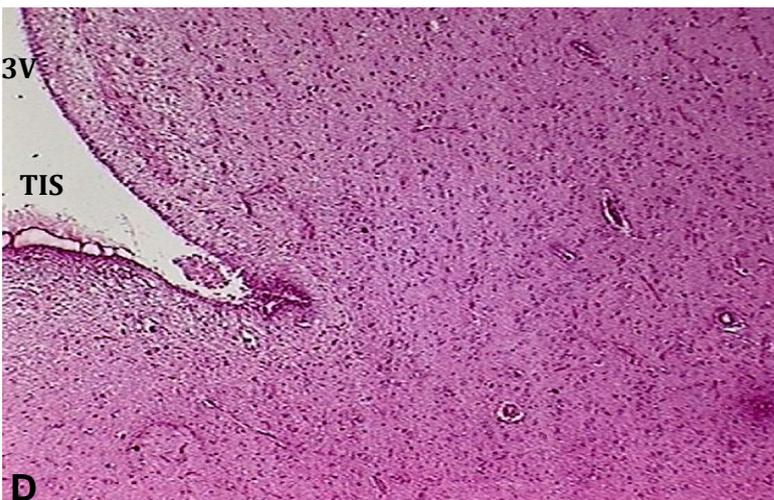
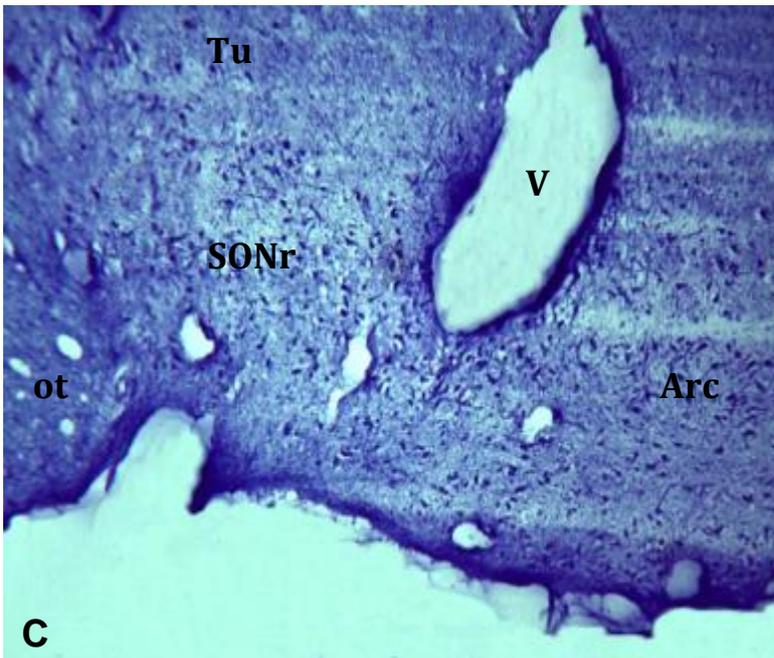
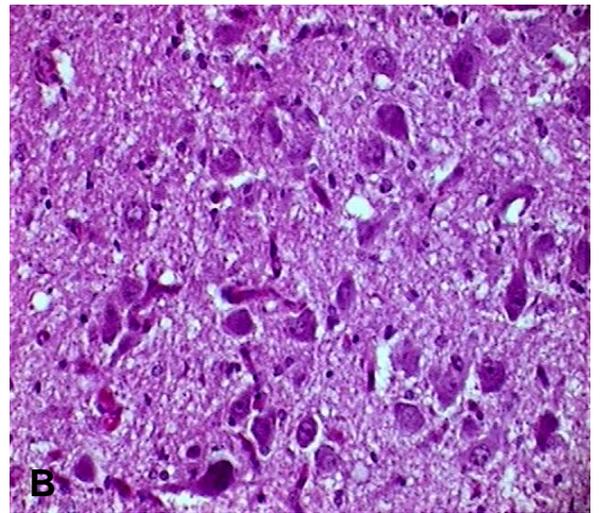
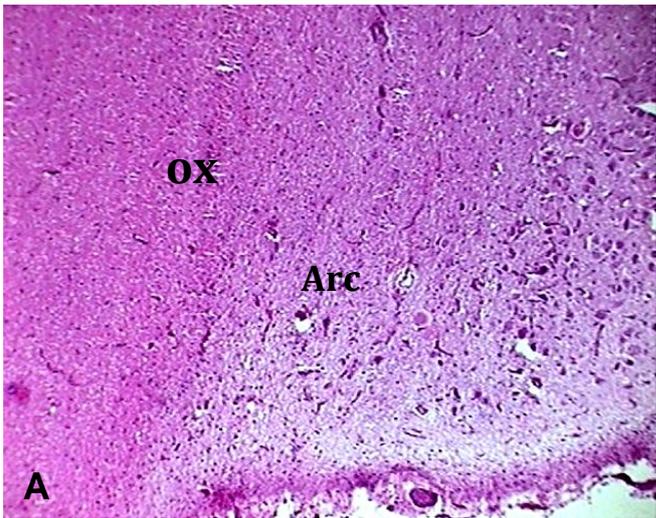


Figure 55 : photomicrographies du noyau arqué après des colorations histologiques.

Image A : Coupe sagittale de la région rétrochiasmatique montrant la position médiane de l'Arc et son étendue importante ; grossissement x20, crésyl violet.

Image B : montre la composition cellulaire de l'Arc, qui est majoritairement à parvoneurones, grossissement x40, Crésyl violet.

Image C : coupe frontale au niveau du plan 14' de la figure 11, montrant la position médiane de l'Arc et ses rapports anatomiques au SONr ; à noter la séparation faite entre les deux noyaux par des vaisseaux (V) longitudinaux, grossissement x4, bleu de Toluidine.

Image D : coupe frontale sur un niveau caudale correspondant au plan 16 de la figure 11, montrant la portion droite de l'Arc avec sa position juxta-infundibulaire (TIS : sulcus tubéro-infundibulaire), grossissement x10, H&E.

3V: 3^{ème} ventricule, **Arc** : noyau arqué, **ot** : tronc optique, **ox** : chiasma optique, **SONr** : partie rétrochiasmatique du noyau supra-optique, **TIS** : sulcus tubéro-infundibulaire, **Tu** : noyau tubéral, **V**: vaisseau sanguin.

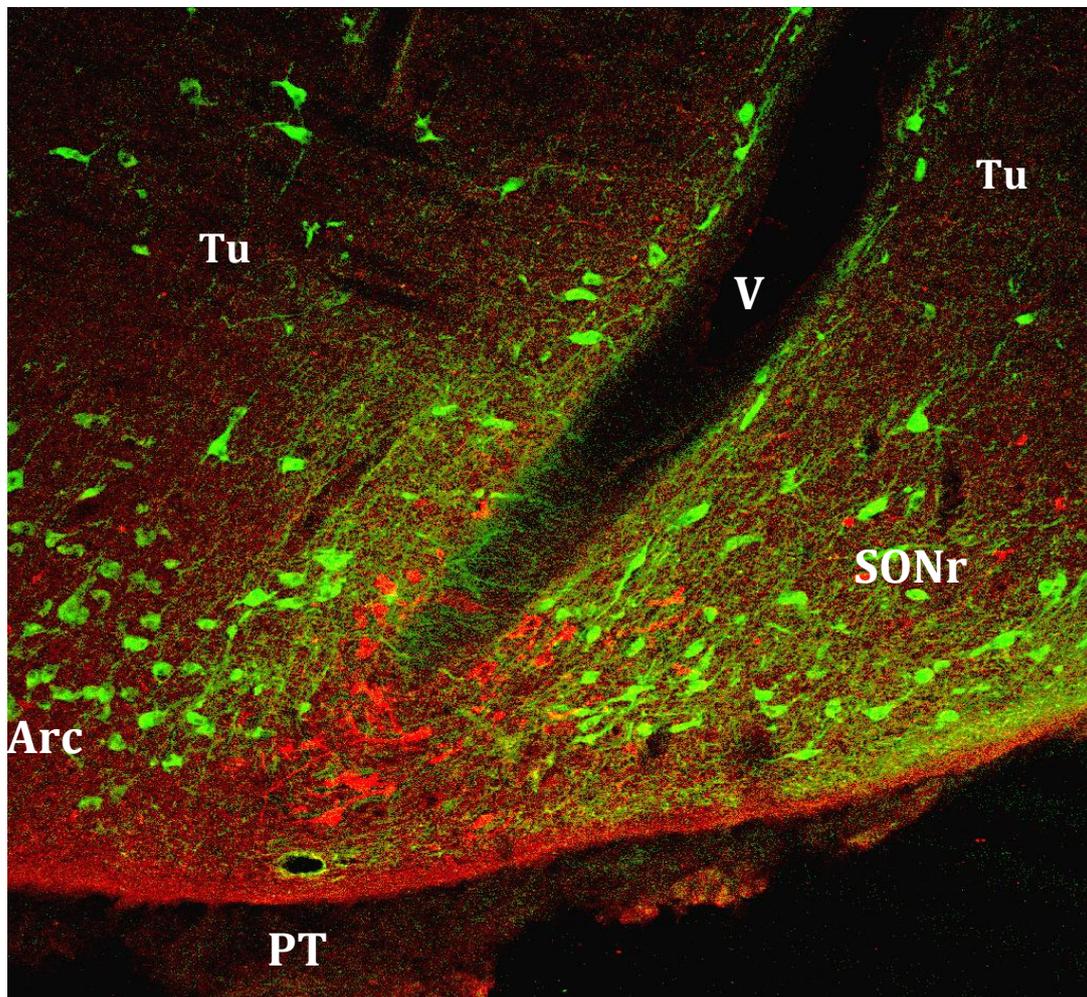
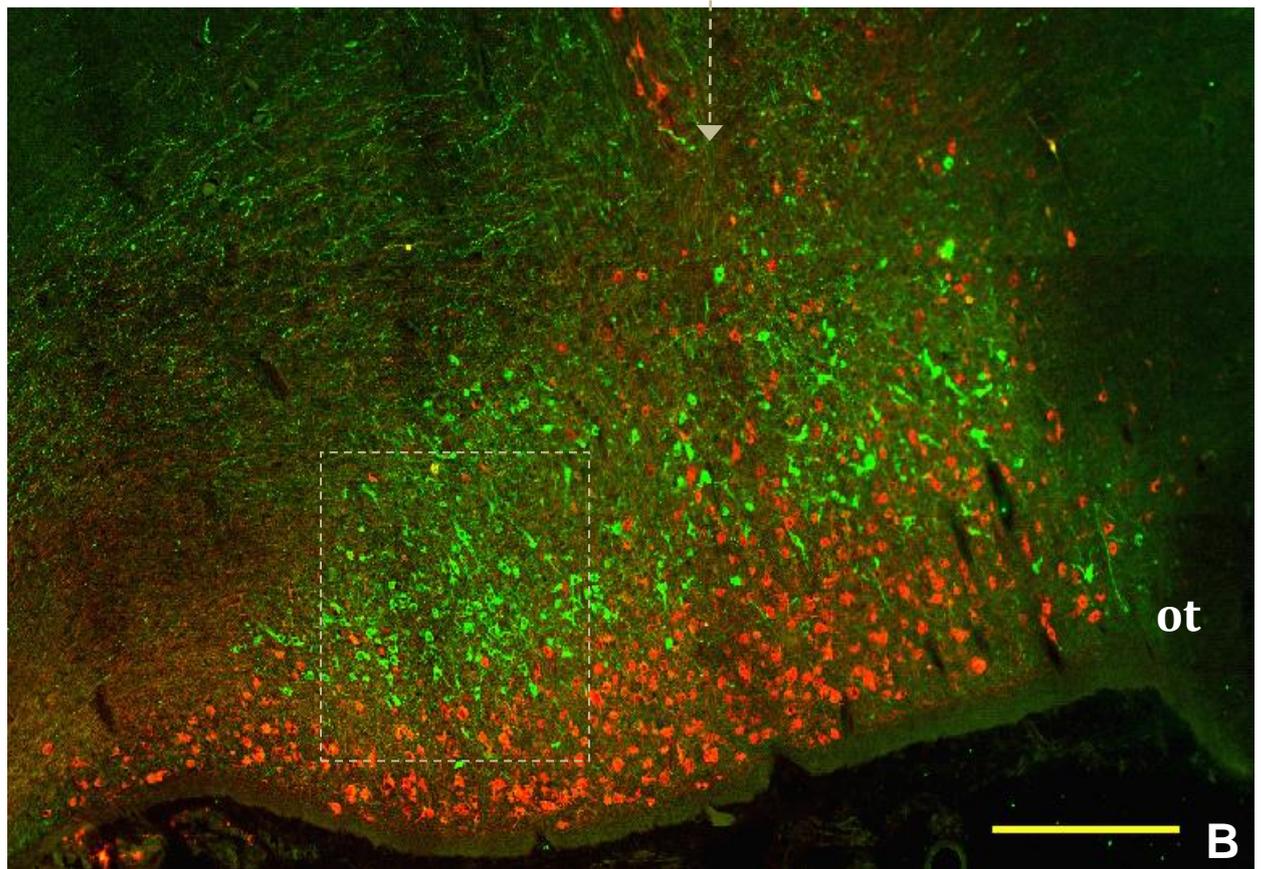
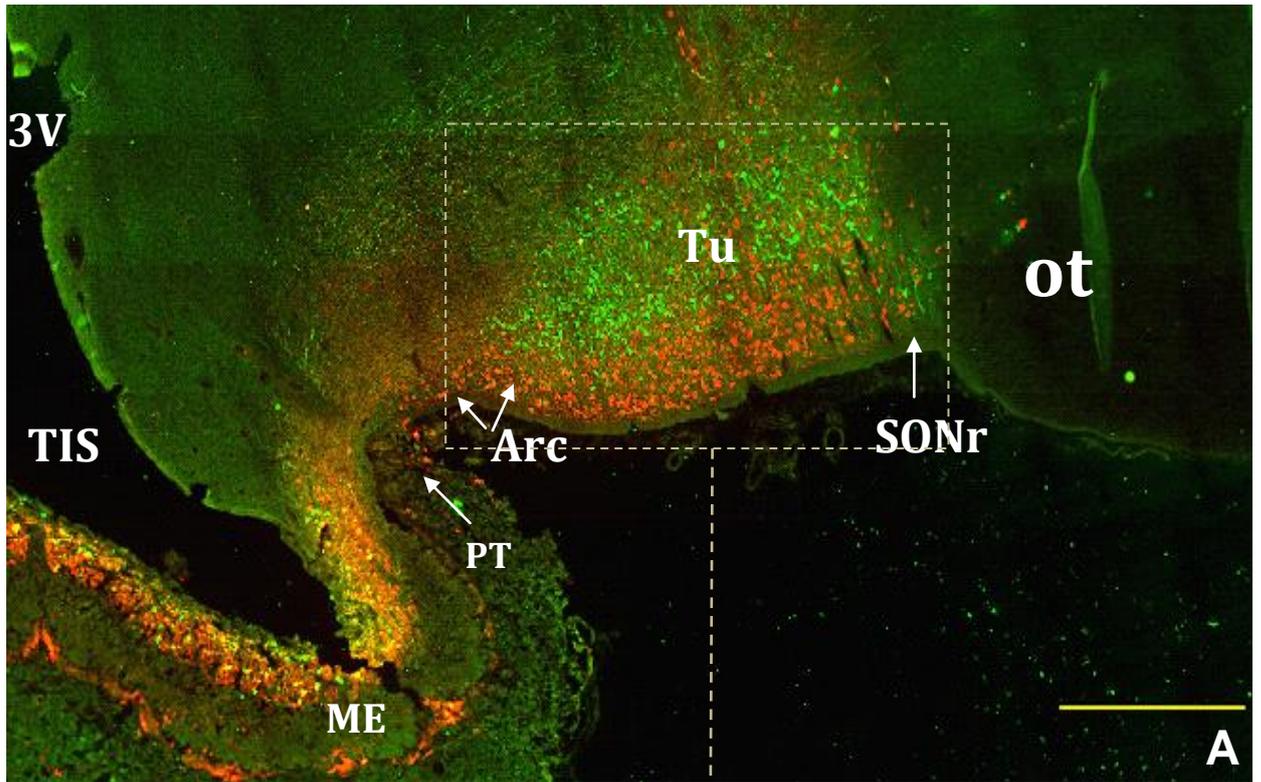


Figure 56 : Photomicrographie de la région latéro-médiane de l'aire rétrochiasmatique, après un double marquage OT (rouge) et TH (vert). Grossissement x10. Le niveau de coupe correspond au plan 14' de la figure 11. L'image représente une superposition d'une prise en fluorescence verte avec la même prise en fluorescence rouge. À noter la limite anatomique entre le SONr et l'Arc, formée par le vaisseau sanguin (V). L'Arc présente des parvoneurones à forme ovale alors que le SONr présente des magnoneurones et parvoneurones étirés et alignés et juxtaposant le tronc optique. La population des magnoneurones dorsaux avec une disposition verticale ou oblique et des fibres longitudinales de même orientation, correspondent au noyau tubéral. Notant également la position latérale de la population à OT dans l'Arc et l'abondance de la TH dans ce noyau ainsi que dans le SONr et le noyau tubéral.

Arc : noyau arqué, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **SONr** : partie rétrochiasmatique du noyau supra-optique, **Tu** : noyau tubéral, **V** : vaisseau sanguin.



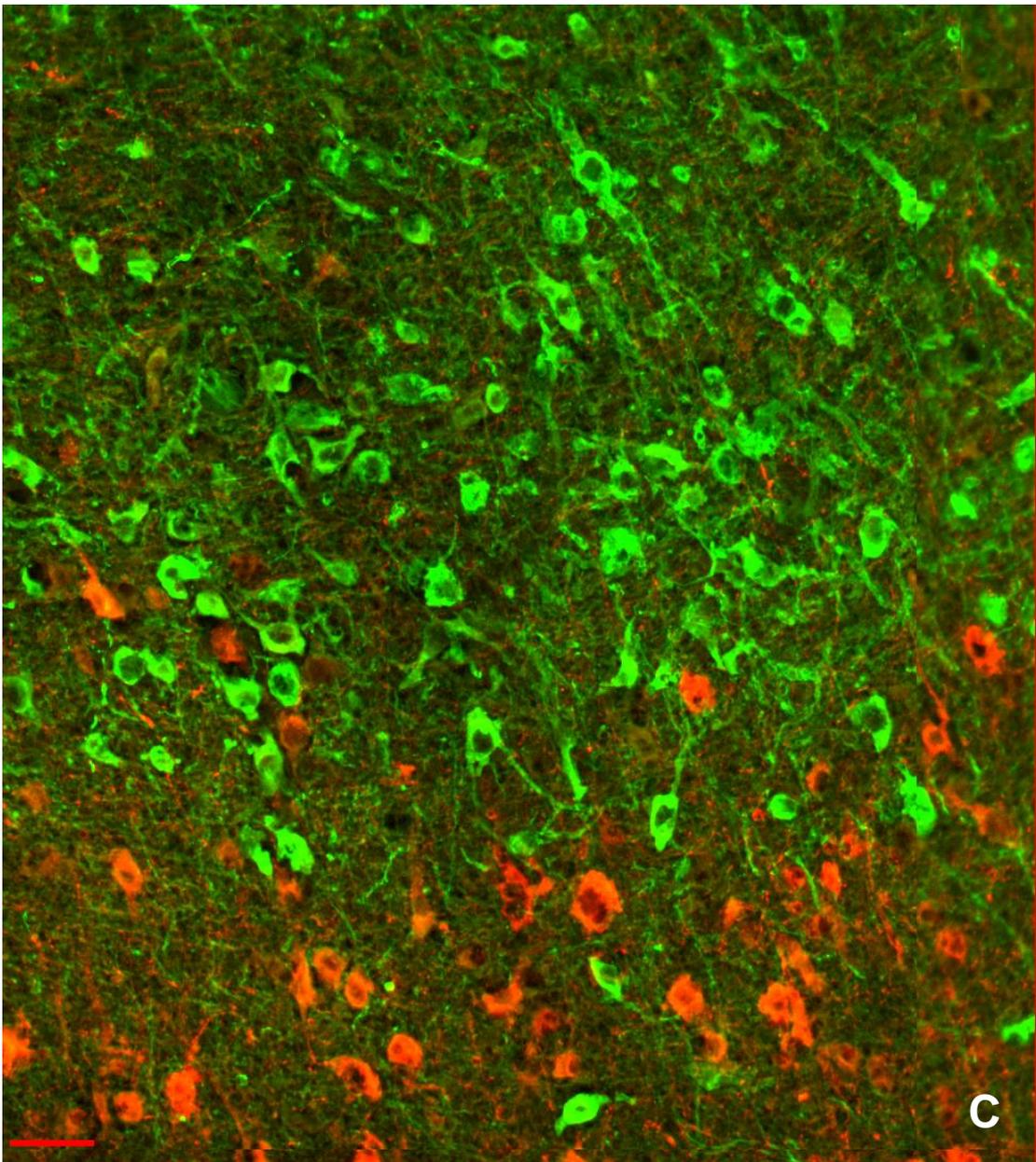


Figure 57 : Photomicrographies montrant les noyaux de la région infundibulaire après un double marquage AVP (rouge) et OT (vert). La coupe correspond à un niveau intermédiaire entre les plans 19 et 20 de la figure 11. **Image A** : reconstitution à partir de 48 images, prises à un grossissement de x10. La barre jaune correspond à 1000 μ m. **Image B** : agrandissement représentant la partie encadrée de l'image A, La barre jaune correspond à 500 μ m. **Image C** : agrandissement représentant la partie encadrée de l'image B, La barre rouge correspond à 50 μ m. À noter l'importance des neurones à AVP et à OT dans le noyau tubéral par rapport au noyau arqué et la position dorsale des neurones à OT par rapport à AVP. À noter également les fibres quittant le noyau et pénétrant l'éminence médiane et ce en utilisant un trajet dorsal pour l'OT et ventral pour AVP (Image B). L'éminence médiane présente des fibres AVP dans sa bordure externe et des fibres OT et AVP dans sa bordure interne (Image A). À remarquer aussi les fibres verticales et obliques des neurones du noyau tubéral (Image C). **3V** : 3^{ème} ventricule, **Arc** : noyau arqué, **ME** : éminence médiane, **ot** : tronc optique, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **SONr** : partie rétrochiasmatique du noyau supra-optique, **TIS** : sulcus tubéro-infundibulaire, **Tu** : noyau tubéral.

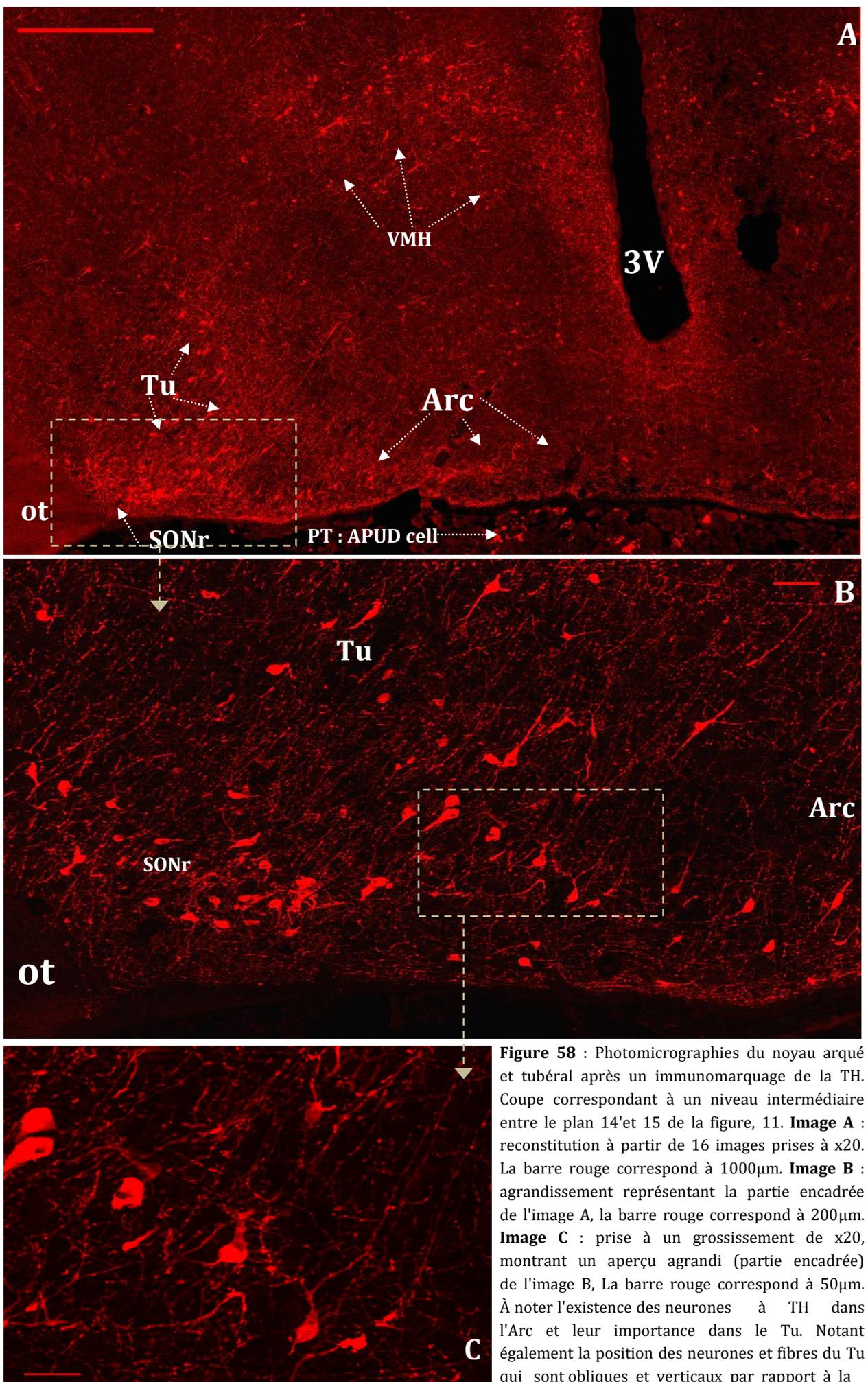


Figure 58 : Photomicrographies du noyau arcué et tubéral après un immunomarquage de la TH. Coupe correspondant à un niveau intermédiaire entre le plan 14'et 15 de la figure, 11. **Image A** : reconstitution à partir de 16 images prises à x20. La barre rouge correspond à 1000µm. **Image B** : agrandissement représentant la partie encadrée de l'image A, la barre rouge correspond à 200µm. **Image C** : prise à un grossissement de x20, montrant un aperçu agrandi (partie encadrée) de l'image B, La barre rouge correspond à 50µm. À noter l'existence des neurones à TH dans l'Arc et leur importance dans le Tu. Notant également la position des neurones et fibres du Tu qui sont obliques et verticaux par rapport à la population des neurones horizontaux constituant le SONr. (Vues B et C). **3V** : 3^{ème} ventricule, **APUD** : Amine precursor uptake decarboxylase cell **Arc** : noyau arcué, **ot** : tronc optique, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **SONr** : partie rétrochiasmaticque du noyau supra-optique, **Tu** : noyau tubéral, **VMH** : noyau ventromédian.

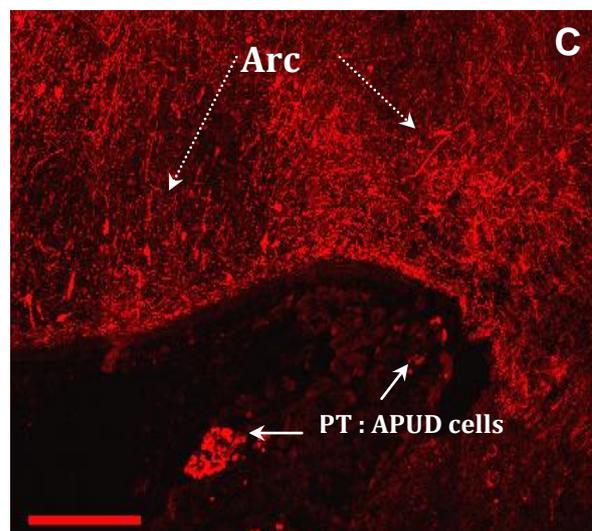
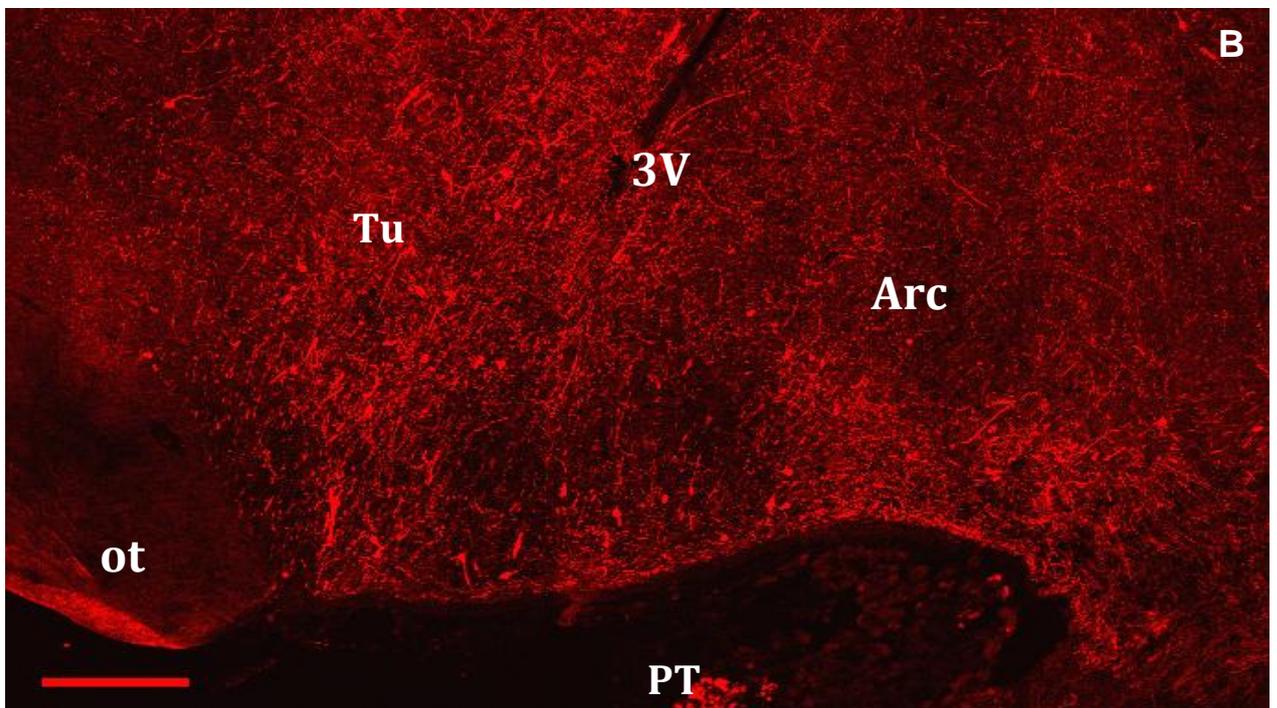
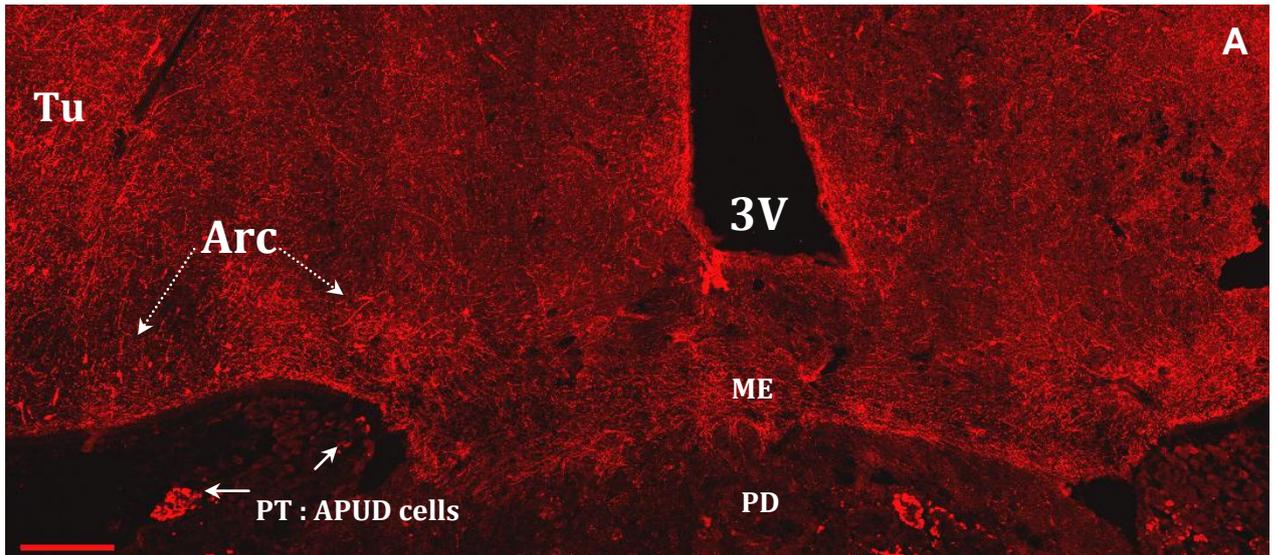


Figure 59 : Photomicrographies du noyau arqué et tubéral sur un niveau de coupe caudale, après un immunomarquage pour la TH. Coupe correspondant à un niveau proche du plan 17 de la figure 11. **Image A** : extraite d'une reconstitution de 90 images prises à un grossissement de x10, La barre rouge correspond à 500µm. **Image B** : agrandissement représentant la partie encadrée de l'image A, la barre rouge correspond à 500µm. **Image C** : représente la partie médiane correspondant à l'Arc gauche (partie encadrée) de l'image A, la barre rouge correspond à 500µm. À noter que sur ces niveaux caudaux les neurones à TH subsistent dans l'Arc et le Tu. À noter également, l'importance des fibres à TH dans cette région de l'hypothalamus et les cellules de type APUD dans la pars tuberalis et distalis de l'hypophyse. **3V** : 3ème ventricule, **APUD** : Amine precursor uptake decarboxylase cell, **Arc** : noyau arqué, **ME** : éminence médiane, **ot** : tronc optique, **PD** : pars distalis de l'adénohypophyse, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **Tu** : noyau tubéral.

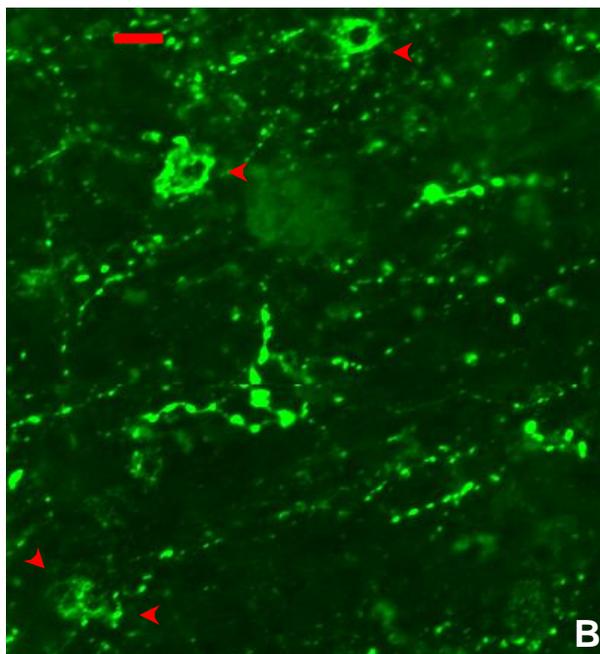
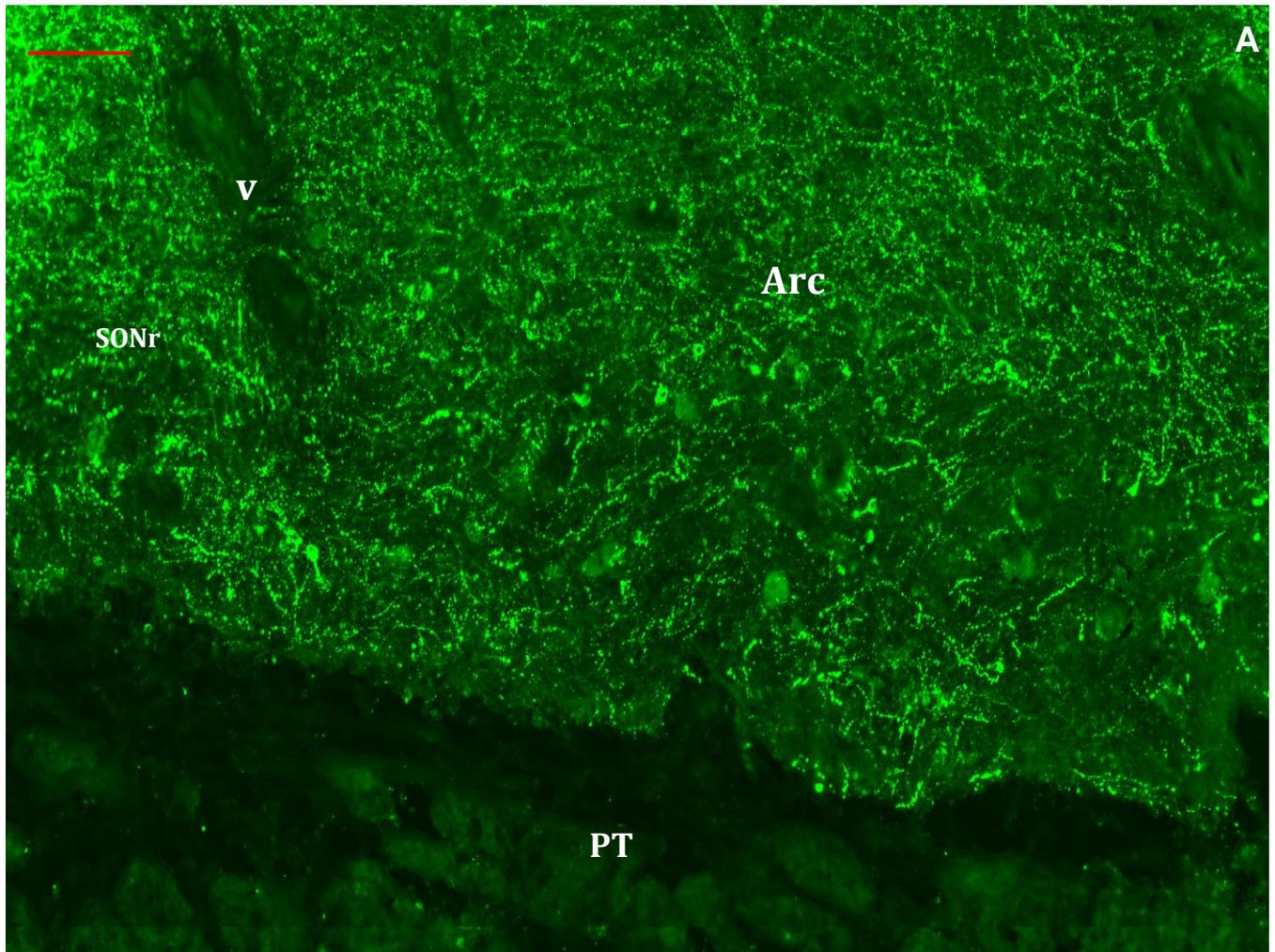


Figure 60 : Photomicrographie du noyau arqué après un immunomarquage du NPY (vert). Le niveau de coupe correspond à un plan proche du plan 17 de la figure 11. **Image A** : représente une reconstitution à partir de 9 images, prises à un grossissement de x20. La barre rouge correspond à 100µm. **Image B** : représente un agrandissement sur l'image A, La barre rouge correspond à 10µm. À noter l'immunoréactivité à NPY des parvoneurones du noyau arqué et l'importance des fibres existantes dans ce noyau et dans le SONr. Une présence similaire de riches fibres à NPY existe dans beaucoup de noyaux (SCN, VMH, Tu...), comme c'est rapporté précédemment. **Arc** : noyau arqué, **SONr** : partie rétrochiasmatique du noyau supra-optique, **PT** : pars tuberalis de l'adénohypophyse, **V** : vaisseau sanguin.

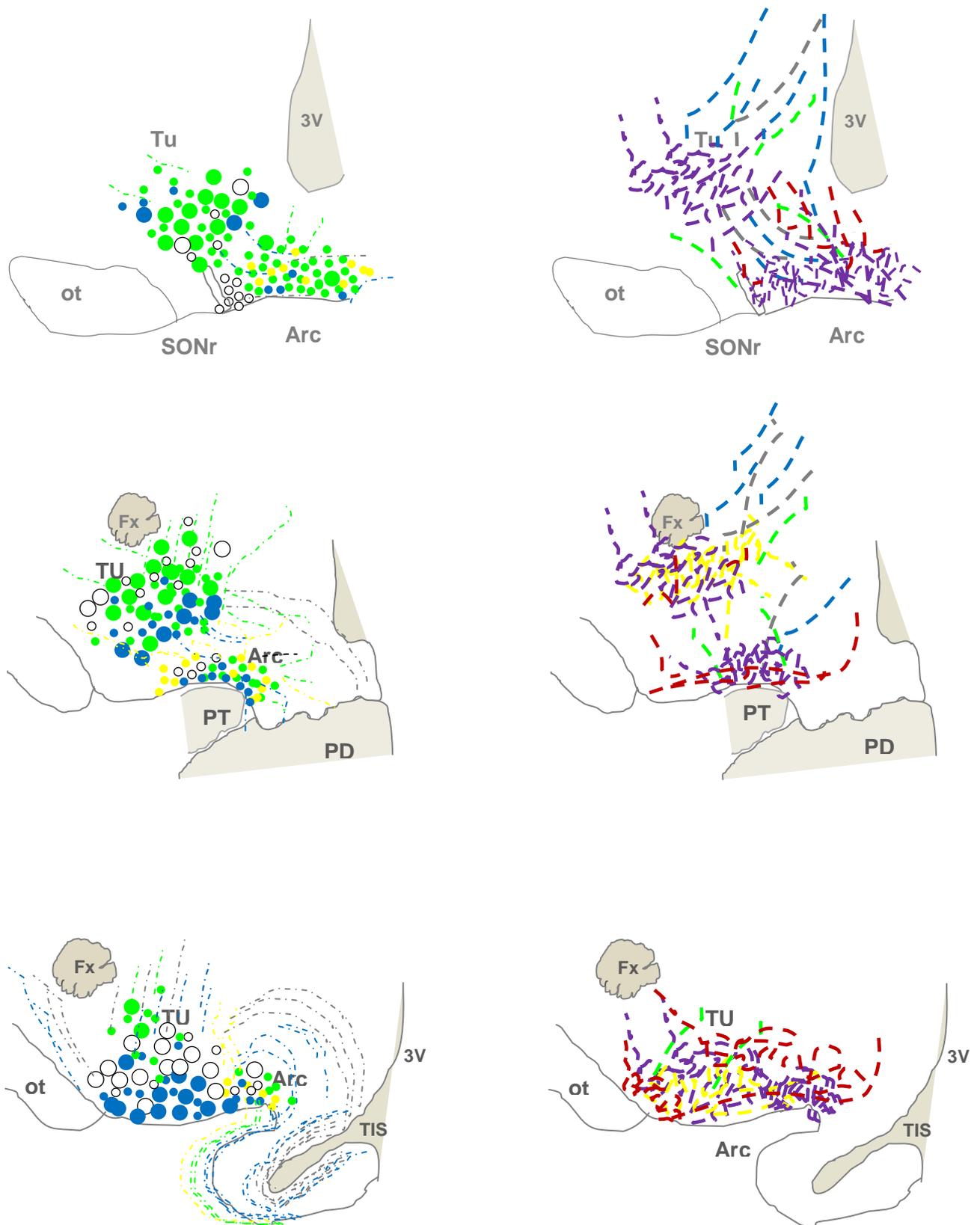


Figure 61 : Schéma résumant la distribution de TH et des neuropeptides étudiés dans le noyau arqué et tubéral du Dromadaire. Les deux noyaux sont représentés sur une succession de coupes rostro-caudales. Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères ● : TH ● : AVP ○ : OT ● : NPY . Les fibres sont représentées par des traits discontinus : en point-tirets - - - . Quand il s'agit de fibres dont les péricaraxons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets : - - - : Met-enk - - - : NPY - - - : AVP - - - : OT - - - : TH - - - : GAL. 3V : 3^{ème} ventricule, Arc : noyau arqué, Fx : fornix, ot : tronc optique, PD : pars distalis de l'adénohypophyse, PT : pars tuberalis de l'adénohypophyse, SONr : partie rétrochiasmatisque du noyau supra-optique, TIS : sulcus tubéro-infundibulaire, Tu : noyau tubéral.

4. Hypothalamus postérieur

L'hypothalamus postérieur est constitué des noyaux pré-mamillaires et mamillaires. Ces noyaux se distinguent par leur position anatomique et par leur type cellulaire. Ils sont au nombre de six et leurs neurones sont dépourvus de la plupart des neuropeptides étudiés.

4.1. Description anatomique

4.1.1. Noyau pré-mamillaire dorsal

Le noyau pré-mamillaire dorsal (DPM) appartient à la subdivision postérieure de l'hypothalamus. Son apparition se fait rostralement dans l'hypothalamus médiobasal d'où son nom de pré-mamillaire. À ce niveau il prend l'espace qui était occupé rostralement, par la subdivision postérieure du PVN (PanPO), et puis par l'aire postérieure. Ce noyau paire, est situé dorso-médialement au noyau subthalamique (STh, qui est riche en neurones à TH), médialement au 3V, et il est séparé de son homonyme ventrale par l'aire du tuber cinereum (TC) (Figure 11 : plan 19 et 20). Au niveau caudal, le thalamus comprime ventralement les noyaux et les aires hypothalamiques. Le DPM se trouve alors progresser vers la région ventrale. À ce niveau, il est en contact directement avec son homonyme ventral (VPM), et du côté latéral, au fornix et à son noyau périfornical. Rostralement, ce noyau contient des parvoneurones de forme arrondie. Plus caudalement, ces neurones se retrouvent dans l'aire hypothalamique postérieure dorsale et leur distinction devient difficile (Figure 11 : plan H 21).

4.1.2. Noyau pré-mamillaire ventral

Le noyau pré-mamillaire ventral (VPM) évolue de la même manière que le DPM sauf que son positionnement reste stable au niveau de la région hypothalamique ventrale (Figure 11 : plan 19, 20, 21). Sur les coupes situées très rostralement (niveau du tuber cinereum), il est situé médialement au fornix. Sur les niveaux de coupes caudales, il est localisé, ventralement au DPM et au fornix (avec le noyau périfornical), latéralement au récessus mamillaire du 3V, et médialement au *pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire (CP). Ce noyau est constitué aussi de parvoneurones de forme arrondie.

4.1.3. Pars caudalis du noyau tubéro-mamillaire

La *Pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire (CP) est l'une des deux subdivisions qui semble continuer le noyau tubéral. Il occupe l'espace situé médialement au pédoncule cérébral (Cp), et latéralement au fornix ou à son

prolongement (Figure 11 : plan H22 et H21 ; figure 62). Ses limites avec le noyau subthalamique restent mal définies. Le CP est constitué d'une majorité de magnoneurones.

4.1.4. Pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire

La Pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire (SM) semble continuer le noyau tubéral. Le noyau SM, apparaît au dessus de la commissure supra-mamillaire (MC) (Figure 11 : plan H22). Il est situé, dorsalement à la MC, ventralement au plancher du 3V, et médialement aux tractus reliant le fornix et le tronc mamillo-thalamique (mt). Morphologiquement, le SM se présente sous forme d'une bande horizontale formée par des magnoneurones et des parvoneurones (Figure 63).

4.1.5. Noyau mamillaire médian

Le noyau mamillaire médian (MM) est situé à la limite ventrale de l'hypothalamus postérieure. C'est une structure impaire qui occupe caudalement l'emplacement du récessus mamillaire du 3V (MRe) (Figure 11 : plan 21 et H22). Ce noyau est limité, dorsalement par la commissure supra-mamillaire, et latéralement par les tractus prolongeant ventralement le fornix (Figure 11 : plan H22, figure 62). Le MM est formé de deux lobes contigus et invaginés dorsalement. Les neurones constituant ce noyau sont des parvocellules de grande densité ainsi que quelques magnoneurones.

4.1.6. Noyau mamillaire latéral

Le noyau mamillaire latéral (LM) est situé comme l'ensemble des noyaux mamillaires dans la subdivision postérieure de l'hypothalamus. Il est pair et se présente sous forme d'un amas de magnoneurones et de parvoneurones à affinité tinctoriale élevée. Il est séparé médialement, du noyau mamillaire médian par un prolongement du fornix sous forme d'un tractus et il est séparé du côté latérale de la *pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire (CP), par un autre tractus prolongeant le fornix (Figure 11 : plan H22, Figure 62). Ce noyau se trouve donc emprisonné dorsalement et de chaque côté par les tractus prolongeant le fornix.

4.2. **Contenu neuropeptidergique**

L'étude du contenu neuropeptidergique révèle que ces noyaux mamillaires n'expriment pas une immunoréactivité à l'OT, AVP, NPY, VIP, ni à 5HT. Cependant, des neurones immunoréactifs à la Met-enk existent en forte densité dans le noyau pré-mamillaire dorsale (DPm). De même, des fibres immunoréactives à la Met-enk parcourent les surfaces des différents noyaux mamillaires (Figure 64). Ces fibres sont plus denses dans la *pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire (CP) et autour du récessus

supra-mamillaire. Des fibres à TH innervent également les noyaux mamillaires (Figure 64). Ces fibres seraient originaires des neurones du noyau et de la région subthalamique (STh), qui présente une immunoréactivité très élevée à TH.

Les seuls neurones présentant une immunoréactivité à la galanine dans l'hypothalamus du Dromadaire, ont été observés au niveau des deux pars, caudalis (CP) et supra-mamillaire (SM) du noyau tubéro-mamillaire (Figure 64). Ces neurones envoient des fibres vers le noyau mamillaire latéral et médian et dorsalement vers la région subthalamique. Les essais de double marquage ont montré que certaines de ces fibres co-localisent la GAL et l'AVP.

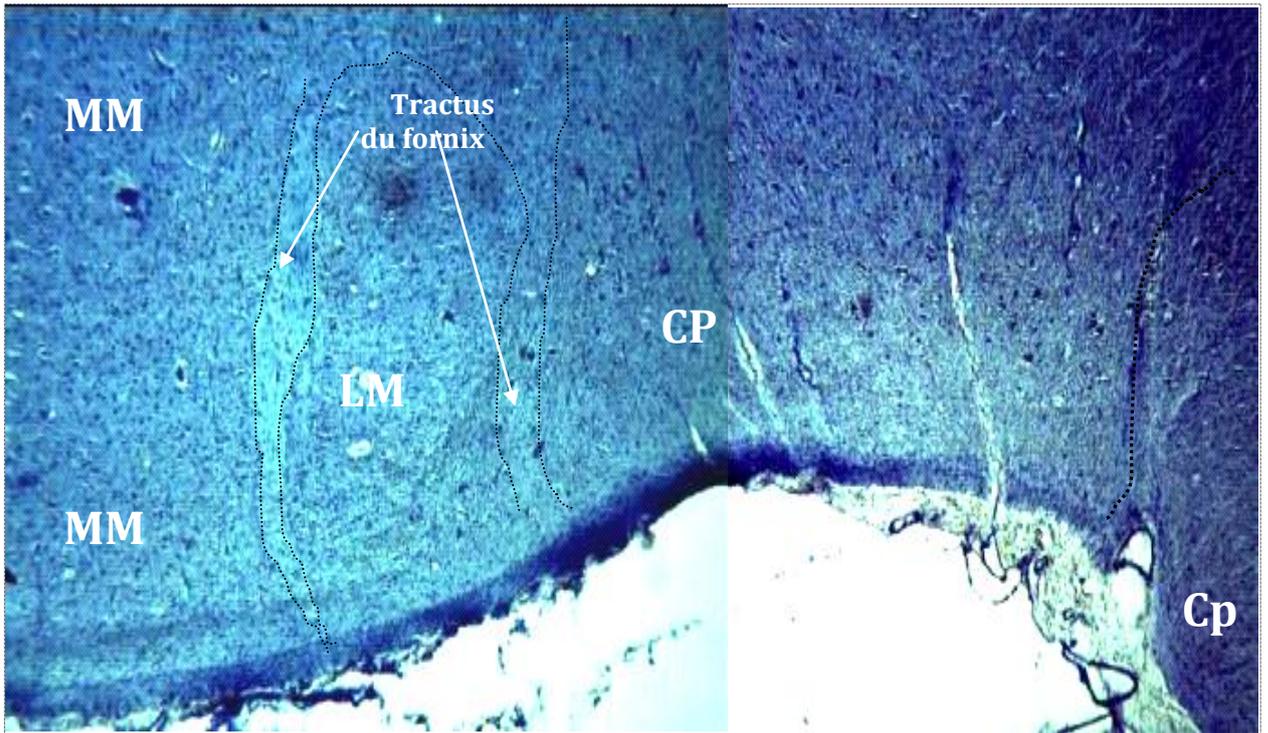


Figure 62 : Photomicrographie représentant les noyaux mamillaires après coloration histologique au bleu Toluidine. Il s'agit d'une reconstitution de deux images d'un grossissement de x4. Le niveau de coupe correspond au plan 22 de la figure 11. À noter la position de la *Pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire (CP) entre le péduncule cérébrale (Cp) et le noyau mamillaire latéral (LM). Remarquer également la taille de ses neurones. Médialement le noyau, LM est limité de chaque côté par les tractus prolongeant le fornix et il répond médialement au noyau mamillaire médian (MM).

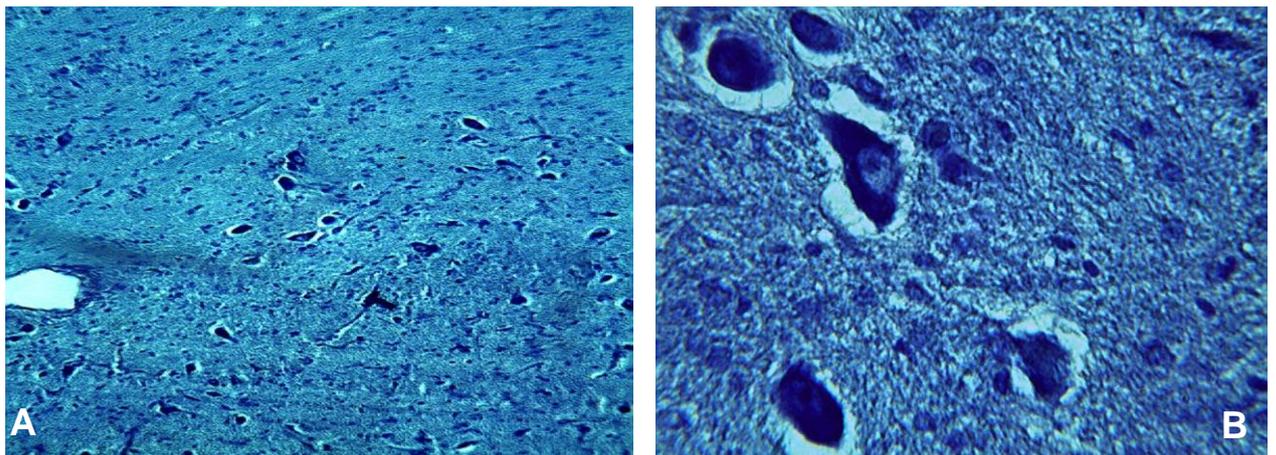


Figure 63 : Photomicrographies montrant les neurones de la pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire (SM) après une coloration histologique au bleu de toluidine. Vue A : x10 et vue B : x40. Ce noyau est situé ventralement au plancher du 3V et dorsalement à la commissure supra-mamillaire. À noter la présence de magnoneurones et de parvoneurones dans ce noyau.

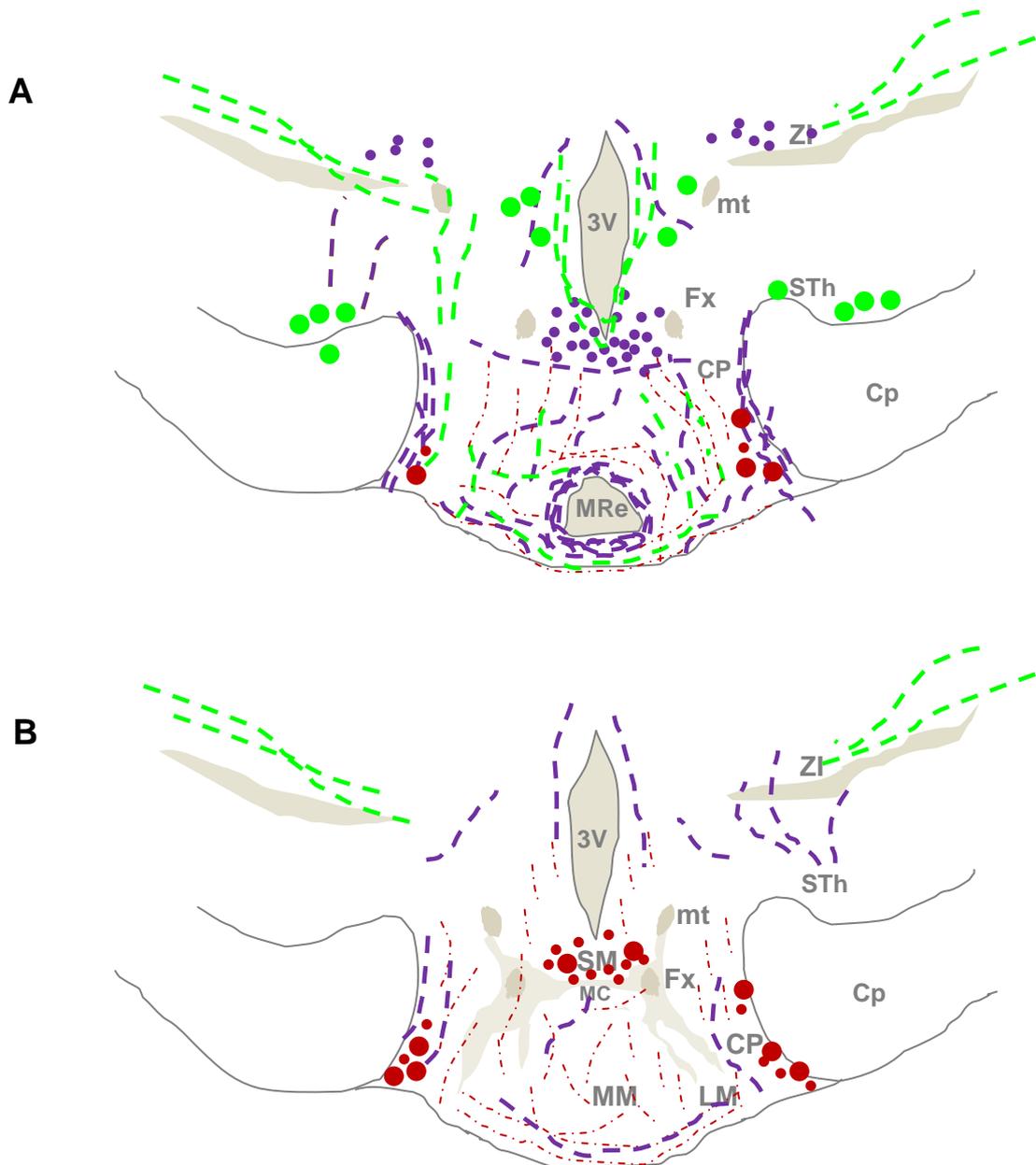


Figure 64 : Schéma résumant la distribution de la TH et des neuropeptides étudiés dans les noyaux de la région mamillaire du Dromadaire. Cette région est représentée par deux schémas de coupes frontales, correspondant à la partie pré-mamillaire (A) et à la partie mamillaire proprement dit (B). Les neurones sont représentés par des grandes (Magnoneurones) et petites (parvoneurones) sphères ● : TH ● : GAL ● : Met-enk . Les fibres sont représentées par des traits discontinus : en point-tirets - - - . Quand il s'agit de fibres dont les péricarayons sont en dehors du noyau (figures à droite), les fibres sont représentées par les traits en tirets :
 - - - : Met-enk
 - - - : TH.

3V : 3ème ventricule, **Cp** : pédoncule cérébrale, **CP** : Pars caudalis du noyau tubéro-mamillaire, **Fx** : fornix, **LM** : noyau mamillaire latéral, **MC** : commissure supra-mamillaire, **mt** : tronc mamillo-thalamique, **MM** : noyau mamillaire médian, **MRe** : récessus mamillaire du 3V, **SM** : Pars supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire, **STh** : noyau subthalamique, **ZI** : zona incerta.

IV. Discussion

1. Anatomie

L'hypothalamus du Dromadaire ressemble globalement à ce qui a été décrit chez plusieurs espèces de Mammifères (Bleier et *al.* 1979 ; Paxinos et Watson, 1982 ; Lignereux, 1986) et les quatre subdivisions classiques, composées d'un ensemble d'aires et de noyaux, sont retrouvées.

La subdivision préoptique constitue la partie la plus rostrale de l'hypothalamus. Chez le Dromadaire, comme chez le Rat (Bleier et *al.*, 1979), elle est délimitée en avant par la bande diagonale de Broca et son noyau, l'ac et le Ac, et latéralement par la *substantia innominata* et le GP. Dans la *Nomina Anatomica Veterinaria* de l'année 2005, éditée et préparée par le comité International de la Nomenclature de l'Anatomie Vétérinaire, cinq noyaux ont été définis dans la subdivision préoptique (les préoptiques médian, médial, latéral, périventriculaire, et le noyau périventriculaire rostrale). De grandes variations interspécifiques toutefois existent, et chez le Dromadaire, seuls les deux noyaux, préoptique périventriculaire (Pep) et périventriculaire antérieur (Pea) sont identifiables par histologie classique.

L'hypothalamus antérieur, présente chez le Dromadaire, comme chez les autres espèces (Rat : Bleier et *al.*, 1979 ; Vache : Lignereux, 1986 ; Chèvre : Kikusui et *al.*, 1997), trois principaux noyaux : le noyau suprachiasmatique (SCN), le noyau supra-optique (SON), et le noyau paraventriculaire (PVN). En plus de ces trois derniers, s'ajoute un autre noyau qui est le périventriculaire antérieur (Pea).

Chez le Dromadaire, Le noyau suprachiasmatique est très long et se divise en trois parties : le SCN rostral, nu (équivalent à celui des rongeurs) et rétrochiasmatique. Le SCN nu, caractérisé par sa localisation à la base du 3V, dorsalement au chiasma optique, est homologue au noyau suprachiasmatique classiquement décrit chez les rongeurs et plusieurs autres Mammifères (Spiegel et Zweig, 1917, cités par Suburo et Pellegrino de Iraldi en 1969 ; Bleier et *al.*, 1979 ; Van Den Pol, 1980). Le SCN du Dromadaire est caractérisé par son extension. En effet, contrairement à ce qui a été décrit chez la plupart des espèces, le SCN commence à un niveau très rostral et présente un positionnement extra- hypothalamique sous forme, d'un, ensuite de deux tubercules, sous l'*organum vasculosum de la lamina terminalis* (OVLt) et le récessus supra-optique (SoR). Une organisation similaire a été décrite chez le Mouton (Tillet et *al.*, 1989 ; Tessonnaud et *al.*, 1994), la Vache (Lignereux, 1986) et l'Homme (Hofman et *al.*, 1988 ;

Hofman et Swaab, 1989). Chez le Dromadaire les SCN s'étendent largement en arrière du chiasma optique d'où la longueur très importante de cette structure. Sur une base de critères de taille et de forme des neurones, Van Den Pol (1980) a décrit chez les rongeurs, deux subdivisions dans les SCN : la dorso-médiane (DM) et la ventrolatérale (VL). La première aussi appelée 'Shell', est constituée de neurones parvocellulaires de grande densité. La seconde, aussi dénommée 'Core', est située ventro-latéralement au dessus du chiasma optique. Les neurones sont aussi de type parvocellulaire, mais plus volumineux et reçoivent des afférences rétiniennes directes. Dans notre étude histologique chez le Dromadaire nous observons une subdivision différente : Il existe une subdivision de parvoneurones, occupant tout le corps du noyau et une autre subdivision qui est cette fois-ci formée par une couche fine et horizontale de magnoneurones ventralement au corps du noyau et juste au dessus du chiasma optique.

Chez le Dromadaire, deux subdivisions sont observables au niveau du noyau supra-optique : la première nommée SON nu, est située au dessus du chiasma optique, la seconde appelée, SON rétrochiasmatisque, apparaît plus caudalement au niveau de la région ventrolatérale de l'aire rétrochiasmatisque et médialement au tronc optique. Une telle organisation a été aussi observée chez plusieurs espèces (Bleier et *al.*, 1979 ; Lignereux, 1986 ; Van Eerdenburg et *al.*, 1992 ; Van Eerdenburg et Swaab, 1994) mais chez celles-ci les deux subdivisions du SON ne montrent pas de continuité franche. Au contraire, chez le Dromadaire comme chez la Chèvre (Kikusui et *al.*, 1997), les deux parties du SON sont reliées par des fibres et quelques neurones bipolaires, passant par la dérive dorsale du tronc optique. Du point de vue morphologique, le noyau supra-optique chez le Dromadaire est très développé. Il présente une forme en calotte comme l'a rapporté slimane-taleb et *al.*, (1969). Les neurones constitutifs de ce noyau sont de type magnocellulaire avec aussi des parvoneurones.

Le noyau paraventriculaire du Dromadaire débute par des neurones, juste au dessus du SCN. Cette première population cellulaire correspond chez la Vache à la pars accessoire paraventriculaire (paPVN) (Lignereux, 1986). Chez la Chèvre, une structure similaire est identifiée par Kikusui et *al.* (1997). Chez le Porc, en se basant sur ses caractéristiques de développement avec l'âge et la capacité de neurogenèse de ses neurones (Rankin et *al.*, 2003) cette structure a été décrite comme un noyau différent, qui sur la base de son phénotype cellulaire a été baptisé : 'le noyau à vasopressine et à ocytocine' (VON) (Van Eerdenburg et *al.*, 1990). A l'instar de l'atlas de la Vache, nous avons nommé cette structure chez le Dromadaire la pars accessoire paraventriculaire.

Caudalement, le PVN du Dromadaire s'élargit et surplombe le fornix en adoptant progressivement, une forme en aile de papillon. Le PVN du Dromadaire montre des parvoneurones et des magnoneurones, comme chez la plupart des espèces. Les magnoneurones sont semblables à ceux du SON et seraient chez le Dromadaire d'un volume plus important que celui de leurs homologues, par exemple chez le Singe (Slimane-taleb et *al.*, 1969). Sur les niveaux de coupes intermédiaires du PVN, nous avons constaté que ces neurones se répartissent dans quatre subdivisions : la subdivision des parvoneurones médiaux (PanMP), la subdivision ventrale (PanV), la subdivision compacte dorsale (PanDC) et la subdivision des magnoneurones latéraux (PanLM). Cette compartimentation toutefois est basée uniquement sur la répartition topographique des neurones, observés sur des coupes frontales et à des niveaux intermédiaires. En se basant sur des observations histologiques et immunohistologiques plus poussées, ainsi que sur les groupes fonctionnels de neurones couplés à des études de traçage rétrograde, la division devient plus complexe. Swanson et Kuypers (1980) ont défini 8 subdivisions du PVN du Rat qui sont les suivantes : magnoneurones antérieurs, parvoneurones antérieurs, magnoneurones médiaux, parvoneurones dorsaux, magnoneurones postérieurs, parvoneurones latéraux, parvoneurones médiaux, parvoneurones périventriculaires. En se basant sur des critères électrophysiologiques, activité électrique spontanée ou les réponses à la stimulation électrique de la neurohypophyse (Freund-Mercier et *al.*, 1975 ; Freund-Mercier et Richard, 1977), plusieurs sub-classifications des types cellulaires des neurones des PVN ont été également établies.

Le noyau arqué, est le seul qui soit impair au niveau de l'hypothalamus médiobasal. Il commence juste en arrière du chiasma optique, dans l'espace rétrochiasmatique et se prolonge jusqu'à la division mamillaire. Cette espace rétrochiasmatique est large chez le Dromadaire, ce qui fait que le noyau arqué est localisé à sa limite ventrale, loin de la base du 3V. Chez la plupart des espèces au contraire, cet espace est étroit ce qui fait que le noyau est situé dorsalement, entourant la base du 3V (Rat : Paxinos et Watson 1982 ; Vache : Lignereux, 1986 ; Chèvre : Kikusui et *al.*, 1997). L'Arc présente donc chez le Dromadaire une longue extension qui atteint la division mamillaire. Ceci attribue à ce noyau hypothalamique le caractère du noyau le plus long. Chez le Bison une image semblable a été décrite (Robak et *al.*, 1998).

Chez le Dromadaire, les deux autres noyaux de l'hypothalamus médiobasal, le ventromédian (VMH) et le dorsomédian (DMH), apparaissent postérieurement par rapport à l'Arc. Ceci a été observé également chez la Vache frisonne

(Lignereux, 1986) et le Mouton (Chaillou et *al.*, 1999). Pour le Rat, l'apparition du DMH précède celle du VMH (Paxinos et Watson, 1982 ; Bleier et *al.*, 1979).

Le VMH du Dromadaire, est situé en contact de la partie postérieure de l'aire hypothalamique antérieure (AHA) et de l'hypothalamus latéral (LH), mais également du côté ventrale et médiale de l'aire de tuber cinereum (TC). Chez le Rat, ce noyau entretient un rapport, principalement avec le TC dorsal (Bleier et *al.*, 1979).

Le VMH du Rat est subdivisé en trois parties : le dorso-médial (VMHnDM), le ventrolatéral (VMHnVL) et le central (VMHnC) (Paxinos et Watson, 1982). Chez le Dromadaire, l'histologie classique permet de bien visualiser la subdivision ventrolatérale et à moins dégradé, les deux autres subdivisions. Ces dernières (la VMHnC et la VMHnDM), sont mieux distinguées par leur contenu neuropeptidergique, visualisé par immunofluorescence.

Sur les coupes frontales dirigées rostro-caudalement, les premiers neurones de DMH apparaissent immédiatement après ceux du VMH. Ce noyau est très court mais de forte affinité tinctoriale. Sa position est différente de celle décrite chez le Rat (Paxinos et Watson, 1982 ; Bleier et *al.*, 1979) ; mais très proche de celle décrite chez la Vache (Lignereux, 1986). Le DMH se présente sous forme d'une colonne oblique ventro-médiale et s'intercale entre le fornix et le PVN. Par conséquent ce noyau ne présente pas les rapports anatomiques soulignés par Bleier et *al.* (1979) chez le Rat, notamment ceux avec le noyau arqué et le récessus mamillaire. De plus, chez le Dromadaire, les neurones magnocellulaires dans le DMH entretiennent un rapport particulier avec les neurones du noyau périfornical (PeF).

A ces trois noyaux de l'hypothalamus médiobasal (VMH, DMH et Arc), il faut souligner l'importance de l'étendu d'un autre noyau qui est petit chez d'autres espèces : le noyau tubéral. Celui-ci est défini chez le Rat (Bleier et *al.*, 1979) sous forme de deux noyaux, le tubéral médial et latéral. Ces deux noyaux n'en forment qu'un seul chez le Dromadaire et qui est en contact, ventralement avec le SONr, dorsalement avec le VMH et ventro-médialement avec l'Arc.

La subdivision mamillaire constitue la quatrième et la plus caudale des subdivisions hypothalamiques. Elle présente plusieurs noyaux :

Le noyau pré-mamillaire dorsal (DPm), et le noyau pré-mamillaire ventrale (VPm), évoluent au niveau de la région hypothalamique mamillaire dorso-caudale. Les deux noyaux contiennent des parvoneurones. Ils peuvent être distingués par leurs positions (dorsale pour le DPm et ventrale pour le VPm), leurs densités neuronales élevées et leurs rapports anatomiques. Pour le Rat, les deux noyaux évoluent au même

niveau que celui observé chez le Dromadaire. A ce niveau de l'aire hypothalamique caudale, ces noyaux n'ont pas été décrits chez la Vache par Lignereux (1986).

Dans la partie caudale de l'hypothalamus postérieur, le Dromadaire montre les mêmes structures, que celles décrites chez la Vache frisonne (Lignereux., 1986) et chez le Rat (Bleier et *al.*, 1979) ; notamment l'existence d'une structure fibreuse en forme de H, constituée, par la fusion du tronc mamillo-thalamique et du fornix. Cette structure envoie des trabicules, séparant le noyau mamillaire médian (MM) du noyau mamillaire latéral (LM), et séparant ce dernier de la *pars caudalis* du noyau tubéro-mamillaire (CP). Dorsalement à la commissure supra-mamillaire, la localisation du *pars supra-mamillaire* du noyau tubéro-mamillaire du Dromadaire, est semblable à celle décrite chez la Vache et le Rat.

2. Contenu neuropeptidergique

2.1. Noyaux suprachiasmatiques

Chez le Dromadaire, l'organisation neurochimique du SCN est différente de celle des autres espèces étudiées à ce jour. Ce noyau présente en effet une population à TH et une population à ocytocine en plus des neuropeptides classiques, AVP et VIP. Les populations de neurones à TH et à ocytocine sont particulièrement importantes dans les SCN, suggérant leur implication dans la modulation de l'activité de ce noyau. Concernant les neurones à TH, ils sont montrés pour la première fois chez cette espèce, et se répartissent en deux populations: des magnoneurones ventraux et des parvoneurones occupant le centre du noyau. Le fait que les magnoneurones à TH occupent la subdivision ventrale du noyau signifierait que ces neurones recevraient des afférences rétinienne et pourraient ainsi intervenir dans l'intégration de l'information lumineuse. Il s'avère de plus que ces neurones projettent vers la population à VIP de ce même noyau, connue pour assurer un tel rôle chez d'autres espèces (Watanabe et *al.*, 1998 ; Jacomy et *al.*, 1999 ; Maywood et *al.*, 2006). Ce type de projections pourrait participer dans la régulation de l'activité et la modulation des rythmes circadiens, renforçant le rôle joué par le VIP (Battaglia et *al.*, 1995). Chez des espèces comme le Rat et l'Arvicanthis, c'est la population à VIP du SCN qui projette vers des neurones à TH avoisinants (Gerhold et *al.*, 2001 ; Mahoney et *al.*, 2007). Par ailleurs, le VIP du SCN semble réguler l'activité neuroendocrine des neurones dopaminergiques du noyau arqué et périventriculaire (Gerhold et *al.*, 2001). Dans notre travail, il apparaît que les magnoneurones à TH du SCN projettent également vers la 2^{ème} population à TH, formée par des parvoneurones occupant le corps du noyau. Chez le Hamster syrien, des neurones à TH situés ventralement dans le SCN et dorsalement au chiasma optique

envoient également des fibres vers le corps du noyau (Novak et Nunez, 1998). La signification de cette innervation est inconnue. L'existence de la TH massivement dans le SCN du Dromadaire avec deux populations différentes (magno et parvoneurones) constitue cependant une particularité anatomique de cette espèce, qui pourrait relever de ses particularités adaptatives. Ces deux populations qui diffèrent par leur localisation dans le noyau, par leur nombre, leur taille et par leur densité d'immunoréactivité, suggère que chacune aurait un rôle différent. En absence d'un phénotypage précis de ces neurones il est difficile de spéculer plus en avant sur ces rôles. La tyrosine hydroxylase est l'enzyme limitante de la biosynthèse des catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) et catalyse la transformation de la L-tyrosine en L-DOPA (Di-hydroxy-Phényl-Alanine), qui est ensuite transformée en dopamine par l'action de l'enzyme dopa-décarboxylase (appelée également aminoacide aromatique décarboxylase (AADC)). L'AADC, permet également la conversion de 5-hydroxy-L-tryptophane (5-HTP) en 5-hydroxy-tryptamine (sérotonine) et la synthèse de certaines 'trace amines' (tryptamine, phényléthylamine, tyramine, and octopamine). Des neurones qui sont immunoréactifs positivement à TH et négativement à l'AADC (Jaeger et Joh, 1983 ; Hornung *et al.*, 1989 ; Karasawa *et al.*, 2007) ou bien qui sont immunoréactifs négativement à TH et positivement à l'AADC (Jaeger *et al.*, 1984 ; Kitahama *et al.*, 1998 ; Karasawa *et al.*, 2007) ont été décrits dans plusieurs régions du cerveau de plusieurs Mammifères. Chez le Dromadaire, nous avons voulu vérifier si les neurones à TH des SCN contiennent également l'enzyme AADC ce qui permettrait de confirmer la nature catécholaminergique des neurones. Un double immunomarquage anti-TH (Sigma®) et anti-AADC (Biomol®) a été mis en œuvre. Aucun marquage de l'AADC au niveau de l'hypothalamus n'a pu être mis en évidence. Ce n'est probablement pas une question d'anticorps puisqu'un marquage de l'AADC (résultats non présentés), a été obtenu dans certaines cellules de l'hypophyse qui correspondent aux cellules du système 'amine precursor uptake decarboxylase' (APUD). Toutefois, comme nous n'avons pas détecté une immunoréactivité dans les neurones dopaminergiques du striatum la question reste ouverte.

Aujourd'hui donc même si la présence d'une grande quantité de neurones à TH est prouvée nous ne pouvons pas dire si ces neurones sont des neurones catécholaminergiques ou des neurones non-monoaminergique (sécrétant des traces amines). Chez le Hamster syrien, l'existence de neurones immunoréactifs à la TH mais aussi à l'AADC, et situés dans les aires entourant le SCN a été décrite (Novak et Nunez, 1998). Selon ces auteurs, et sur la base de ces données, ces neurones seraient dopaminergiques. D'autres neurones, cette fois-ci, immunoréactifs uniquement à l'AADC mais pas à la TH, situés dans le corps des SCN seraient responsables

de la synthèse de trace amines (Novak et Nunez, 1998). Chez le Rat, des neurones à TH ont été aussi observés dans les zones limitrophes des SCN (van den Pol et *al.*, 1984) et des neurones à l'AADC ont été décrits dorso-médialement et dorso-latéralement dans le noyau (Inatomi, 1994). Chez le Mouton au contraire les SCN contiennent quelques rares neurones à TH, mais beaucoup de neurones à l'AADC (Tillet et *al.*, 1989, 1994). Chez le Dromadaire, nos résultats vont plutôt dans le sens d'une population non dopaminergique qui reste à confirmer.

L'observation de neurones à ocytocine dans les SCN est à notre connaissance unique constituant ainsi la deuxième caractéristique de ces noyaux et une spécificité de l'espèce. Sofroniew et Weindl, (1980) ont en effet étudié le contenu neuropeptidergique des SCN chez 13 espèces appartenant à 6 Ordres de Mammifères : les marsupiaux, rongeurs, lagomorphes, artiodactyles, carnivores et les primates, chez l'ensemble de ces animaux, les SCN sont dépourvus d'OT. Ce résultat a été relevé également dans d'autres études (Sofroniew et *al.*, 1981 ; Reuss et *al.*, 1989 ; Caba et *al.*, 1996...). Dans les SCN du Dromadaire, les neurones à OT appartiennent au système parvocellulaire. Ils sont localisés rostralement, en position ventrale, ensuite ils deviennent externes (position latérale) et ils sont moins nombreux que les neurones à AVP. Leur position ventrale leur confère cependant, comme les neurones à TH, des capacités à jouer un rôle dans l'intégration de l'information lumineuse. Pour l'OT, comme pour la TH, cette hypothèse reste à confirmer chez le Dromadaire. D'une manière générale, les neurones du système parvocellulaire, sont connus pour leur rôle dans la neuromodulation centrale (Epelbaum, 1995). Ceci suggère un rôle de l'ocytocine des SCN, dans la modulation centrale, en particulier dans le fonctionnement de l'horloge. Un tel rôle rappelle celui du VIP (Jacomy et *al.*, 1999). Par ailleurs, il a été démontré que le contrôle qu'exerce le SCN sur le rythme circadien de la sécrétion de la prolactine (dépendant de l'oestradiol) par les cellules lactophores de l'adénohypophyse est sous le contrôle des neurones à OT du PVN, dont l'activité neuronale est modulée par le VIP des SCN (Egli et *al.*, 2004 ; Kennett et *al.*, 2008). L'OT des SCN du Dromadaire pourrait directement intervenir dans le contrôle de certains rythmes comme celui de la sécrétion de la prolactine, ceci est particulièrement intéressant chez une espèce comme le Dromadaire, caractérisée par une physiologie d'adaptation particulière.

L'existence de neurones vasopressinergiques dans les SCN du Dromadaire est en accord avec ce qui a été rapporté chez les autres espèces de Mammifères (Vandesande et *al.*, 1975 ; Vandesande et Dierickx ; 1975 ; Tillet et *al.*, 1989 ; Kikusui et *al.*, 1997), la distribution de ces neurones étant cependant différente chez cette espèce. En effet, ils forment une population de parvoneurones localisée

d'abord dans le SCN rostral et ensuite dans le SCN nu. Dans ce dernier, ces neurones sont, d'abord en position ventrale, ils occupent ensuite le corps du noyau, et enfin, plus caudalement, ils forment une population dorso-médiale équivalente au « shell » décrit chez les rongeurs. Cette distribution particulière ainsi que les fortes quantités de cellules à VP semblent être une donnée chez les espèces vivants dans des biotopes où les conditions climatiques sont extrêmes à savoir les régions désertiques ou sub-désertiques, dans la mesure où en général chez d'autres Mammifères ils sont en position dorsale à dorso-médiale (Sofroniew et Weindl, 1980 ; Card et *al.*, 1981 ; Abrahamson et Moore, 2001). Chez la Gerboise (*Jaculus orientalis*), rongeur désertique vivant sous les mêmes latitudes que le Dromadaire, la VP dans les SCN, présente ainsi une forte immunoréactivité avec une localisation dorso-médiale et ventro-médiale mais également dorsale, dorso-latérale et ventrale (Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1995a). Il reste toutefois que des distributions particulières peuvent exister chez des espèces telles que la souris (Abrahamson et Moore, 2001) chez laquelle les neurones à VP des SCN sont en situation dorso-médiale et ventrolatérale.

Chez le Dromadaire, l'extension de la localisation des neurones à VP dans d'autres subdivisions que la dorso-médiane pourrait refléter des populations neuronales aux projections et aux activités fonctionnelles variées. Chez cet animal, comme toutes les espèces étudiées à ce jour, les neurones à VP situés en position dorso-médiale, joueraient un rôle crucial dans l'élaboration et la distribution des signaux circadiens. Des études ont démontré que la libération de la vasopressine dans les SCN (Kalsbeek et *al.*, 1995) ainsi que son niveau d'ARNm (Rat : Larsen et *al.*, 1994 ; Souris : Smith et Carter, 1996 ; Hamster sibérien : Duncan et *al.*, 1995), présentent des variations journalières avec une acrophase diurne. Cette rythmicité de l'ARNm mais aussi de la protéine se maintient sous des conditions constantes (Yamase et *al.*, 1991 ; Cagampang et *al.*, 1994), prouvant son caractère circadien. Il est actuellement admis que les neurones à VP des SCN joueraient un rôle dans le fonctionnement du pacemaker circadien, du moins chez les espèces dont les SCN contiennent de la VP. Il existe en effet des espèces dont les SCN sont dépourvus de VP et dans ce cas d'autres neuropeptides ou neurotransmetteurs seraient impliqués dans le fonctionnement circadien de l'horloge. Chez le Rat Brattleboro par exemple, des rythmes circadiens normaux existent alors que son SCN est complètement dépourvu de vasopressine (Sherman et *al.*, 1986) et que les bases génétiques de synthèse de ce neuropeptide sont absentes (Ingram et *al.*, 1996). Chez le Vison, (*Mustela vison*), autre espèce dont les SCN ne contiennent pas de neurones à vasopressine (Larsen et Mikkelsen, 1993), des rythmes circadiens normaux existent. L'existence des rythmes circadiens chez ces deux espèces, indique que la libération de la vasopressine n'est pas le seul

neurotransmetteur impliqué dans le transfert des signaux temporels générés par les SCN.

Dans l'hypothalamus du Dromadaire, la plus forte densité de neurones à peptide intestinal vasoactif (VIP), est observée dans les SCN, comme d'ailleurs c'est le cas chez les autres espèces Mammifères (Card et *al.*, 1981 ; Tillet et *al.*, 1989 ; Tessonnaud et *al.*, 1994 ; Abrahamson et Moore, 2001 ; Moore et *al.*, 2002). Dans le SCN rostral, les neurones à VIP se présentent sous forme d'une population de parvoneurones, sous le récessus supra-optique et en contact avec l'OVLT, suggérant chez le Dromadaire, la libération de ce peptide dans la circulation sanguine cérébrale. Caudalement dans le SCN nu, ils forment une population dense de parvoneurones, en position ventrale à ventrolatérale, homologue à celle décrite chez beaucoup de Mammifères (Card et *al.*, 1981 ; Stopa et *al.*, 1984 ; Cassone et *al.*, 1988 ; Tessonnaud et *al.*, 1994). Il est actuellement admis que la subdivision ventrolatérale des SCN reçoit des afférences rétiniennes directes (Moore, 1973; Cassone et *al.*, 1988; Ibata et *al.*, 1989; Abrahamson et Moore, 2001), dont une partie contacte synaptiquement les neurones à VIP (Ibata et *al.*, 1989). En outre, il est connu que le contenu du SCN en VIP (ARNm et protéine), présente un rythme nyctéméral dont l'expression dépend entièrement de l'alternance jour/nuit du moins chez la majorité des espèces étudiées (Shinohara et *al.*, 1993 ; Albers et *al.*, 1990 ; Yang et *al.*, 1993 ; Larsen et *al.*, 1994 ; Ibata et *al.*, 1993). De par sa localisation ventrale, la population VIP du SCN du Dromadaire pourrait également être connectée à la rétine, et de ce fait jouer un rôle dans l'intégration de l'information lumineuse. En outre, il a été démontré que dans le SCN, les neurones à VIP projettent sur les neurones à VP (Jacomy et *al.*, 1999) régulant ainsi l'activité de l'horloge par la lumière, mais jouant également un rôle important dans l'entraînement des rythmes saisonniers. Il reste cependant qu'un rôle supplémentaire a récemment été attribué au VIP dans le SCN. En effet, des preuves expérimentales démontrent que l'absence du VIP et/ou de ses récepteurs VPAC(2) chez la Souris génétiquement déficiente engendre une incapacité à entraîner et à maintenir les rythmes circadiens, tant sur le plan moléculaire (gènes horloges *mPer1*, *mPer2*, *mCry1* et gène de la VP) que sur le plan comportemental (activité locomotrice perturbée) (Harmar et *al.*, 2002). De plus, dans les SCN issues de Souris génétiquement déficientes pour le VIP et pour le gène *Vipr2*, l'application journalière *in vitro*, d'agoniste VPAC (2) restaure la rythmicité. Au vu de la particularité des SCN du Dromadaire, il serait intéressant de vérifier l'existence d'un tel rôle pour le VIP, mais également pour l'OT et la TH. Il reste cependant que le VIP agirait ou modulerait l'activité de l'horloge chez le Dromadaire par les projections montrées sur ou vers les neurones à AVP.

Les neurones à VIP dans le SCN du Dromadaire projettent en effet sur/vers les neurones à AVP des SCN situés dorso-latéralement. Ces neurones projettent également dorsalement vers le PVN et le DMH, schéma correspond à ce qui a été rapporté chez plusieurs autres espèces. Chez le Dromadaire, il est aussi probable que le VIP module l'activité des neurones à VP agissant ainsi sur l'activité de l'horloge (Watanabe et *al.*, 1998 ; Jacomy et *al.*, 1999). Les neurones à VP à leur tour, distribueraient le message circadien ainsi régulé aux autres structures du cerveau.

Chez la Gerboise, espèce vivant sous des latitudes et conditions similaires à celles du Dromadaire, le contenu du VIP dans les SCN présente des variations saisonnières, avec une immunoréactivité plus importante en automne (période de quiescence sexuelle) (automne) (Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1992). Ces variations selon ces auteurs, semblent impliquer un effet direct de la photopériode et indirect impliquant les hormones sexuelles (Oukouchoud et *al.*, 2003). Nos expériences n'ont pas encore permis d'étudier ces mécanismes chez le Dromadaire, mais au vu de la variation de la durée de libération de la mélatonine, et l'expression saisonnière de la reproduction chez notre espèce, il n'est pas exclu que la photopériode puisse moduler le contenu en ce neuropeptide dans le SCN, ainsi que celui de l'OT et/ou de la TH.

Le VIP est très souvent co-localisé avec la TH dans les parvoneurones du SCN rostral, mais pas dans le SCN nu. Par sa position très rostrale, et sa situation anatomique extra-hypothalamique, cette population ne présente pas les mêmes projections vers le DMH et le PVN que le SCN nu. Ceci indique que ces parvoneurones rostraux à VIP, auraient probablement d'autres fonctions. Comme nous avons observé, que des fibres VIP en provenance des parvoneurones du SCN rostral projetaient sur les vaisseaux de l'OVLT, l'une de ces fonctions, pourrait être le contrôle de la vasomotricité des vaisseaux au niveau de cette structure. Des fibres similaires ont été observées dans l'OVLT de la Gerbille de Mongolie un autre animal du désert (Mikkelsen et Møller, 1988).

Les fibres à NPY observées massivement dans le SCN du Dromadaire, ont été préalablement décrites dans les SCN des rongeurs (Moore et *al.*, 1984 ; Ueda et *al.*, 1986 ; Sabatino et *al.*, 1987; Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1995b ; Abrahamson et Moore, 2001). Chez le Mouton (Tillet et *al.*, 1989) et chez la plupart des primates (Ueda et *al.*, 1986 ; Moore, 1989 ; Chevassus-au-Louis et Cooper, 1998), ces fibres se présentent avec une densité très faible ou sont quasiment absentes. Chez d'autres espèces, il a été démontré que les fibres à NPY du SCN proviennent de l'IGL (Card et Moore, 1989 ; Morin et *al.*, 1992 ; Jacob et *al.*, 1999 ; Menet et *al.*, 2001). Dans la partie ventrolatérale des SCN, ces fibres sont en contact directe avec les neurones à VIP (Ibata et *al.*, 1988 ; François-Bellan et Bosler, 1992), et sont plutôt impliquées dans les mécanismes

de synchronisation non photique (Challet et *al.*, 1996, 1997 ; Juhl et *al.*, 2007). Chez le Dromadaire, cette innervation serait également originaire des IGL et jouerait également un rôle dans l'intégration des messages non photiques. En outre, la densité de ces fibres NPY, présente des variations nycthémerales (Shinohara et *al.*, 1993) et des variations saisonnières du moins chez la Gerboise (Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1995b). Si cette voie d'entraînement par l'IGL est bien démontrée chez les rongeurs, elle reste mal établie chez le Mouton et la plupart des primates, chez qui un complexe de neurones à NPY (le noyau prégeniculé), équivalent à l'IGL des rongeurs, existe pourtant, mais sans efférences vers les SCN (Moore, 1989 ; Chevassus-au-Louis et Cooper, 1998). Chez le Dromadaire, ce plexus de fibres existe, mais seuls des études combinant l'immunohistochimie et le traçage neuronal, permettront de voir si elles sont vraiment originaires de l'IGL.

La distribution de la Met-enk dans les SCN, montre l'existence de quelques rares neurones mais surtout une abondance de fibres. La grande densité de ces fibres à Met-enk dans les SCN du Dromadaire, a été observée chez plusieurs espèces : la Souris (Abrahamson et Moore, 2001), le Mouton (Tillet et *al.*, 1989 ; Tessonnaud et *al.*, 1994) et le Hamster doré (Morin et *al.*, 1992). Chez ce dernier, ces fibres proviennent des neurones situés dans l'IGL (Morin et Blanchard, 1995). Ces neurones à Met-enk, sont les seuls dans l'IGL à être activés par la lumière et à recevoir une innervation rétinienne (Juhl et *al.*, 2007). Ils participeraient à la transmission de l'information lumineuse et à l'entraînement photique de l'horloge. Un tel entraînement assuré par les neurones de l'IGL et démontré par plusieurs études lésionnelles (Harrington et Rusak, 1986 ; Pickard et *al.*, 1987 ; Edelstein et Amir, 1999) pourrait également exister chez le Dromadaire.

Les résultats du marquage 5-HT chez le dromadaire, montrent une densité élevée de fibres au niveau de l'hypothalamus et particulièrement au niveau de la zone périventriculaire et des SCN. L'existence d'une densité élevée de fibres 5-HT dans les SCN a été démontrée chez plusieurs espèces (Ueda et *al.*, 1983 ; Abrahamson et Moore, 2001...). Il est connu que ces fibres 5-HT, constituent la troisième afférence majeure au SCN, constituant une voie importante dans la transmission des stimuli non-photiques vers ce noyau. Bien caractérisée chez le hamster syrien, la modulation sérotoninergique provient d'une part d'une projection directe originaire des noyaux du raphé médian vers le SCN et d'autre part d'une projection directe des noyaux du raphé dorsal vers l'IGL (Azmitia et Segal, 1978 ; Meyer-Bernstein et Morin, 1996 ; Hay-Schmidt et *al.*, 2003 ; Vrang et *al.*, 2003). De plus chez certaines espèces (Chat, Rat), des projections rétiniennes directes ont été identifiées dans les noyaux du raphé. Les informations lumineuses pourraient donc aussi atteindre le SCN indirectement par

l'intermédiaire de fibres 5-HT-ergiques. L'existence d'une innervation importante à 5-HT dans les SCN du Dromadaire pourrait être reliée au biotope et à l'adaptation particulière de cette espèce qui nécessiterait sur un plan anatomo-fonctionnel des voies nerveuses combinant l'entraînement non photique et photique.

Plusieurs facteurs non-photiques peuvent synchroniser l'horloge circadienne des Mammifères. Ces stimuli peuvent être des facteurs comportementaux, des facteurs alimentaires ou d'autres facteurs environnementaux comme la température ambiante, d'ailleurs peu étudiée jusqu'ici. Ils peuvent être également des facteurs pharmacologiques. Il apparaît que l'innervation dense à NPY, Met-enk et 5-HT dans les SCN du Dromadaire traduirait l'importance de l'entraînement de l'horloge chez cet animal par des facteurs non-photiques. Une interaction entre les différents synchroniseurs (photique et non-photique) serait aussi très probable. Cette hypothèse pourrait être étayée par les résultats présentés au chapitre IV, et qui démontrent un entraînement de l'horloge par un facteur non photique, la température ambiante.

2.2. Noyaux paraventriculaires

Dans les PVN, des neurones ocytocinergiques ont été observés chez de nombreuses espèces (Kikusui et *al.*, 1997 ; Vrang et *al.*, 1995). Chez le Dromadaire à des niveaux de coupes intermédiaires, les neurones ocytocinergiques, sont situés médialement, principalement dans les subdivisions, des parvoneurones médiaux (PanMP) et compacte dorsale (PanDC), mais également dans la subdivision ventrale (PanV). Ils apparaissent entourés et délimités par les neurones à AVP, situés latéralement. En se dirigeant caudalement, ces neurones à OT, persistent dans la subdivision postérieure (PanPO) et leur distribution devient homogène. Chez la même espèce, El May et *al.* (1987) ont rapporté que les neurones ocytocinergiques sont en position externe et entourant ceux à vasopressine, ce qui est en désaccord avec nos résultats et ce qui existe chez les autres espèces (Rhodes et *al.*, 1981 ; Sofroniew et Glasmann, 1981). En comparant l'importance des deux populations de neurones, nos observations semblent démontrer que l'ocytocine est prédominante, et ce au regard de la courte étendue rostro-caudal de l'AVP, de la densité et de la persistance de l'OT au niveau du PVN caudal. Cette constatation de la prédominance de l'OT dans les PVN du Dromadaire ne concorde pas avec les résultats rapportés par El May et *al.* (1987), mais est en accord avec le travail d'Adamsons et *al.* (1956), qui a démontré par dosage que la quantité d'OT était supérieure à celle de l'AVP. Tous nos observations indiquent que chez le Dromadaire, le PVN est un noyau à prédominance ocytocinergique et que les autres noyaux notamment, le Tu, DMH, VMH, MAN et SON, constituent la vraie source

de la synthèse et de la libération neurohypophysaire de la VP. La libération de l'OT neurohypophysaire permet une action sur les organes génitaux internes (utérus, col) et externes (mamelles) : parturition, excrétion lactée ainsi qu'une action de régulation neuroendocrinienne et cardiovasculaire. D'autres rôles sont attribués à l'OT, notamment un rôle paracrine ou de neuromodulation, en intervenant dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Richard et *al.*, 1991), ces rôles étant assurés par le système parvocellulaire à OT (Epelbaum, 1995). Parmi les rôles récents attribués aux neurones à OT des PVN, on note la régulation du rythme circadien de la sécrétion de la prolactine qui se fait sous l'influence directe de la modulation des neurones à OT par les neurones à VIP des SCN (Egli et *al.*, 2004 ; Kennett et *al.*, 2008). Chez la Chèvre, un ruminant appartenant au même ordre des artiodactyles que le Dromadaire, l'essentiel de la vasopressine et de l'ocytocine est présent dans le système magnocellulaire hypothalamo-neurohypophysaire du PVN et du SON. Les parvoneurones à OT et AVP sont au niveau du PVN et de l'hypothalamus latéral, mais leur densité est moins importante (Kikusui et *al.*, 1997). Chez le Dromadaire, l'ocytocine neurohypophysaire est connue aussi pour ses rôles décrits ci-dessus, mais le schéma anatomique semble être différent car le système parvocellulaire est présent dans le PVN, l'Arc, les SCN et accessoirement dans les autres noyaux tubéreux, alors que le système magnocellulaire est bien individualisé dans le SON, DMH, VMH, Tu, MAN et dans le PVN.

Sur des coupes caudales du PVN (PanPO) du Dromadaire, des neurones à TH apparaissent latéralement et coexistent avec des neurones médiaux et périventriculaires à OT. Une immunoréactivité à TH a été aussi rapportée dans des neurones des PVN, chez la Souris (Pirnik et Kiss, 2005) et chez le Rat (Yagita et *al.*, 1994). Le nombre de neurones à TH semble être affecté par l'importance de la décharge vasopressinergique. Ceci a été observé sous des états de déshydratation chez le Rat (Yagita et *al.*, 1994) et dans le cas de certaines pathologies somatiques chez l'Homme (Panayotacopoulou et *al.*, 2002). D'après El Qandil et *al.* (2005), son existence dans les PVN de la Gerboise, pourrait être en faveur de l'existence de la dopamine à ce niveau. Les PVN sont situés sur la voie polynuronale qui va à la glande pinéale et qui est impliquée dans la synthèse de la mélatonine, or il est supposé qu'une partie de cette voie qui va vers la corne inter-médiolatérale de la moelle épinière thoracique est dopaminergique comme elle est ocytocinergique (Teclemariam-Mesbah et *al.*, 1997). Chez le Dromadaire, ces neurones pourraient être situés sur la voie polysynaptique qui relie les PVN à la glande pinéale, jouant un rôle dans le contrôle de la synthèse des hormones pinéale par la lumière et/ou la photopériode.

2.3. Noyaux supraoptiques

Dans les SON du Dromadaire, notre étude a montré l'existence d'une forte densité de magnoneurones à AVP et OT. Sur des coupes parasagittales, ce noyau est très prolongé caudalement, en particulier par sa population de neurones à AVP. Cette dernière est située ventralement, alors que celle à OT est localisée dorsalement. Cette distribution correspond à ce qui a été décrit chez les rongeurs (Sofroniew et Glasmann, 1981). Chez la Chèvre, les neurones à AVP sont prédominants par rapport aux neurones à OT et les deux populations sont confondues sur une grande surface du SON (Kikusui et *al.*, 1997). El May et *al.* (1987) ont décrit chez le Dromadaire, la même prédominance de la population vasopressinergique dans les SON ce qui semble contradictoire avec nos observations. En fait, nous avons noté, que la répartition dorsale pour l'OT et ventrale pour l'AVP existent jusqu'aux niveaux caudaux, où l'AVP se retrouve délimité dorsalement et ventralement par l'OT. De même, nous avons relevé dans les SON du Dromadaire, l'existence de quelques rares neurones qui co-localisent l'OT et l'AVP (approximativement 3%). Une co-localisation plus massive a été rapportée chez le Rat, sous une déshydratation de 3 jours (Telleria-Diaz et *al.*, 2001). Celle-ci semble correspondre à un recrutement de neurones ocytocinergiques qui vont commencer à synthétiser de la vasopressine (ou bien l'inverse), ou même l'activation de magnoneurones 'dormants' qui vont commencer à exprimer les deux peptides ; ce qui constitue dans tout les cas, un exemple remarquable de plasticité neuronale. Chez le Dromadaire, lors d'un essai de déshydratation (résultats non présentés), en plus de la faible mobilisation des stocks neurohypophysaire, nous n'avons pas remarqué d'augmentation de co-localisation entre l'AVP et l'OT.

Par ailleurs, et contrairement à ce qui a été observé chez de nombreuses espèces : Rat (Sims et *al.*, 1980), Chat (Obata-Tsuto et *al.*, 1983), Chien (Okamura et *al.*, 1986), Mouton (Jansen et *al.*, 1994); Homme (Romijn et *al.*, 1999), le VIP est absent dans les SON du Dromadaire, ce neuropeptide semblant intervenir exclusivement dans la régulation de l'activité des SCN dans l'hypothalamus.

2.4. Hypothalamus médiobasal

La distribution de l'AVP et de l'OT dans les DMH et VMH, montre l'existence de neurones immunoréactifs dans les deux noyaux. En effet, la majorité de neurones du DMH sont des neurones à AVP et à OT. Ces deux neuropeptides se répartissent différemment dans ce noyau. La présence d'OT est importante, mais l'AVP présente une densité neuronale plus élevée. De même la densité des neurones à AVP apparait plus forte dans le DMH que dans le PVN. Ces neurones présentent cependant des variations interspécifiques importantes. Chez la chèvre par exemple, le DMH

et le VMH n'expriment ni l'AVP ni l'OT (Kikusui et *al.*, 1997). L'existence de l'AVP et de l'OT dans le VMH semble spécifique au dromadaire. Chez les autres Mammifères, ce noyau est dépourvu de ces deux neuropeptides. Toutefois, il est connu que les neurones à OT et AVP d'un autre noyau, le MAN, sont très dispersés dans plusieurs régions du cerveau (préoptique, commissure antérieure, capsule interne, *globus pallidus...*) et en particulier dans l'hypothalamus antérieur et l'hypothalamus latéral (Sofroniew, 1985) où ces neurones forment des petits amas. L'hypothèse qui pourrait expliquer cette unicité de la présence de l'OT et de l'AVP dans le VMH du dromadaire est que ceci serait le résultat d'une extension large du noyau accessoire magnocellulaire dont les neurones dispersés, pénètrent et s'étendent au-delà des limites du noyau ventromédian. La présence massive de l'OT et surtout de l'AVP dans cette région de l'hypothalamus du Dromadaire, reflète donc une répartition anatomique particulière et doit être mise en relation avec l'adaptation particulière de cet animal à la déshydratation et sa grande capacité de rétention d'eau au niveau du rein (voir "Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire")...Des fibres immunoréactives à ces deux neuropeptides traversent le DMH et cheminent dans le LH se terminant dans le SON. Par ailleurs les fibres reliant le DMH et le SCN correspondraient à la voie décrite par Hoorneman et Buijs (1982) et représentant des afférences vasopressinergiques provenant des SCN, cette innervation selon les mêmes auteurs pourrait réguler le rythme de la prise alimentaire. Chez le Dromadaire, à notre connaissance il n'existe pas de données bibliographiques décrivant un tel rythme, néanmoins nos observations relèvent de périodes multiples de la journée (fin de l'après midi et la nuit) pendant lesquelles l'animal s'arrête de manger et commence à ruminer. Ceci pourrait témoigner de l'existence dans la journée d'un ou même de plusieurs cycles prise alimentaire-rumination. Ce genre de rythme pourrait être régulé aussi par ces fibres vasopressinergiques reliant les SCN et le DMH.

Chez le Dromadaire, le noyau arqué qui appartient au système parvocellulaire, est à prédominance vasopressinergique. Les neurones à OT constituent une population ventrolatérale à faible densité et juxtaposant les vaisseaux qui séparent le noyau arqué et le SON rétrochiasmatique. El May et *al.* (1987) chez le même animal n'a observé que des neurones à AVP. Ce résultat opposé provient à notre sens de la difficulté d'identifier la petite population ocytocinergique latérale, très limitrophe du SON rétrochiasmatique. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que cette différence d'observation ne soit que la conséquence de l'évolution des techniques d'immunocytochimie et de la performance des anticorps ! ou même de variations physiologique ou saisonnières de l'expression de ce neuropeptide dans l'Arc. De telles

variations saisonnières affectent le contenu neuropeptidergique (VP, VIP...) chez plusieurs espèces saisonnières en particulier désertiques (Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1992 ; Fuminier et *al.*, 1993) mais ce type d'étude n'est pas encore réalisé chez le Dromadaire. Il faut aussi ajouter que dans l'ARC, des neurones ocytocinergiques avec des axones qui descendent vers la tige hypophysaire ont été aussi décrit chez d'autres ruminants, par exemple les bovins (De Mey et *al.*, 1975). Par contre, chez la Chèvre, le noyau arqué ne présente pas de neurones immunoréactifs à l'OT ni d'ailleurs à l'AVP (Kikusui et *al.*, 1997). Ces fibres ocytocinergiques pénètrent l'éminence médiane par la bordure interne, elles seraient destinées à libérer l'hormone dans la neurohypophyse et appartiendrait donc au système hypothalamo-neurohypophysaire (voir plus loin).

Les seuls neurones immunoréactifs au NPY, relevés dans l'hypothalamus du Dromadaire, ont été observés dans le noyau arqué. L'existence de neurones à NPY dans le noyau arqué a été rapportée chez plusieurs espèces : le Rat (Chronwall et *al.*, 1984 ; Gehlert et *al.*, 1987 ; Shen, 1987), la Souris (Gehlert et *al.*, 1987) , le Hamster doré (Sabatino et *al.*, 1987), le Chat (Leger et *al.*, 1987), chez deux espèces de spermophile (Reuss et *al.*, 1990), le Mouton (Antonopoulos et *al.*, 1989), le Singe écureuil (Smith et *al.*, 1985) et chez l'Homme (Chronwall et *al.*, 1984). Les neurones à NPY dans ce noyau jouent un rôle de stimulation de l'appétit et de la prise du poids, contrairement à une autre population à mélanocortine qui a un effet anorexigène (pour revue : Valassi et *al.*, 2008). L'expression du NPY et sa distribution neuronale dans ce noyau est sous la dépendance du statut nutritionnel, notamment la restriction alimentaire (Brady et *al.*, 1990 ; Archer et *al.*, 2004). Les fibres à NPY, observées dans les PVN, DMH et MPOA, sont connues pour être originaires des neurones à NPY **du noyau arqué** (Bai et *al.*, 1985 ; Kerkérian et Pelletier, 1986). Ces fibres participent dans le contrôle de l'appétit et de la prise alimentaire. D'autres fibres au niveau du PVN proviennent du tronc cérébral (Sahu et *al.*, 1988). Les neurones à NPY montrés dans cette structure pourraient également chez le Dromadaire jouer un rôle dans la prise alimentaire et les cycles prise alimentaire-rumination.

Chez le Dromadaire, la TH a été marquée dans une population importante de neurones de l'Arc et des noyaux de l'hypothalamus médiobasal : le noyau tubéral et le VMH mais aussi dans le SON rétrochiasmatique. Ces neurones constituent chez le Rat ce qui est appelé, le groupe ventral de neurones à TH, et qui inclut l'aire allant du noyau arqué jusqu' à la région des noyaux dorsomédians et ventromédians ainsi que la base du diencéphale (Chan-Palay et *al.*, 1984). En plus du Rat, les neurones à TH existent dans le noyau arqué d'autres espèces telles que la Souris (Ruggiero et *al.*, 1984), le Chat (Kitahama et *al.*, 1987), le Mouton (Tillet et

Thibault, 1989), la Vache (Leshin et *al.*, 1995) et chez l'Homme (Komori et *al.*, 1991). Plusieurs rôles ont été attribués à ces neurones, qui sont pour la plupart dopaminergiques. Parmi ces rôles, l'inhibition de la sécrétion de la prolactine (Ben-Jonathan, 1985), qui se fait par une projection de fibres, soit vers la ME, soit vers la neurohypophyse ou bien le lobe intermédiaire de l'adénohypophyse. L'activité de ces neurones, qui sont baptisés 'neurones neuroendocrines', semble être régulée par les fibres à VIP provenant des SCN (Gerhold et *al.*, 2001). Chez le Dromadaire, la nature exacte de ces neurones à TH demeure inconnue jusqu'à présent. Toutefois, l'anatomie comparée suggère qu'ils seraient dopaminergiques comme chez les autres Mammifère et joueraient ainsi le même rôle dans le contrôle de sécrétion de la prolactine.

2.5. Organisation du système hypothalamo-neurohypophysaire

Plusieurs composantes neuronales des noyaux précités ci-dessus s'individualisent sur un plan anatomique et physiologique pour constituer un système à part qui intervient notamment dans la régulation de la balance hydrique. Il est connu depuis des décennies, que des fibres à OT et à VP, provenant du système magnocellulaire des PVN et SON, pénètrent la neurohypophyse à travers la bordure interne de l'éminence médiane pour relarguer ces neuro-hormones dans la circulation générale (Epelbaum, 1995), ceci constitue le système hypothalamo-neurohypophysaire. En effet, en plus du rôle circadien et saisonnier, d'autres fonctions physiologiques sont attribuées à la vasopressine centrale, notamment, le maintien de l'équilibre hydrique et le contrôle cardiovasculaire. La stimulation osmotique (déshydratation salée ou par privation d'eau) entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm dans le PVN et SON et des concentrations plasmatiques de la vasopressine (Burbach et *al.*, 1986 ; Sherman et *al.*, 1986). Chez la Mérione (*Meriones shawi*), un rongeur désertique capable de concentrer l'urine pour une rétention hydrique, une large distribution des neurones à VP est observée dans le SON et le PVN à partir de la 2^{ème} semaine de développement post-natal (Rabhi et *al.*, 1996). En plus, l'action centrale de la VP chez cette espèce est probablement particulière en regard de la large distribution de ses récepteurs dans le système nerveux central (Rabhi et *al.*, 1999). L'importance de ces récepteurs de vasopressine, notamment de type V1a, a été également relevée au niveau du rein de cette espèce (Arpin-Bott et *al.*, 2002). Par ailleurs, il a été rapporté également que la Gerboise, un autre rongeur désertique, et contrairement aux autres rongeurs de laboratoire, contient une large population de neurones et de fibres à VP dans le cerveau (Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1995a). Selon ces auteurs, ceci est en accord avec le niveau élevé de la vasopressine plasmatique, relevé chez cette espèce désertique par Baddouri et *al.* (1984). Le Dromadaire qui vit sous les mêmes conditions arides

et qui par sa taille ne peut utiliser des terriers, comme la Gerboise, pour échapper à la chaleur, s'adapte en permettant une élévation et une mobilisation rapide des mécanismes du contrôle osmotique impliquant la vasopressine (Wilson, 1984). Plus précisément, les travaux d'Achaaban et *al.* (1992) ont montré l'implication lors de la déshydratation, de la vasopressine (pas de l'ocytocine), dans la régulation osmotique au niveau du rein. Ben Goumi et *al.* (1993) ont constaté chez la même espèce, que 14 jours de déshydratation hydrique, sous un climat chaud, entraîne une augmentation rapide de la vasopressine sanguine allant jusqu'à 28 fois les concentrations normales (de 0.2 +/- 0.1 à 5.7 +/- 2.2 pg ml⁻¹). Chez le Dromadaire l'action antidiurétique observée lors de la déshydratation, est la conséquence d'une mobilisation modérée de la vasopressine. Lors d'un essai de déshydratation chez 4 dromadaires adultes (15j) (données non présentées), nous n'avons pas observés de mobilisation du stock neurohypophysaire de la vasopressine, ni de modifications apparentes dans le système hypothalamo-neurohypophysaire à VP et à OT. Toutefois, cela semble être le cas aussi chez la Gerboise, chez qui 4 semaines de deshydrartaion n'affectent pas le contenu en VP et OT dans la neurohypohyse (Raji et Nordmann, 1994). Ce résultat qui ne corrobore pas avec des niveaux élevés de VP rapporté chez la Gérboise par Baddouri et *al.* (1981), pourrait néanmoins être expliqué par une augmentation de la synthèse de la VP et un renouvellement en continue des stocks neurohypophysaire.

Si chez le Dromadaire on observe une mobilisation modérée de la vasopressine en réponse à la déshydrations, la question suivante s'impose : pourquoi y'a t-il alors autant de noyaux vasopressinergiques dans l'hypothalamus de cette espèce ? En effet, un grand nombre des neurones à AVP est présent dans les noyaux paraventriculaires (PVN), supra-optiques (SON), accessoires de l'hypothalamus latéral (MAN), dorsomédians (DMH), ventromédians (VMH) et à notre grande surprise, massivement dans le noyau tubéral (Tu). Cette large distribution, pouvait être expliquée par les autres rôles de la vasopressine (Epelbaum, 1995), notamment son action centrale, paracrine ou neuromodulatrice ou son rôle de « releasing factor ». Même si cette explication est plausible, elle est insuffisante, car ces rôles sont assurés uniquement par les parvoneurones à AVP alors que dans les noyaux cités ce sont les magnoneurones qui dominant. Ces magnoneurones à AVP, généralement dans les PVN et les SON, forment le système hypothalamo-neurohypophysaire. Ils envoient leurs fibres descendantes dans l'éminence médiane et la neurohypophyse et libèrent la vasopressine (et l'OT) dans la circulation générale. Chez le Dromadaire, le système hypothalamo-neurohypophysaire est totalement différent. Il y a bien comme chez toutes les espèces des magnoneurones à AVP et OT, dans les SON et les PVN, mais il y en a beaucoup plus

dans les DMH, VMH, MAN et surtout dans le Tu. Ceci semble spécifique au Dromadaire puisque par exemple chez la Chèvre (Kikusui et *al.*, 1997), l'Arc, le DMH, le VMH et vraisemblablement le Tu, ne contient pas de l'AVP ni de l'OT.

Des effets d'action diurétique ou antidiurétique, suivant l'espèce animale et les doses utilisées, ont été rapportées par plusieurs auteurs (Arpin-Bott et *al.*, 1997). l'OT peut se fixer sur les récepteurs V1a de la vasopressine au niveau du rein et induire une régulation de la filtration de l'eau et une excrétion des électrolytes (Arpin-Bott et *al.*, 2002). Chez le Dromadaire, espèce particulièrement adaptée à la déshydratation, un rôle de ce neuropeptide dans la rétention de l'eau renforcerait l'action antidiurétique de la vasopressine. Ceci pourrait donc expliquer pourquoi en présence d'une élévation modérée de la vasopressine plasmatique, il y'a une forte rétention d'eau qui est observée.

Le système hypothalamo-neurohypophysaire contient en plus de l'OT et de la VP, un autre peptide, la galanine (GAL) (Melander et *al.*, 1986). Ce neuropeptide co-localise avec l'AVP dans les magnoneurones de ce système (SON et PVN) chez le Rat (Skofitsch et *al.*, 1989). Chez le Dromadaire, mis à part une forte densité de fibres nerveuses à GAL dans plusieurs régions hypothalamique, aucune immunoréactivité neuronale à ce peptide n'a été relevée dans les noyaux de ce système hypothalamo-neurohypophysaire. Il faut dire que chez le Rat, l'immunomarquage de la GAL dans les neurones de ce système nécessite une fixation du processus de transport moléculaire par la colchicine (Lacas-Gervais et *al.*, 2003) ce qui bien évidemment est difficilement envisageable chez le Dromadaire.

Dans ce système de magnoneurones du PVN et du SON, La stimulation osmotique induit chez le Rat, une augmentation de la biosynthèse et de la sécrétion de GAL (Skofitsch et *al.*, 1989 ; Meister et *al.*, 1990) et du nombre de récepteur pour la GAL dans ces noyaux (Landry et *al.*, 1998). Les effets et rôles de la galanine restent encore mal compris même s'il a été suggéré qu'elle était impliquée directement dans la régulation hydrique après déshydratation. La GAL par exemple, inhibe la biosynthèse et la sécrétion de l'AVP induite par une stimulation osmotique (Kondo et *al.*, 1991 ; Landry et *al.*, 1995) et une administration systémique ou centrale de la GAL, entraîne une légère diurèse transitoire sans empêcher l'action antidiurétique de la vasopressine (Skofitsch et *al.*, 1989 ; Balment et al Barazanji, 1992). L'implication de la GAL dans la régulation hydrique se ferait donc par une interaction avec l'AVP. Chez les rongeurs désertiques, la déshydratation augmente la synthèse de l'AVP et de la GAL, les stocks neurohypophysaire étant maintenus (Baddouri et *al.*, 1981 ; Bridges et James, 1982 ; Lacas-Gervais et *al.*, 2003). Toutefois, chez un de ces rongeurs

désertiques (le *Steatomys caurinus*), la déshydratation comme chez le Rat entraîne une augmentation de la synthèse et une diminution des stocks de l'AVP et de GAL au niveau de l'hypothalamus et de la neurohypophyse (Meister et *al.*, 1990 ; Lacas-Gervais et *al.*, 2003). Le Dromadaire semble se comporter comme la plupart des rongeurs désertiques, puisque comme nous l'avons rapporté ci-dessus, ses stocks neurohypophysaires, n'ont pas été affectés par une déshydratation saline de 15 jours.

Il est connu depuis fort longtemps, que des fibres à OT et à VP, provenant du système magnocellulaire, pénètrent la neurohypophyse à travers la bordure interne de l'éminence médiane. Les neuro-hormones libérées sont impliquées dans plusieurs fonctions notamment, la régulation de la balance hydrique. Un deuxième tractus exclusivement vasopressinergique originaire du système parvocellulaire (Epelbaum, 1995), se termine sur le côté externe de l'éminence médiane et libère la vasopressine au niveau du système portale pour réguler la libération de l'ACTH au niveau de l'adénohypophyse (Turkelson et *al.*, 1982 ; Vale et *al.*, 1983 ; Sawchenko et *al.*, 1984 ; Antoni, 1993). Les études immunohistochimiques montrent, que chez le Rat les fibres vasopressinergiques pénètrent la région centrale de la tige hypophysaire alors que les fibres ocytocinergiques sont périphériques (Van Leeuwen et *al.*, 1979). Chez le Dromadaire, des fibres OT et AVP-ergiques, provenant des SON, PVN, VMH, DMH, MAN et du Tu, descendent des deux côtés de la bordure interne de l'éminence médiane vers la neurohypophyse. Ces résultats sont en accord avec ceux d'El May et *al.* (1987). Dans notre étude, nous avons observé en plus, des fibres vasopressinergiques au niveau de la partie externe de l'éminence médiane. Ces dernières seraient originaires du système parvocellulaire et participeraient à la régulation endocrine de l'adénohypophyse. Il est à signaler également que dans cette étude, nous avons observé d'autres fibres à AVP (mais aussi à VIP), qui cette fois-ci cheminent à l'intérieur de la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse.

D'une manière générale, à côté des points de similitudes, ces résultats démontrent que chez le Dromadaire, la disposition anatomique du système de la régulation hydrique (Neurone magnocellulaire à AVP et à OT) est différente de celle décrite chez les autres espèces avec une répartition plus large et non restreinte des neurones (SON, PVN, DMH, VMH, MAN et surtout le Tu).

2.6. *Autres régions hypothalamiques*

2.6.1. *Hypothalamus préoptique*

Dans l'hypothalamus préoptique, notamment la LPOA, un nombre élevé de neurones à Met-enk a été observé. Mais l'un des résultats les plus caractéristique dans cette étude, est l'existence d'une innervation extrêmement importante avec

des fibres Met-enk dans les différentes aires préoptiques, LPOA, MPOA, mais aussi dans l'hypothalamus latéral, l'aire hypothalamique antérieur et l'air du tuber cinereum. Ces fibres deviennent plus denses dans certains noyaux, notamment, le SCN, le PVN, le DMH, le noyau périventriculaire, l'Arc et le Tu. L'existence d'une telle innervation pour un peptide opioïde comme la Met-enk, qui possède de grandes propriétés analgésiques centrales (Basbaum et Fields, 1984), suggère que les mécanismes d'adaptation de lutte contre la douleur, sont importants chez le Dromadaire. Cette même hypothèse a été émise par Mensah-Brown et Garey (2006) qui ont été surpris par la très dense présence de neurones et d'innervation à la Met-enk dans la partie latérale des tubercules quadrijumeaux rostraux (*superior colliculus*) chez cette espèce.

2.6.2. Hypothalamus postérieur

Nous avons observé chez le Dromadaire, l'existence de neurones immunoréactives à GAL dans les deux pars, *caudalis* et supra-mamillaire du noyau tubéro-mamillaire et ce en absence d'une fixation du processus de transport moléculaire par la colchicine, portant nécessaire pour la mise en évidence de ce neuropéptide dans l'hypothalamus (Lacas-Gervais et al., 2003). Chez le Rat, la distribution de la GAL est large et montre des neurones dans les noyaux, pré-mamillaire ventral et dorsal (Skofitsch et Jacobowitz, 1985), ainsi que dans le noyau tubéro-mamillaire (Lantos et al., 1995) mais aussi dans le SON et PVN (Skofitsch et al., 1989) et dans d'autres régions...Chez le Dromadaire, la distribution restreinte de ce neuropéptide dans ces deux noyaux mamillaires et sans utilisation de la colchicine, semble indiquer que cette population est différente de ce qui connu chez le rat et réagit probablement à d'autres stimuli (autre que la stimulation osmotique), et que la GAL dans ces noyaux est sécrété en continue et/ou éliminée moins rapidement puisque son immunomarquage ne nécessite pas un blocage du système de transport.

L'hypothalamus postérieur montre un nombre élevé de neurones à Met-enképhaline, au niveau du noyau pré-mamillaire dorsal. Des résultats comparables ont été obtenus chez le Rat (Wamsley et al., 1980 ; Lantos et al., 1995), mais avec une distribution beaucoup plus large de ces neurones, notamment dans : le noyau périventriculaire, VMH, Arc, les noyaux pré-mamillaires : Ventral et pré-latéral, le noyau mamillaire médial, l'aire ventrolatérale au fornix et les noyaux hypothalamiques postérieures. De même, chez le Chien, cette distribution des neurones à Met-enk est très large, couvrant tout les noyaux hypothalamiques, sauf le SON (Pego-Reigosa et al., 2000). Chez d'autres espèces, par exemple un rongeur spermophile (*Spermophilus columbianus*), cette distribution est restreinte au noyau périventriculaire et à l'aire hypothalamique latérale (Nurnberger et al., 1991).

2.6.3. Régions limitrophes de l'hypothalamus

Des neurones à NPY, parfois magnocellulaires, ont été observés dans les noyaux limitrophes de l'hypothalamus préoptique et antérieur : le noyau de la bande diagonale, le noyau de la stria terminalis et le noyau septal. Les résultats obtenus concernant l'existence de neurones à NPY dans le noyau de la stria terminalis et septal, ainsi que des fibres denses allant vers la MPOA, LPOA, PVN, SON, DMH et VMH, ont été rapportés également chez plusieurs espèces : le Rat (Shen, 1987), le Hamster doré (Sabatino et al., 1987), le Chat (Leger et al., 1987) et chez deux espèces de spermophile (Reuss et al., 1990). De même, dans notre étude, nous avons constaté, l'existence de neurones à NPY dans le noyau de la bande diagonale. De tels neurones ont été relevés chez d'autres vertébrés, notamment chez le Lézard (*Gallotia galloti*) (Medina et al., 1992) et chez un amphibien (*Rhinella arenarum*) (Heer et al., 2009), alors que chez des Mammifères comme le Singe et le Rat, seuls les fibres existent dans ce noyau (Thind et al., 1993 ; McShane et al., 1994)

En conclusion, ce travail montre que, comparé aux autres Mammifères, les noyaux suprachiasmatiques (lieu de l'horloge circadienne) présentent plusieurs caractéristiques. 1) Ils sont très longs avec une extension rostrale et post chiasmatique. 2) Une présence massive de neurones à la tyrosine hydroxylase formant deux populations 3) La détection d'ocytocine dans les parvoneurones de ces noyaux implique un rôle modulateur des neurones pacemakers 4) plusieurs types d'innervation qui pourraient témoigner de la présence de voies d'entraînement photique et non photiques de l'horloge, existent massivement.

La distribution de la vasopressine et de l'ocytocine dans les magnoneurones de l'hypothalamus, montre également de grandes différences avec les autres espèces. Ce système de magnoneurones hypothalamo-neurohypophysaire chez le Dromadaire est large et comprend en plus des noyaux supra-optiques et paraventriculaires, les noyaux : dorsomédians, ventromédians, arqué, le noyau magnocellulaire de l'hypothalamus latéral et surtout le noyau tubéral qui semble jouer un rôle particulier chez cette espèce.

Chapitre II : Variations saisonnières du rythme de la mélatonine chez le Dromadaire

Nous avons souligné précédemment l'importance du caractère saisonnier de la reproduction chez le Dromadaire. De même, nous avons évoqué l'incertitude sur les facteurs environnementaux et les mécanismes neuroendocriniens sous-jacents qui contrôlent cette saisonnalité. Dans les régions tempérées, la photopériode est le facteur principal de l'environnement qui contrôle la saison de reproduction des Mammifères. Le déclenchement de la saison de reproduction au début des jours courts (Musa et *al.*, 1993), suggère que la photopériode pourrait également être le facteur environnemental clé chez le Dromadaire. Il a donc été nécessaire de déterminer si le Dromadaire, comme les autres Mammifères, est capable de percevoir et d'intégrer les informations photopériodiques.

Chez les Mammifères, le signal photique perçu par la rétine est transmis jusqu'à la glande pinéale et c'est l'absence de ce signal qui induit la libération nocturne de la noradrénaline (Drijfhout et *al.*, 1996), responsable de la synthèse de la mélatonine à ce niveau (King et Steinlechner, 1985 ; Stehle et *al.*, 2001 ; Pévet, 2002). Des concentrations élevées de mélatonine sont donc observées au cours de la nuit alors qu'elles sont basses le jour (Arendt, 1986 ; Reiter, 1986). De plus, la durée du pic nocturne de la mélatonine est proportionnelle à la longueur de la nuit (Illnerova et *al.*, 1984 ; Tast et *al.*, 2001 ; Pévet, 1988). Expérimentalement, il a été démontré que ce sont les variations de la durée du pic nocturne de la mélatonine qui informent l'organisme des changements photopériodiques (Bartness et *al.*, 1993 ; Goldman, 2001 ; Pévet, 2003). Dans les zones désertiques de latitudes basses, la photopériode présente de faibles variations annuelles. Pour qu'elle puisse néanmoins constituer un véritable signal saisonnier, des variations dans la durée du pic nocturne de la mélatonine doivent être présentes. Peu d'informations sont disponibles sur la variation de la durée de synthèse de la mélatonine chez le Dromadaire. L'existence d'un rythme de 24 h avec un pic survenant au cours de la nuit a toutefois été décrit (Kennaway et *al.*, 1977 ; Vyas et *al.*, 1997). Le présent travail a donc été mené pour vérifier chez le Dromadaire si, en fonction des variations saisonnières de la photopériode, des changements de la durée du pic nocturne de la mélatonine étaient observables. Les variations périodiques des autres paramètres de ce rythme et un éventuel effet de l'âge ont été également recherchés.

I. Protocole expérimental :

Les travaux ont été conduits dans la station de recherche cameline de la Direction Provinciale d'Agriculture de Lâayoune au sud du Maroc (latitude

27°50'N, 13°12'O). À cette latitude, le climat est désertique et l'écart photopériodique annuel est de 03 heures et 26 minutes. Les Dromadaires étaient placés dans des conditions naturelles de photopériode et de température durant toute la période de l'étude.

1. Animaux

L'étude a été réalisée sur deux groupes de dromadaires de la race du Sud (variétés : Marmouri, Khouari, Guerzni). Le premier groupe de 11 adultes était constitué de 9 femelles non gestantes et 2 mâles (tous âgés de 8 à 12 ans et ayant un poids de 301 ± 4 kg en septembre, de 298 ± 5 kg en décembre, de 302 ± 4 kg en mars et de 304 ± 4 kg en juin : le poids des animaux a été estimé en utilisant une équation pondérale usuelle chez cette espèce (Abebe et *al.*, 2002) : Poids (kg) = $[(TB \times TT \times HG) \times 52]$, où TB représente le tour de la bosse à sa base, TT est le tour du thorax devant la bosse et passant en arrière de la calotte sternale et HG est la hauteur au garrot). Le deuxième groupe était constitué de 6 chameçons impubères (tous âgés entre 2 à 3 ans et ayant un poids de 233 ± 5 kg en septembre, de 246 ± 5 kg en décembre, de 258 ± 5 kg en mars et de 266 ± 5 kg en juin).

Les Dromadaires ont été déparasités régulièrement à la Doramectine® et vaccinés contre le Poxvirus. À l'exception des périodes de prélèvements sanguins, les animaux étaient soumis à un système d'élevage semi-intensif: durant le jour, ils pâturaient de façon libre sur les parcours et revenaient volontairement le soir à la station expérimentale où ils étaient maintenus toute la nuit dans un enclos d'environ 800 m². Ils y recevaient alors un complément d'alimentation constitué de foin de luzerne, de paille de blé, d'orge, de pulpe sèche de betterave et d'un aliment composé pour bovin. Ce supplément d'alimentation visait à compenser les différences saisonnières de la qualité et de la disponibilité alimentaire sur les parcours. Il est à signaler que durant l'année de l'étude (2003-2004), ces différences ont été minimales. En effet, en raison de la sécheresse, les pâturages étaient pauvres pendant toutes les saisons et donc l'essentiel de l'apport nutritif a été assuré à la station. Par ailleurs, les animaux avaient un accès à l'eau une fois par jour, le soir, quand ils revenaient à la station expérimentale. Pendant les périodes de prélèvements les animaux restaient en stabulation permanente dans la station.

2. Prélèvements et conditions expérimentales

Des prélèvements sanguins ont été réalisés dans deux essais : 1) pour étudier les variations saisonnières du profil plasmatique de la mélatonine et 2) pour vérifier l'effet d'un créneau de lumière appliqué pendant la nuit sur les concentrations plasmatiques de l'hormone.

2.1. *Étude des variations saisonnières du profil plasmatique de la mélatonine*

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur le même animal suivant un calendrier précis, prenant en compte les 4 points cardinaux des changements photopériodiques des saisons : les équinoxes d'automne et de printemps et les solstices d'hiver et d'été (Tableau 1). Les moments exacts du lever et du coucher du soleil à l'endroit où l'étude a eu lieu ont été donnés par la Direction Régionale de la Météorologie de Rabat.

Tableau 1 : Moments de lever et de coucher du soleil aux équinoxes et aux solstices des quatre saisons d'investigation à la station expérimentale de Lâayoune.

Saisons	Date	Heure de lever de soleil	Heure du coucher de soleil
Equinoxe de l'automne	22–23 Septembre	06:44	18:44
Solstice de l'hiver	22–23 Décembre	07:42	17:59
Equinoxe du printemps	21–22 Mars	07:00	19:00
Solstice de l'été	21–22 Juin	06:02	19:45

Les prélèvements sanguins ont été réalisés selon un protocole respectant un intervalle approximatif de 3 heures (Figure 65). Le premier prélèvement est recueilli 1 h avant le coucher du soleil, suivi de 2 autres prélèvements 30 min et 1 h après le coucher du soleil. Les autres prélèvements de nuit ont été réalisés avec un intervalle approximatif de 3 heures jusqu'à l'aube. Le dernier prélèvement nocturne est réalisé 1 heure avant le lever du soleil et le premier de jour a eu lieu 1 h après le lever du soleil. Les autres prélèvements de jour étaient espacés avec un intervalle de 3 heures. L'ensemble des prélèvements a été réalisé sur une période totale de 24 h lors des deux solstices et des deux équinoxes de l'année. La stabilité du rythme a été vérifiée en analysant le profil de sécrétion chez deux chamelles sur une durée de 3 jours consécutifs et ce, au début et à la fin de l'étude.

2.2. *Étude de l'effet d'un créneau de lumière durant la nuit*

Afin de déterminer la réponse de la glande pinéale à un créneau de lumière (300 lux) durant la nuit, 5 femelles ont été exposées pendant 1 heure et 45 minutes à une lumière au milieu de la nuit (entre 23h45 et 01h30) et ce, en décembre (LD 10h20:13h40). Le sang a été prélevé suivant un intervalle de 15 minutes 3 fois de suite avant l'application du créneau de lumière, 7 fois pendant ce créneau et enfin 2 fois de suite après le retour à l'obscurité (Figure 66).

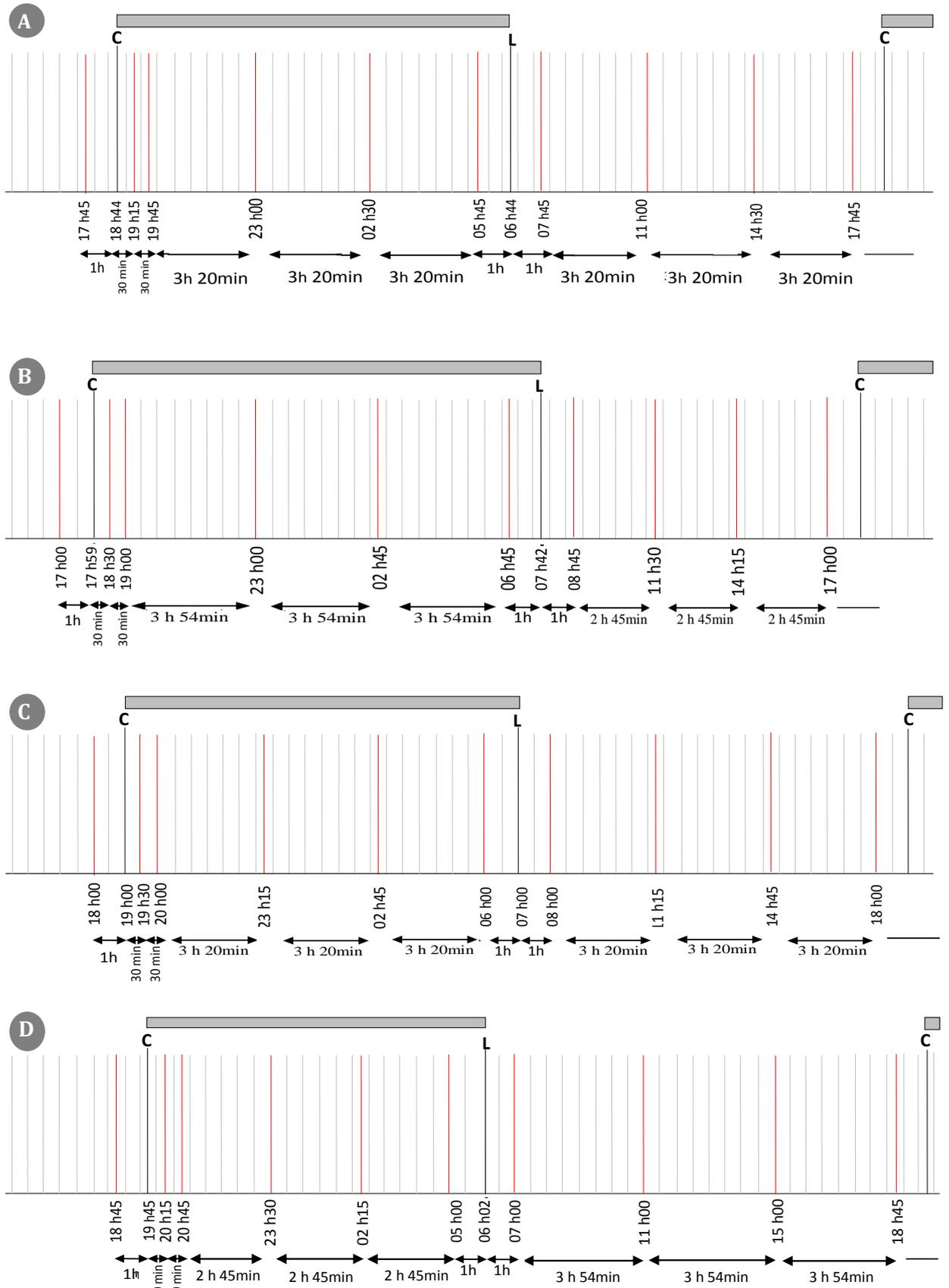


Figure 65 : Moments des prélèvements sanguins pour l'étude des variations saisonnières de la sécrétion de la mélatonine. A : équinoxe d'automne, B : solstice d'hiver, C : équinoxe du printemps et D : solstice d'été. Les lignes rouges représentent les heures de prélèvements sanguins. La nuit est représentée par les rectangles gris. C : Coucher du soleil, L : lever de soleil.

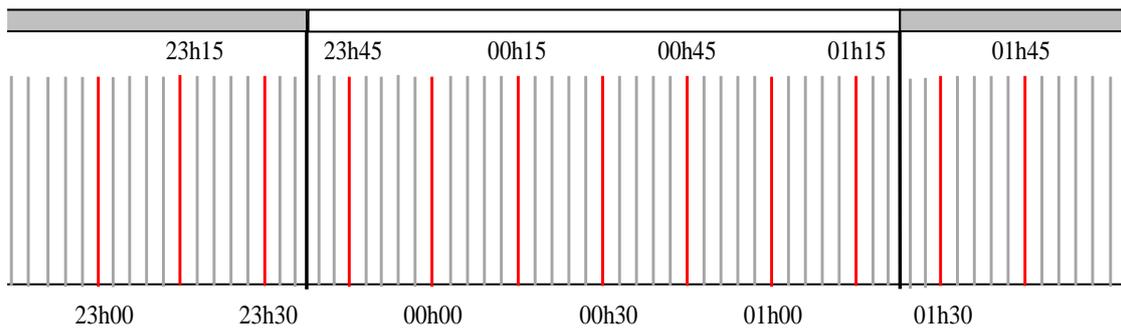


Figure 66 : Moments des prélèvements sanguins pour l'étude de l'effet d'un créneau de lumière pendant la nuit. Les lignes rouges représentent les moments de prélèvements sanguins. La période du créneau de lumière est représentée par le rectangle blanc et l'obscurité de la nuit par les rectangles gris.

La mélatonine a été dosée dans les plasmas suivant le protocole de dosage radioimmunologique détaillé dans la partie Matériel et Méthodes.

3. Analyses statistiques :

Les données des concentrations plasmatiques de la mélatonine de chaque saison ont été traitées par une équation de régression non linéaire. La courbe représentant le profil de sécrétion a été approchée et superposée à la courbe générée par l'équation suivante:

$f = y_0 + (y_{\max} / ((1 + \exp(\text{slope1} * (\text{phi1} - x))) * (1 + \exp(\text{slope2}(x - \text{phi2}))))$ (Vivien-Roels *et al.*, 1997 ; Bothorel *et al.*, 2002), où f est la concentration en mélatonine à un point 'n' des données réelles, x est le moment (temps) de ce point n, y_0 est le niveau basal obtenu durant le jour, y_{\max} est l'amplitude du pic nocturne, phi1 est le moment (temps) où la courbe atteint sa demie-montée, phi2 est le moment (temps) où la courbe atteint sa demie-descente et enfin, slope1 et slope2 représentent les pentes de la montée et de la descente. La durée du pic nocturne de la libération a été calculée comme étant la différence entre Phi1 et Phi2 . L'erreur standard (ES) a été donnée pour tous les paramètres de la régression. Un test de Student pour mesures non appariées, prenant en considération l'ES donnée par la régression, a été appliqué pour les données de chaque animal, ensuite pour la moyenne de l'ensemble des animaux, afin de révéler toute différence liée à la saison au niveau des paramètres de la régression. De même, une analyse de la variance ANOVA combinée au test de Tukey a été appliquée aux données brutes pour vérifier s'il y a un effet âge et un effet du moment de prélèvement (temps). Les différences de concentrations en mélatonine entre jeunes et adultes ont été comparées point par point selon chaque moment du calendrier des prélèvements.

II. Résultats

Le profil de la sécrétion de la mélatonine a été étudié chez deux chamelles sur une période de trois nuits consécutives (Figure 67). Les résultats montrent la présence de grandes variations intra-individuelles de l'amplitude du pic de la mélatonine, affectant d'une nuit à l'autre la forme générale de la courbe. Toutefois, la durée du pic a été constante d'une nuit à l'autre.

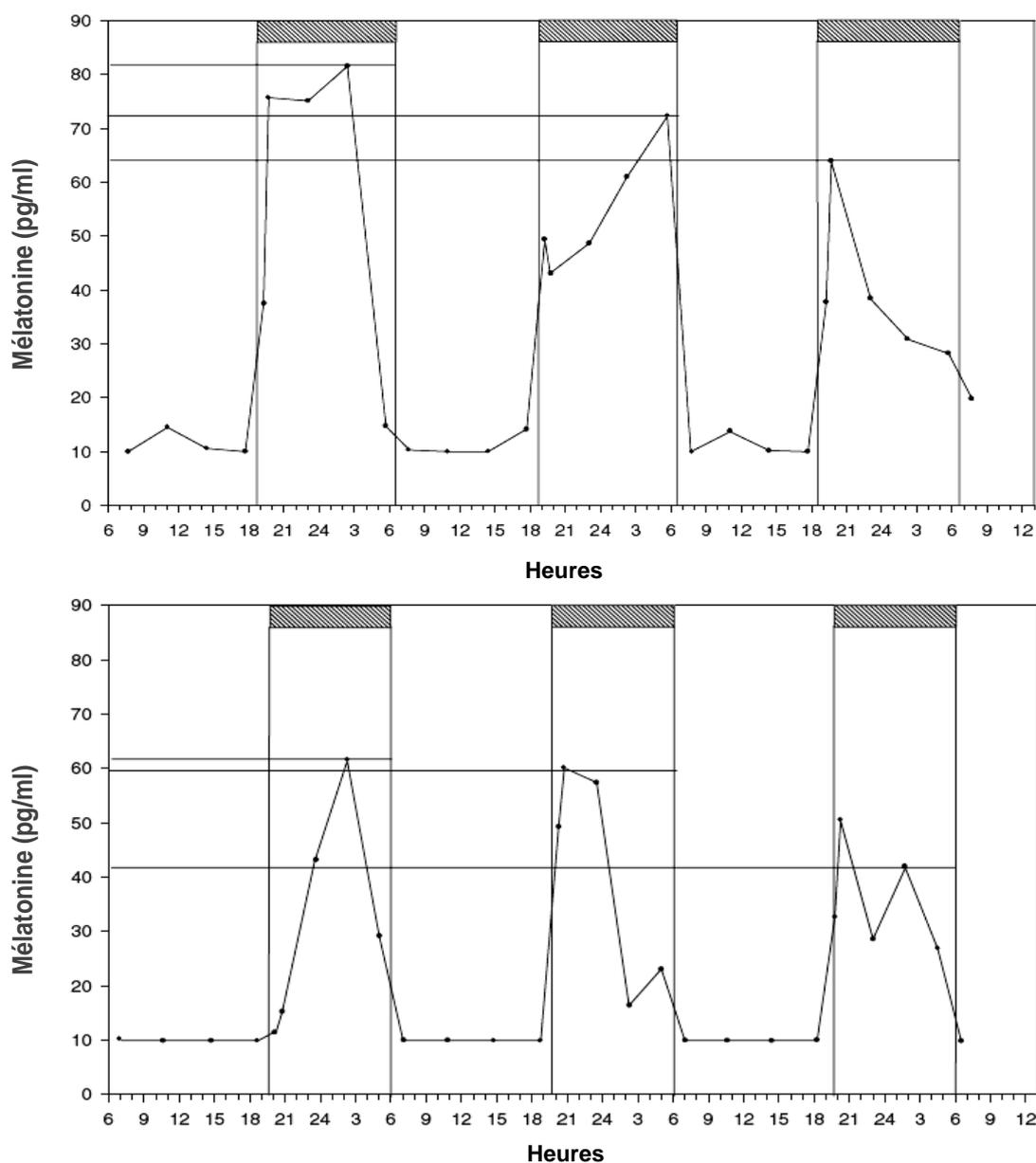


Figure 67 : Profil de sécrétion de la mélatonine chez deux chamelles sur une période de trois nuits consécutives. Les barres grises représentent la période de la nuit.

Les Figures 68 et 69 montrent les profils des moyennes (\pm l'erreur standard moyenne : E.S.M.) des concentrations plasmatiques de la mélatonine chez les Dromadaires adultes et jeunes, réalisés au cours des deux solstices d'hiver et d'été.

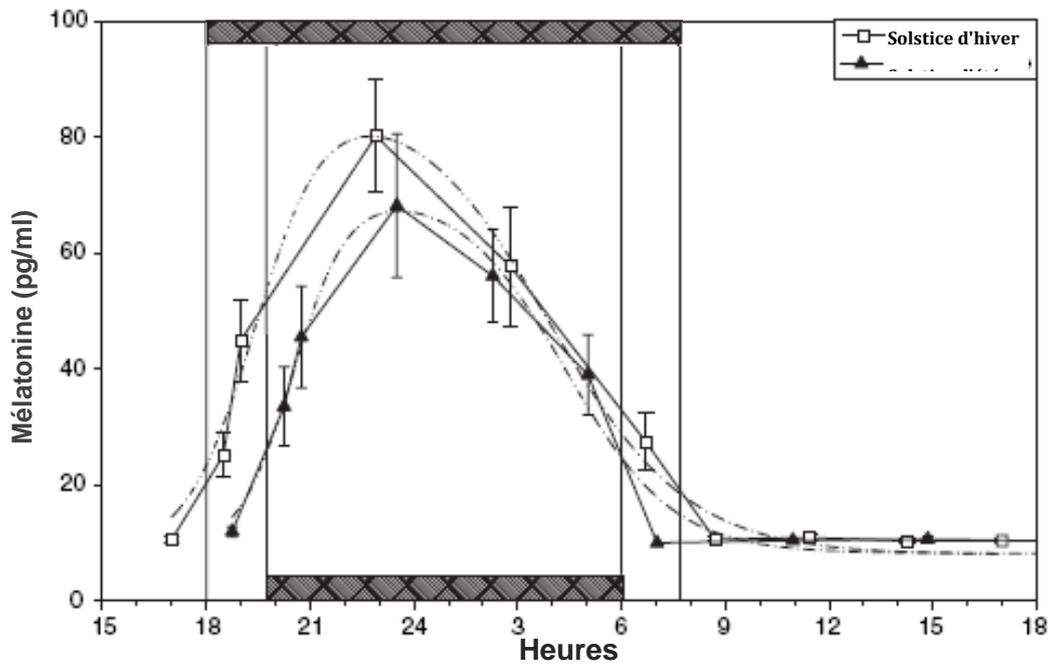


Figure 68 : Variations saisonnières du rythme de sécrétion de la mélatonine chez les Dromadaires adultes durant les deux solstices d'hiver et d'été. Les barres grises représentent la nuit. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm E.S.M.

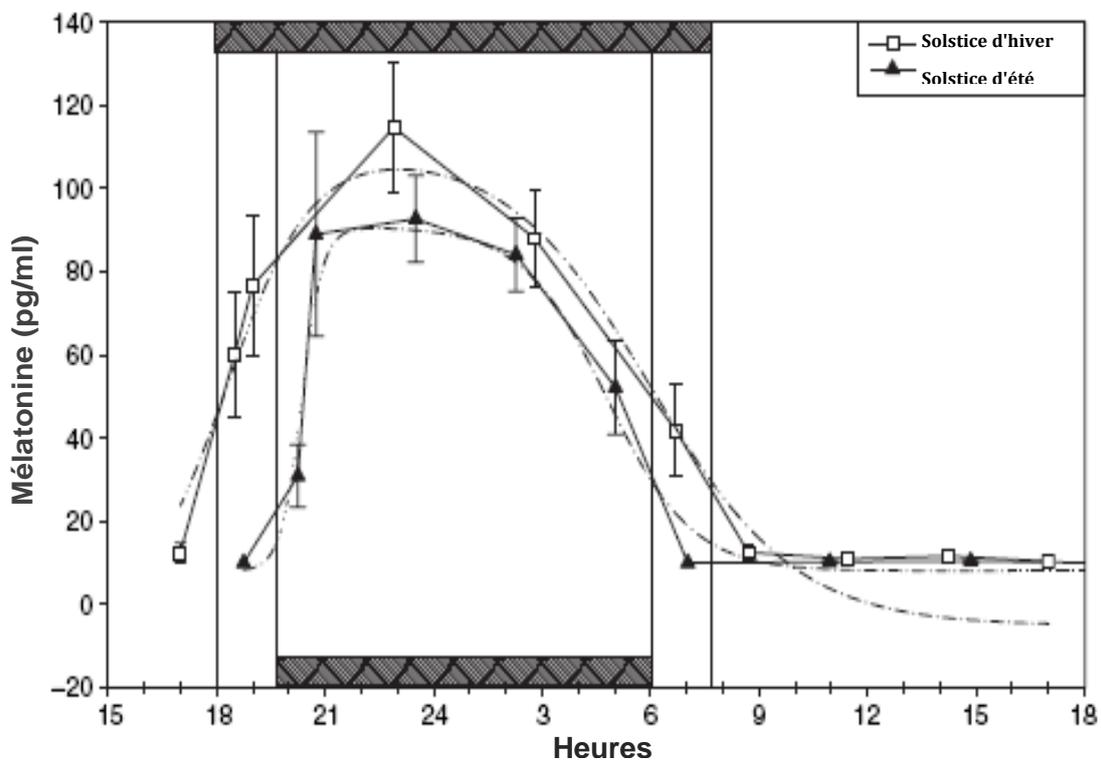


Figure 69 : Variations saisonnières du rythme de sécrétion de la mélatonine chez les Dromadaires jeunes durant les deux solstices d'hiver et d'été. Les barres grises représentent la nuit. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm E.S.M.

Les concentrations plasmatiques du jour sont faibles dans les deux groupes de Dromadaires (autour de la limite de détection de 10 pg/ml). Une demi-heure après le coucher du soleil, une augmentation marquée des concentrations plasmatiques est observée. Ainsi, la libération de la mélatonine s'élève fortement dès la tombée de la nuit pour atteindre un maximum aux alentours de minuit et ce, quelle que soit la photopériode. Par la suite, 3 h avant le lever du soleil, les concentrations de mélatonine commencent à diminuer graduellement pour atteindre à nouveau le niveau basal du jour et ceci, une heure après le lever du soleil. La même tendance a été observée pour toutes les courbes individuelles de libération de la mélatonine. Toutefois, l'amplitude du pic nocturne des concentrations plasmatiques de la mélatonine montre de très grandes variations interindividuelles allant de 20 à 200 pg/ml. L'analyse de données individuelles révèle l'existence de deux groupes d'animaux montrant soit une petite ou une grande amplitude du pic. De même, des variations intra-individuelles ont été également observées avec l'existence d'un pic nocturne biphasique irrégulier chez certains animaux.

L'analyse des régressions appliquée aux courbes individuelles de tous les Dromadaires et ensuite à la courbe moyenne n'a pas révélé de variations saisonnières concernant le niveau basal quotidien de la sécrétion de mélatonine. Ce niveau basal était chez tous les animaux et pendant toutes les saisons sous la limite de détection de 10 pg/ml. De même, l'amplitude du pic de la mélatonine, y_{\max} , n'a pas montré de variations saisonnières significatives, bien qu'elle soit particulièrement élevée au cours du solstice d'hiver. Les valeurs moyennes estimées pour ϕ_1 et ϕ_2 , respectivement le moment où la courbe atteint sa demi-montée et sa demi-descente, sont représentées dans le tableau 2. Les comparaisons entre les deux solstices ne montrent aucune différence significative du paramètre ϕ_2 . Ceci a été vérifié sur les données individuelles et sur les données de la moyenne générale des animaux. Toutefois, le paramètre ϕ_1 a été significativement ($p < 0,05$) décalé d'environ 2 heures en solstice d'été comparé à celui d'hiver. Ces différences dans le moment de la demi-montée de la sécrétion correspondent à l'écart photopériodique annuel, qui est maximal entre le mois de juin et décembre (03 heures 26 minutes sous la latitude du lieu expérimental).

Tableau 2 : Valeurs moyennes \pm E.S.M. de phi1 et phi2, calculées par la régression non linéaire en solstice d'hiver et d'été.

	Adultes (n=11)		Jeunes (n=6)	
	Hiver	Eté	Hiver	Eté
Phi 1	19.16 \pm 0.15	21.42 \pm 0.56	18.60 \pm 0.35	20.98 \pm 0.28
Phi 2	28.54 \pm 0.75	27.60 \pm 0.56	29.07 \pm 0.63	27.25 \pm 1.31

Les variations des concentrations plasmatiques de la mélatonine des cinq chamelles exposées à un créneau de lumière d'1 heure et 45 minutes au cours de la nuit sont représentées dans la Figure 70. La mélatonine chute 15 min après l'exposition à la lumière et les concentrations de base (valeur de jour) sont atteintes en 30 min. Immédiatement après le retour à l'obscurité, la concentration de mélatonine a tendance à ré-augmenter rapidement.

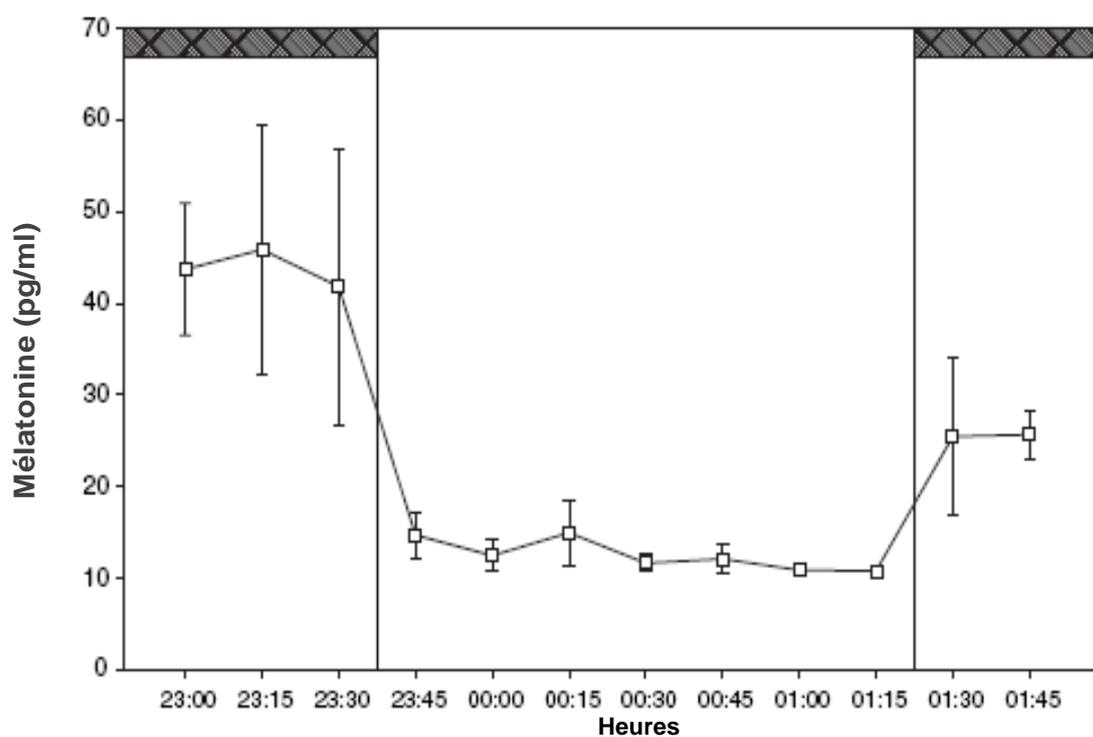


Figure 70 : Concentrations plasmatiques de la mélatonine chez cinq chamelles exposées durant la nuit à un créneau de lumière d'une durée d'une heure et 45 minutes. Les barres grises représentent les périodes d'obscurité de la nuit. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm E.S.M.

Le profil de la sécrétion de la mélatonine a été analysé pour vérifier l'existence d'un effet jour sur le niveau de base et pour examiner les différences entre les jeunes et les adultes au cours des quatre saisons (Figure 71). Les deux tests d'ANOVA ont révélé un effet significatif de la saison sur les valeurs de base (équinoxe d'automne : $F_{9,150} = 25.14, p < 0,001$; équinoxe du printemps : $F_{9,150} = 21,98, p < 0,001$; solstice d'hiver : $F_{9,150} = 17,65, p < 0,001$; solstice d'été : $F_{9,150} = 18.30, p < 0,001$). L'analyse a également montré un effet significatif de l'âge sur les niveaux plasmatiques de la mélatonine. Cet effet a été observé au cours de toutes les saisons étudiées avec des concentrations de la mélatonine plus élevées chez les jeunes Dromadaires par rapport aux adultes (équinoxe d'automne : $F_{1,150} = 29.04, p < 0,001$; équinoxe de printemps : $F_{1,150} = 8,49, p < 0,01$; solstice d'hiver : $F_{1,150} = 6.97, p < 0,01$; solstice d'été : $F_{1,150} = 4,72, p < 0,05$). Une interaction des deux facteurs, âge et moment de la journée, a également été observée au cours des équinoxes de l'automne ($F_{9,150} = 5,65, p < 0,001$) et du printemps ($F_{9,150} = 2.33, p < 0,05$). Le test de Tukey a montré que le pic de la sécrétion a été sensiblement plus élevé dans le groupe de jeunes comparativement au groupe des adultes ($p < 0,05$) et ce, durant les nuits des deux équinoxes, en particulier celui de l'automne.

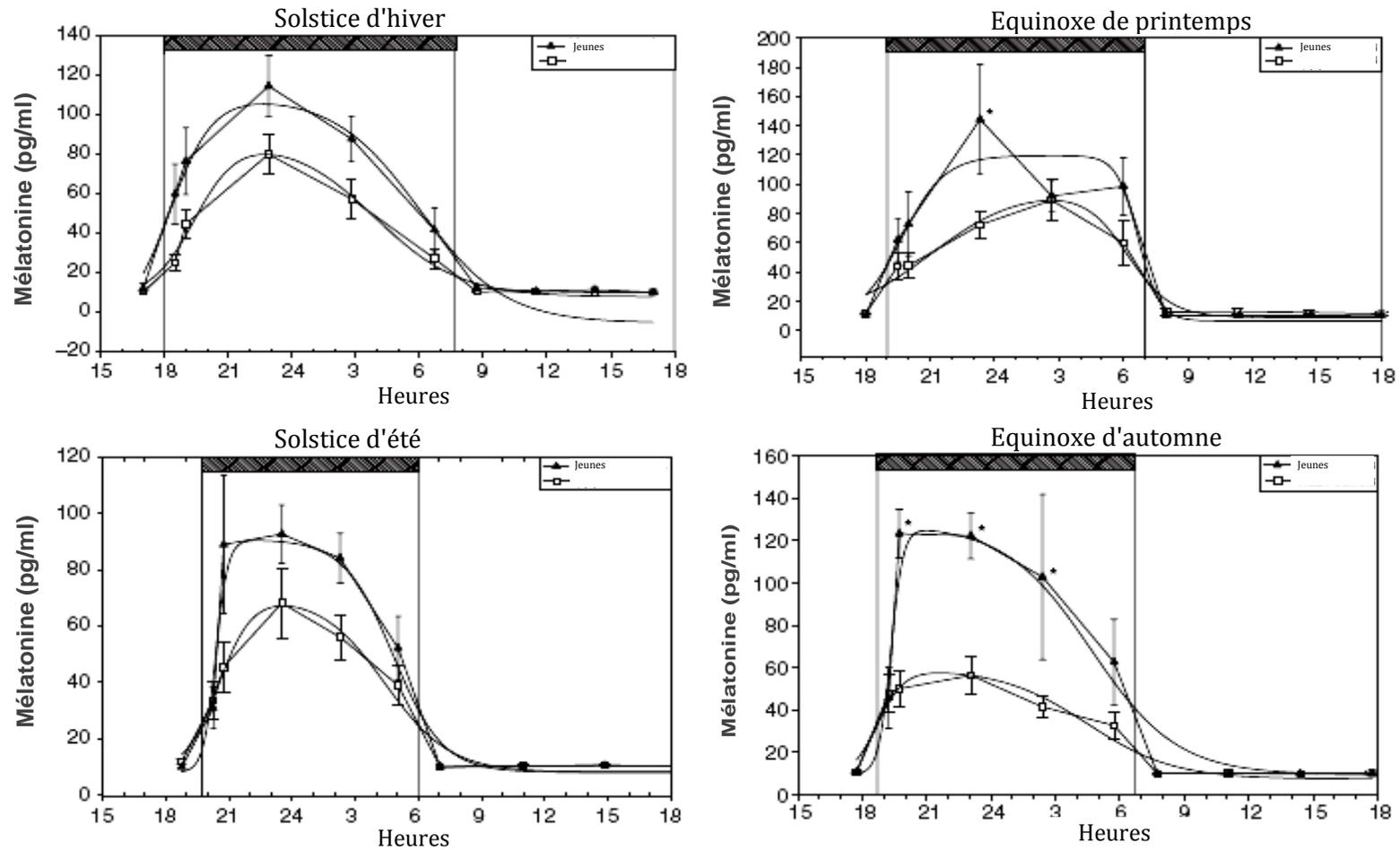


Figure 71 : Comparaison du rythme de la sécrétion plasmatique de la mélatonine entre les Dromadaires jeunes (n=6) et adultes (n=11) aux moments des équinoxes du printemps et de l'automne et des solstices de l'hiver et de l'été. Les barres grises représentent les périodes correspondant à la nuit. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm E.S.M. * : différences significatives ($p < 0.05$) par comparaison au test de Tukey.

III. Discussion

Les variations interindividuelles importantes enregistrées dans les concentrations plasmatiques de la mélatonine obtenues dans ce travail, ne sont pas une spécificité de la race ou l'espèce étudiée, ni inhérentes aux protocoles choisis. Ce type de variations a en effet été préalablement décrit chez le Dromadaire par Vyas *et al.* (1997). Cette variabilité interindividuelle du profil nocturne de la sécrétion de la mélatonine a été aussi décrite chez l'Homme (Claustrat *et al.*, 1990), et chez d'autres espèces comme les ovins (Malpaux *et al.*, 1987), le sanglier sauvage, le Porc domestique (Tast *et al.*, 2001) et le cerf ibérique (Garcia *et al.*, 2003). Ces variations pourraient être induites par un stress causé par les ponctions répétées lors des prélèvements sanguins (Stankov et Kanchev, 1989) en particulier chez les espèces sauvages ou chez les animaux domestiques élevés en système pastoral dont le mode de vie est presque sauvage. Toutefois, chez les camélidés y compris l'alpaca et le lama, le suivi des taux sériques du cortisol montre que les ponctions répétées lors des prélèvements sanguins n'ont pas un effet d'induction de stress (Anderson *et al.*, 1999). Cette grande variabilité individuelle est donc normale et relève probablement de critères génétiques.

Le suivi des concentrations plasmatiques de la mélatonine sur 3 nuits consécutives chez les deux femelles (figure 67) montre que chez le même animal les profils de sécrétion sont différents d'une nuit à l'autre. Ceci est contraire à ce qui a été décrit chez le Mouton (Chemineau *et al.*, 1996), le Rat (Barassin *et al.*, 1999), ou même l'Homme (Arendt, 1979), où un profil reproductible a été noté. Cette variabilité du profil d'une nuit à l'autre chez le même individu pourrait être attribuée à une sécrétion pulsatile de la mélatonine suggérée chez les ovins, les porcins et l'Homme, mais pas vraiment expérimentalement démontrée par certains auteurs (Malpaux *et al.*, 1987 ; Cozzi *et al.*, 1988 ; Tast *et al.*, 2001 ; Penny, 1985). Les prélèvements de sang dans notre étude n'étaient pas suffisamment fréquents (tous les 3 et 4 heures) pour vérifier une telle hypothèse de sécrétion pulsatile. Les animaux vivants à l'extérieur, il est possible que ce soit des variations journalières de l'environnement (température, humidité) qui expliquent cette variabilité des profils. Même si cela ne change rien en terme d'intégration des informations photopériodiques, cette variabilité journalière nous oblige à une certaine prudence dans l'utilisation du rythme de mélatonine comme marqueur de l'activité de l'horloge circadienne.

Les facteurs de l'environnement qui contrôlent la saisonnalité de la reproduction chez le Dromadaire ne sont pas encore définis. Certaines variations de l'environnement, telles que les précipitations, la température ambiante et l'humidité

ont été suggérées comme étant des facteurs qui pouvaient être incriminés. Ces hypothèses toutefois n'ont pas encore fait l'objet d'études rigoureuses. L'implication de la disponibilité alimentaire a été également suggérée mais, là aussi, nous manquons d'analyses convaincantes (Wilson, 1984 ; Cristofori et *al.*, 1986). Comme indiqué dans l'introduction, la photopériode courte a été souvent considérée comme le facteur externe qui contrôle ce rythme saisonnier chez le Dromadaire (Musa et *al.*, 1993). Le présent travail, où nous avons suivi le profil de la sécrétion de la mélatonine chez les mêmes animaux sous les conditions naturelles de l'environnement aux différentes saisons, est en faveur de cette dernière hypothèse. En effet, nous avons démontré que la durée de la sécrétion de la mélatonine, calculée du coucher au lever du soleil, montre une parfaite concordance avec la durée de la nuit astronomique et ce, chez tous les Dromadaires et au cours des quatre saisons. Le moment à la demi-montée du pic est significativement retardé (environ 2 heures) au solstice d'été par rapport à celui d'hiver, ce qui exprime les changements de la durée de la nuit entre l'hiver et l'été. Le moment de la demi-descente du pic nocturne par contre est statistiquement le même au cours des quatre saisons, ce qui suggère que c'est la transition jour-nuit qui serait le signal inducteur principal. Il est actuellement bien établi expérimentalement que c'est par la variation de la durée du pic nocturne de mélatonine que l'information photopériodique est intégrée par le système nerveux central et par les organes périphériques (Bartness et *al.*, 1993 ; Pévet, 2003). Cette hypothèse de 'la Durée' a été construite sur un ensemble de travaux chez les hamsters et les ovins, chez lesquels les effets d'une photopériode courte et longue ont été testés par infusion de la mélatonine (Carter et Goldman, 1983 ; Pévet et *al.*, 2002). Le Dromadaire comme tous les autres Mammifères étudiés jusqu'ici, est donc capable par l'intermédiaire des variations de la durée de sécrétion nocturne de la mélatonine d'intégrer les changements photopériodiques.

Les concentrations plasmatiques de la mélatonine augmentent fortement et rapidement après le coucher du soleil pour atteindre des niveaux élevés dans les 30 min qui suivent. Quand un créneau de lumière est appliqué au milieu de la nuit, les concentrations plasmatiques de la mélatonine baissent rapidement pour atteindre les niveaux de base observés durant le jour (à la limite de la détection de 10 pg/ml) et ré-augmentent rapidement immédiatement après le retour à l'obscurité. Ces résultats démontrent que le Dromadaire semble avoir les mêmes réponses que les autres ongulés étudiés (Ravault et Chesneau, 1996 ; Vivien-Roels et *al.*, 1999). Cette réponse rapide à la lumière suggère que la sécrétion de la mélatonine dépend d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *Aa-nat* au lieu d'une régulation transcriptionnelle, comme celle observée chez les rongeurs

(Roseboom et Klein, 1995 ; Foulkes et *al.*, 1996). Chez ces derniers, la synthèse de la mélatonine ainsi que son pic se produisent plus tardivement dans la nuit. Cette hypothèse a été vérifiée chez le Dromadaire ; elle fera l'objet du chapitre suivant.

Les Dromadaires de notre étude montrent une amplitude du pic nocturne de la mélatonine avec de grandes variations interindividuelles allant de 20 à 200 pg/ml. Ces niveaux sont similaires à ceux rapportés chez trois chamelles étudiées dans le sud de la France (Vyas et *al.*, 1997) et proches de ceux rapportés chez d'autres espèces, le Cerf rouge sauvage (Garcia et *al.*, 2003), la Chèvre (Delgadillo et Chemineau, 1992) et l'Homme (Broadway et *al.*, 1987). A noter que chez le Mouton, les niveaux du pic nocturne de la mélatonine sont plus élevés allant jusqu'à 600 pg/ml (Malpaux et *al.*, 1987 ; Vivien-Roels et *al.*, 1999). De ce fait, et même si les niveaux ont tendance à être plus élevés au cours du solstice d'hiver par rapport à celui d'été, il n'y a pas de différences saisonnières significatives de l'amplitude du pic de la mélatonine. En perspective il serait peut être important de reprendre cette analyse sur un plus grand nombre de Dromadaires. Des variations saisonnières non seulement de la durée mais aussi de l'amplitude du pic de sécrétion nocturne ont été décrit chez certains animaux du moins pour la mélatonine dosée dans la pinéale (par exemple : le Hamster syrien, Brainard et *al.*, 1982) et ceci semble traduire l'effet d'un autre facteur de l'environnement.

Les concentrations de mélatonine pendant les quatre saisons ont été plus élevées chez les jeunes que chez les adultes. Ces différences ont été plus marquées dans les deux équinoxes, en particulier celui de l'automne. Cette diminution des concentrations plasmatiques de la mélatonine avec l'âge a été également rapportée chez plusieurs espèces, y compris l'Homme (Pang et *al.*, 1984 ; Sack et *al.*, 1986). Elle serait une résultante d'une diminution avec l'âge, de la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale.

En conclusion, chez le Dromadaire vivant dans le désert marocain à des latitudes de 27°50'N, 13°12'O, le profil de la sécrétion de la mélatonine montre des variations saisonnières nettes de la durée du pic nocturne et ce, en fonction des changements photopériodiques au courant de l'année. Le Dromadaire est ainsi capable de mesurer et d'intégrer les faibles variations photopériodiques dans cette région du monde. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle chez le Dromadaire, la photopériode serait un facteur important pour la synchronisation de la fonction de reproduction avec les saisons.

Chapitre III : Expression journalière du gène *Aa-nat* dans la glande pinéale du Dromadaire

Nous avons démontré dans le chapitre précédent que les concentrations plasmatiques de la mélatonine augmentent fortement et rapidement après le coucher du soleil, laissant apparaître un pic précocement dans la nuit. Ces concentrations baissent immédiatement en réponse à l'application d'un créneau de lumière au milieu de la nuit et augmentent très rapidement après le retour à l'obscurité. Des observations similaires ont été faites chez certains ongulés (Ravault et Chesneau, 1996 ; Vivien-Roels et *al.*, 1999), et il est connu que ce type de réponse dépend des mécanismes de régulation de l'expression du gène *Aa-nat*. Ce gène code pour la synthèse de l'enzyme Arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), enzyme responsable de la synthèse rythmique de la mélatonine (Simonneaux et Ribelayga, 2003). Chez les rongeurs, l'AA-NAT n'est présente que la nuit. La transcription du gène *Aa-nat* et la synthèse ainsi que l'activation de l'enzyme dépendent de la PKA, activée par la libération nocturne de la noradrénaline (NA) (Garidou et *al.* 2002, 2003a, 2003b ; Gauer et *al.*, 1999 ; Roseboom et *al.*, 1996, 1998). Cette régulation de type transcriptionnel entraîne une montée lente des concentrations en mélatonine et l'apparition d'un pic longtemps après le début de la nuit. Chez les ongulés et les primates, au contraire, l'enzyme AA-NAT et son ARNm sont synthétisés jour et nuit. Durant le jour l'enzyme subit une protéolyse alors que pendant la nuit la libération nocturne de la NA conduit à une grande activation de la PKA qui va inhiber la protéolyse et activer l'AA-NAT (Coon et *al.*, 1995, 1996, 2001, 2002 ; Craft et *al.*, 1999 ; Ganguly et *al.*, 2001 ; Schomerus et *al.*, 2000). Ce type de mécanisme correspond à une régulation de type post-transcriptionnel, entraînant une augmentation rapide des concentrations de mélatonine après le début de l'obscurité.

Le modèle du profil de la sécrétion de la mélatonine chez le Dromadaire, similaire à celui des ovins et des primates, suggère que l'activation de l'AA-NAT serait aussi contrôlée au niveau post-transcriptionnel. Afin de tester cette hypothèse et de définir les caractéristiques de la synthèse de mélatonine, nous avons étudié l'expression du gène *Aa-nat* (par hybridation *in situ*) dans des pinéales de Dromadaires prélevées le jour et la nuit.

I. Protocole expérimental

1. Animaux

La présente étude a été réalisée en effectuant des prélèvements sur des dromadaires appartenant aux deux races, du Nord (variétés Zergua) et de Sud

(variétés Marmouri, Khouari, Guerzni) et a été conduite à l'abattoir municipal de la ville de Eddakhla (située dans une région à environnement aride et désertique dans le Sahara marocain : latitude, 23°43'N, 15°57'O). Les animaux provenant des élevages de la région étaient maintenus sous des conditions de photopériode et de température ambiante de l'environnement extérieur jusqu'à leurs abattage, effectué durant l'équinoxe du printemps (12 h Lumière : 12 h Obscurité ; lever du soleil à 07h12 et coucher de soleil à 19h12). L'abattage a été réalisé selon le rituel islamique nommé 'A Nahre' en sectionnant la bifurcation bi-jugulaire et l'origine de la carotide commune à l'entrée du thorax (EL Allouchi *et al.*, 2004).

2. Prélèvement des tissus

Immédiatement après la saignée, les têtes ont été isolées par section au niveau de l'articulation atlanto-occipitale, une décérébration a été effectuée, l'encéphale a été prélevé et disséqué. La glande pinéale et une partie du cortex ont été prélevées et congelées immédiatement à -80°C sur la carboglace puis stockées à la même température jusqu'au moment du traitement au laboratoire. Cette étude a concerné les glandes pinéales de :

- 4 dromadaires (2 mâles et 2 femelles), âgés de 3 à 5 ans et sacrifiés pendant le jour, entre 07h30 et 13h30.
- 9 dromadaires (8 mâles et 1 femelle), âgés de 3 à 4 ans et sacrifiés pendant la nuit, entre 01h00 et 04h00.

Chaque glande pinéale a été divisée en deux parties, une pour l'analyse quantitative des ARNm du gène *Aa-nat* et l'autre pour le dosage radioimmunologique de la mélatonine et pour le dosage des protéines totales.

3. Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* radioactive a été réalisée sur des coupes de glande pinéale, comme décrit dans la partie Matériel et Méthodes. L'hybridation a été réalisée avec un mélange de trois oligo-sondes à terminale marquée au ³⁵S-ATP ([³⁵S] deoxy-ATP (1250 Ci/mmol, Perkin Elmer, Zaventrum, Belgium) utilisant une terminale transférase (Roche, Meylan, France). Les séquences des oligo-nucléotides ont été conçues à partir de la séquence du gène *Aa-nat* du Rat (NM_012818 : oligo 1: 251–300, oligo 2: 491–537, oligo 3: 774–823) afin de bien couvrir la séquence du gène codant et d'éviter une éventuelle hétérogénéité entre la séquence du Dromadaire et celle du Rat. Cette technique a été utilisée avec succès dans des études sur la glande pinéale du Hamster syrien (Sinitskaya *et al.*, 2006).

Le marquage spécifique a été déterminé en comparant la différence entre le marquage dans la pinéale et le marquage au niveau du cortex. De plus, les pinéales de jour et de nuit de Rat ont été utilisées en parallèle comme contrôle intrinsèque de l'hybridation du gène *Aa-nat*.

4. Dosage de la mélatonine dans la glande pinéale

Le dosage de la mélatonine a été réalisé par RIA suivant le protocole décrit dans Matériel et Méthodes. La mélatonine est rapportée en unité de pg par mg de protéines contenues dans la pinéale. Les concentrations de la mélatonine et le taux des protéines totales ont été obtenus à partir du même fragment du tissu de la glande pinéale. Le dosage de ces protéines totales a été effectué selon la méthode de Lowry (Lowry et *al.*, 1951).

5. Analyse statistique

Les taux d'expression de l'ARNm du gène *Aa-nat* ainsi que les concentrations de la mélatonine en pg/mg de protéines ont été comparés entre le jour et la nuit. Le test *t* de *Student* nous a permis de voir s'il existait des différences significatives au cours du nyctémère avec un seuil de significativité de $p < 0,05$.

II. Résultats et Discussion

Les ARNm du gène *Aa-nat* ont été marqués par hybridation *in situ* sur des coupes de glandes pinéales prélevées au cours du jour et de la nuit. Les résultats montrent que le mélange utilisé d'oligonucléotides *Aa-nat* permet d'avoir un marquage d'hybridation dans la glande pinéale du Dromadaire (voir Figure 72) et du Rat (non illustré).

Le marquage a été très faible dans le cortex du Dromadaire (Figure 72) et du Rat (non illustré) par rapport au marquage qui a été plus intense dans la glande pinéale (Figure 72). Bien que l'hybridation sur le tissu de la glande pinéale du Dromadaire ait été réalisée avec des oligosondes hétérologues, il est peu probable que le marquage obtenu corresponde à l'hybridation d'ARNm autres que celui de l'*Aa-nat*. D'abord, parce qu'il existe une forte homologie entre les séquences *Aa-nat* des différents Mammifères ; en plus, les séquences d'oligosondes utilisées ont été choisies parmi la région la plus conservée des gènes *Aa-nat* clonés. Ceci sans oublier que le marquage obtenu correspond au résultat attendu pour le gène *Aa-nat*, très fort dans la glande pinéale et très faible dans le cortex.

Les ARNm du gène *Aa-nat* présentent une répartition homogène dans la glande pinéale du Dromadaire et ce, chez tous les animaux testés, indiquant que ce tissu est plutôt homogène et contient une forte densité de pinéaloctes. Ce résultat concorde avec l'aspect histologique de cette glande chez le Dromadaire (Sudhakar et al., 1987) et correspond à ce qui a été publié chez d'autres espèces (Møller et Baeres, 2002).

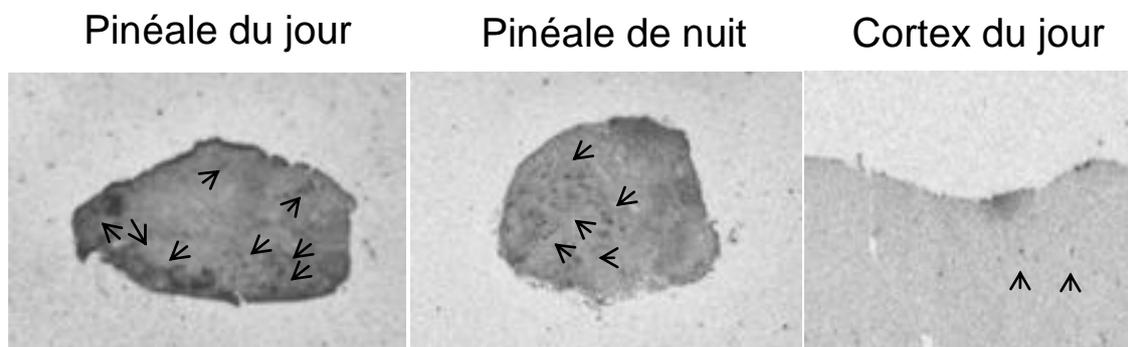


Figure 72 : Exemples de tissus de glande pinéale et du cortex d'un Dromadaire, hybridés avec une oligosonde antisens et radioactive d'*Aa-nat*. Les glandes pinéales ont été prélevées durant le jour (n=4) et durant la nuit (n=9) et le cortex est prélevé le jour (n=4). Les flèches indiquent les points de marquage d'hybridation.

La comparaison quantitative du marquage d'hybridation de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale du Dromadaire n'a montré aucune différence significative entre les niveaux d'ARNm du jour et de la nuit (Figure 73A). L'absence de variations jour/nuit des niveaux d'ARNm de la *Aa-nat* ne peut être attribuée à un défaut du protocole expérimental utilisé puisque nous avons constaté que dans la glande pinéale, les concentrations de la mélatonine sont environ cinq fois ($p < 0.05$) plus élevées la nuit par rapport au jour (voir figure 73B). Ce résultat est en parfait accord avec l'étude précédente qui a démontré l'existence d'un rythme nyctéméral de la mélatonine, bien marqué chez le Dromadaire.

Ces observations suggèrent que dans la glande pinéale du Dromadaire, le gène *Aa-nat* est constitutivement exprimé le long de la journée, et que sa transcription ne dépendrait pas de la décharge nocturne de la noradrénaline. Toutefois, celle-ci serait responsable de l'inhibition de la protéolyse et l'activation de l'AA-NAT ce qui conduit à une élévation de la synthèse de mélatonine dans la pinéale. Ce type de régulation a été rapportée dans la glande pinéale d'autres Mammifères comme le Mouton (Coon et al., 1995 ; Johnston et al., 2004), la Vache (Craft et al., 1999), les Primates (Coon et al., 2002) et l'Homme (Coon et al., 1996 ; Ackermann et al., 2006).

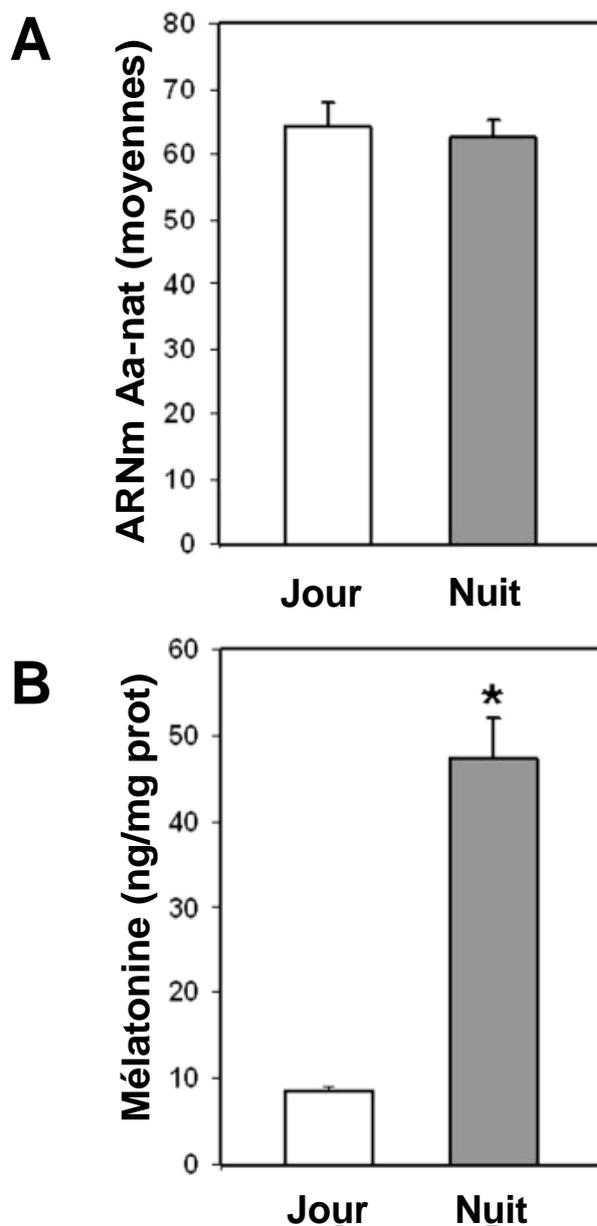


Figure 73 : Variations entre le jour et la nuit des niveaux moyens des ARNm du gène *Aa-nat* **(A)** et de la concentration de la mélatonine **(B)** dans la glande pinéale du Dromadaire. Les glandes pinéales ont été prélevées durant le jour (n=4) et durant la nuit (n=9), congelées immédiatement et divisées en 2 parties : une partie a été coupée au cryostat et a subi l'hybridation *in situ* de l'*Aa-nat*, l'autre partie a été homogénéisée dans la tricine pour doser la mélatonine et les protéines totales. * Différences significatives ($p < 0.05$) par comparaison (test *t* de Student) avec les valeurs du jour.

Les mécanismes d'activation de l'enzyme AA-NAT ont été bien étudiés dans les pinéaloctes des bovins (Schomerus et al., 2000). Il a été démontré que les ARNm

du gène *Aa-nat* sont traduits en protéine AA-NAT à la fois durant le jour et la nuit. Pendant le jour, la protéine AA-NAT est dégradée par protéolyse. Au début de la nuit, la noradrénaline libérée suite à un signal de l'horloge circadienne, se lie aux récepteurs adrénergiques et augmente à la fois l'AMPc et le Ca²⁺, conduisant à une grande activation de la PKA dépendant de l'AMPc. L'activité protéolytique est alors inhibée. De ce fait l'AA-NAT est immédiatement disponible et en conséquence une synthèse rapide et forte comme une libération de la mélatonine dans la circulation générale est observée (Hedlund et *al.*, 1977 ; Reppert et *al.*, 1979 ; Namboodiri et *al.*, 1985).

Même en l'absence d'une étude biochimique précise, difficile à envisager chez le Dromadaire, nos résultats indiquent clairement que les mécanismes impliqués dans la synthèse de la mélatonine chez le Dromadaire sont similaires à ceux décrits chez les Ovins et les Bovins. Cette conclusion est en accord avec notre observation rapportée dans le chapitre 1 d'une augmentation rapide et forte au début de nuit des concentrations plasmatiques de mélatonine.

Chapitre IV : Rythme circadien de la température corporelle chez le Dromadaire

Introduction :

L'existence d'une rythmicité circadienne, est une propriété fondamentale de tous les organismes vivants (Turek et Van Reeth, 1996). Les rythmes circadiens correspondent à une activité cyclique qui persiste en conditions constantes (absence de signaux environnementaux rythmiques) avec une périodicité proche de 24 heures (Boissin et Canguilhem, 1998). Parmi ces rythmes, le rythme de la température corporelle est l'un des plus utilisés en chronobiologie. Il est souvent utilisé en parallèle à l'étude d'autres rythmes ainsi que pour les études sur la synchronisation et la désynchronisation de l'horloge endogène (Kelly, 2006). Ce rythme présente également un intérêt pour les thermo-physiologistes qui s'intéressent aux phénomènes de régulation thermique, aux processus d'adaptations réparatrices et au maintien de l'homéostasie.

Le rythme de la température corporelle est caractérisé par une variation complexe et non linéaire, qui est assujettie à plusieurs facteurs de l'environnement (Kelly, 2006). Parmi ces variations, la synchronisation du rythme par des facteurs de l'environnement est la plus importante. Chez tous les Mammifères étudiés, le cycle lumière-obscurité constitue, le synchroniseur (zeitgeber) le plus puissant (Refinetti et Menaker, 1992). Cette synchronisation impose une période de 24,0h. Une relation de phase constante existe avec le zeitgeber (Refinetti et Menaker, 1992).

Chez plusieurs espèces, le rythme de la température corporelle a été étudié simultanément avec celui de l'activité locomotrice. Une relation de phase précise entre les deux rythmes existe et ceci permet de définir les caractéristiques qui marquent les espèces nocturnes et les espèces diurnes (Aschoff, 1960, 1970, 1979 ; Aschoff et *al.*, 1973, 1967 ; Refinetti, 1999). De même la nature endogène du rythme a été démontrée chez plusieurs espèces: Poulet (Aschoff et *al.*, 1973 ; Aschoff et von Saint Paul, 1976), Pigeon (Oshima et Ebihara, 1988) ainsi que chez des Mammifères : le Chat (Kuwabara et *al.*, 1986 ; Randall et *al.*, 1985), le Tatou (Harlow et *al.*, 1982), le Rat (Satinoff et *al.*, 1982), le Hamster (Pickard et *al.*, 1984), la Chèvre (Piccione et *al.*, 2003b), le Cheval (Piccione et *al.*, 2002) et l'Homme (Aschoff et *al.*, 1967 ; Kriebel, 1974 ; Wever, 1980).

S'agissant d'un paramètre qui présente de grandes variations interspécifiques (régulation thermique différentielle), il est primordial dans le domaine de la chronobiologie, de distinguer les espèces endothermes, des espèces ectothermes (Refinetti et Menaker, 1992). Chez les endothermes, la plupart des Mammifères,

la rythmicité de la température corporelle est stable, de nature endogène et apparemment indépendante des variations de la température ambiante et des autres facteurs de l'environnement. Chez les espèces ectothermes, par exemple, le Crocodile, la Tortue... les oscillations de la température corporelle sont principalement générées par les changements du gradient thermique, imposés par la température ambiante.

Le Dromadaire est un homéotherme non strict (Schmidt-Nielsen, 1964). Schmidt-Nielsen et *al.* (1957) ont démontré que cet animal présente un état de parfaite homéothermie quand il est hydraté, mais par contre en état de déshydratation et de température ambiante forte, l'amplitude du rythme devenait très importante (6-8°C, entre le matin et le soir) et suit celui de la température ambiante, traduisant ainsi un état de poïkilothermie correspondant à ce qui est défini actuellement sous le terme d'hétérotherme (voir précédemment). Il s'agit d'un processus d'adaptation à la déshydratation permettant au Dromadaire de minimiser les dépenses d'eau (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957 ; Yagil, 1985).

Nous avons étudié dans les chapitres précédents, les variations saisonnières et nyctémérales de la mélatonine, les mécanismes de régulation de sa sécrétion et l'anatomie des SCN et de l'hypothalamus. Dans le présent chapitre, l'objectif est de suivre sous différentes conditions expérimentales, l'expression d'un rythme circadien de nature physiologique et ce afin de mieux comprendre le fonctionnement de l'horloge et l'adaptation du Dromadaire à son environnement. Un paramètre circadien facile à quantifier est nécessaire. En considérant, l'adaptation particulière et la flexibilité du système de thermorégulation chez cette espèce, la fiabilité et la stabilité de la température corporelle et les facilités d'acquisition et de suivi en continu de celle-ci, il nous est apparu que les variations journalières de la température étaient un rythme circadien approprié et intéressant pour nos études. Même si, comme démontré dans les chapitres précédents, l'identification des rythmes de mélatonine est un argument majeur, l'objectif précis était de démontrer l'existence d'une horloge endogène biologique chez le Dromadaire et d'étudier via le rythme de température les capacités d'entraînement de l'horloge par deux facteurs environnementaux (le cycle lumière-obscurité et le cycle de la température ambiante).

L'étude s'est déroulée sur de longs mois en huit séquences (expériences) qui ont consisté en un relevé continu de la température corporelle au niveau rectale avec un thermomètre ou au niveau intramusculaire en utilisant le capteur électronique Ibutton et ceci sous différentes conditions, naturelle ou artificielle de photopériode et de température ambiante. Les données recueillies ont été traitées par les mêmes méthodes de calculs et d'analyses statistiques.

Calculs et analyses statistiques :

La synchronisation du rythme de la température corporelle avec les changements expérimentaux des conditions environnementales, est un processus qui peut s'avérer progressif et long. Les calculs ont donc porté uniquement sur les 5 derniers jours de chaque période expérimentale, au moment où le système était parfaitement en phase avec le nouvel environnement. Les paramètres suivants ont été déterminés :

La moyenne du rythme : elle a été calculée comme étant la moyenne arithmétique de toutes les données recueillies par animal. Les résultats de tous les animaux ont été moyennés pour avoir la moyenne générale de chaque étape.

L'amplitude : elle correspond à la différence entre la valeur la plus élevée et la moyenne du rythme.

La phase : elle a été étudiée en calculant deux paramètres : l'acrophase et le point de référence de la phase ascendante :

L'acrophase, qui représente le moment auquel le pic journalier survient, a été calculée en se basant sur la régression du Cosinor, appliquée au rythme moyen. L'équation de régression utilisée est de type simple : $f = y_0 + a \cdot \cos(\theta)$, où f est la température corporelle (°C) à un point, y_0 est la moyenne, a est l'amplitude, et θ est une variante de 0 à 360° représentant l'intervalle 00h00 à 24h00. La meilleure approximation du rythme est calculée par la méthode des moindres carrés. Le moment du pic sur la meilleure courbe de régression est considéré comme étant le moment de l'acrophase. Le programme Acro® (développé par roberto Refinetti et édité en 1998 ensuite en 2004, accès libre sur le site-web du laboratoire : Circadian Rhythm Laboratory University of South Carolina, USA, <http://www.circadian.org/software.html>) a été utilisé. Il permet de calculer en plus de l'acrophase, l'amplitude et la moyenne du rythme. Pour chaque paramètre, un intervalle de confiance à 95% de probabilité est donné. De même, le degré de signification de la régression est calculé.

Le point de référence de la phase ascendante : correspond au moment pendant la montée journalière où la courbe ascendante croise la valeur de la moyenne. Ce calcul a été effectué pour chaque animal sur une courbe moyennée de 24 heures et ensuite pour l'ensemble des animaux.

La période a été calculée par la procédure de 'chi square periodogram' (Sokolove et Bushell, 1978 ; Refinetti, 1993).

I. Implication de l'activité locomotrice dans la genèse du rythme de la température corporelle : Expérience 1

Une production cyclique de chaleur métabolique, résultant d'une activité locomotrice rythmique pouvant masquer les phénomènes étudiés. L'objectif de cette première expérience était de mettre en évidence un rythme de température non généré par l'activité locomotrice. L'expérimentation s'est faite sur 3 jours sur des chamelles dont l'activité locomotrice a été sévèrement restreinte.

1. Animaux

L'expérimentation a été conduite dans une étable de Dromadaires à 4 km de la ville de Dakhla (latitude 23°43'N, 15°57'O). La région, comme a été décrite dans un chapitre précédent, est désertique et constitue l'un des grands berceaux de l'élevage du Dromadaire au Maroc. Six chamelles, de variétés Khouari et Guerzni, toutes adultes, âgées de 8 à 12 ans, non gestantes et constituant le groupe 1, ont été utilisées. Leur activité locomotrice a été totalement restreinte en les forçant à un décubitus sternal. Elles recevaient quotidiennement, et à volonté, l'eau et des aliments. Ceux-ci étaient constitués de tourteaux d'olives, d'orge concassée, de son de blé et d'un aliment composé pour bovins. Les animaux ont été maintenus en conditions extérieures d'environnement au solstice d'été (photopériode LD 13,5:10,5 ; le lever du soleil : 06h22 ; le coucher du soleil : 19h55).

2. Protocole expérimental

Les mesures de la température ont été effectuées toutes les 2 heures pendant 3 jours consécutifs. Le thermomètre utilisé est de type digital, avec une échelle de lecture allant de 32°C à 42°C et d'une sensibilité de 0,1°C. Pour chaque relevé de température rectale, le thermomètre est introduit dans le rectum à une profondeur de 8 cm à 10 cm et plaqué contre la paroi dorsale de la muqueuse. Après le bip sonore, la lecture est faite et les données sont notées sur un tableau.

Les relevés de la température ambiante ont été réalisés par trois thermomètres à mercure '*France styl thermo*'® avec une sensibilité de 0,1°C et placés à trois différents endroits de l'étable. Les données des trois thermomètres étaient homogènes. La lecture de cette température a été réalisée toutes les 2 heures, simultanément avec la prise de la température rectale. Pour un besoin de contrôle des variations de la température ambiante, nous avons également considéré les températures, maximale et minimale sur 24 h, enregistrées automatiquement sur chaque thermomètre.

3. Résultats

La figure 74 montre l'évolution du rythme moyen de la température rectale chez les six chamelles, maintenues sous des conditions naturelles de l'environnement avec un accès libre à l'eau et aux aliments et gardées en inactivité par un décubitus sternal forcé. Le résultat montre l'existence d'un rythme journalier de la température rectale, caractérisé par une moyenne de $37.91 \pm 0.27^{\circ}\text{C}$, une amplitude moyenne de $2.50 \pm 0,43^{\circ}\text{C}$, un point de référence de la phase ascendante à 12h 45 et une acrophase à 18h00 ($18,0 \pm 0,43$). La période calculée par les périodogrammes est de 24.0h. D'après la figure 74, la courbe de la température rectale montre les niveaux les plus faibles au début du jour, dans les environs de 8h00 du matin et ensuite il y'a une augmentation progressive de la température pour atteindre les niveaux les plus élevés qui sont observés au début de la soirée vers 18h00. Durant la nuit, la température rectale commence à descendre pour atteindre les degrés les plus faibles, observés au début de la matinée. En comparant le rythme de température rectale avec le cycle de la température ambiante, nous constatons un parallélisme des deux courbes mais avec un déphasage. En effet, la température rectale commence sa phase descendante 4h après celle de la température ambiante. Par ailleurs, après cette descente et pendant que la température ambiante se stabilise dans un intervalle à faible variation 19 à 20,5 °C durant 10 à 12 heures, la température rectale continue sa chute jusqu'au matin.

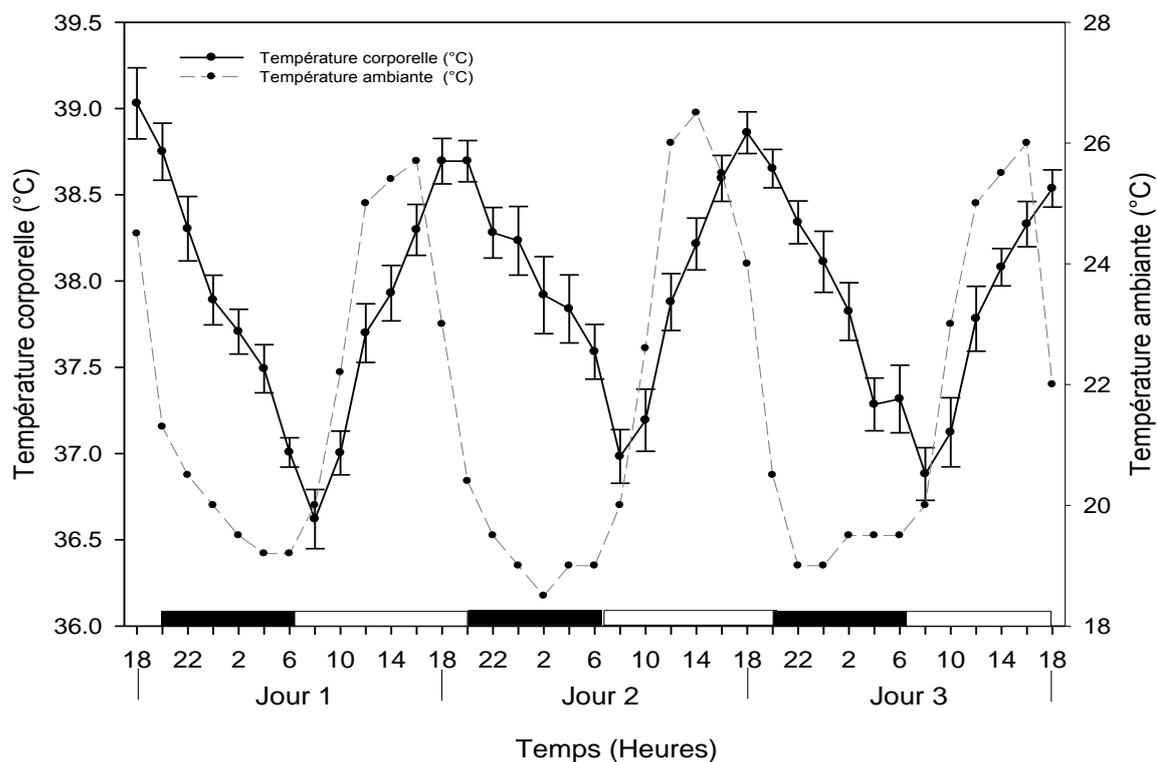


Figure 74 : Rythme moyen de la température rectale de 6 chamelles ($m \pm SEM$), maintenues sous des conditions naturelles de photopériode et de température ambiante et sous une activité locomotrice restreinte par un décubitus sternal forcé. La courbe de la température ambiante est représentée parallèlement à la courbe de la température corporelle. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière -obscurité.

II. Démonstration de l'existence d'une horloge biologique

1. Suivi du rythme de la température corporelle avec un thermomètre digital : Expérience 2

1.1. Animaux

En utilisant toujours le même type de thermomètre digital, la température rectale a été suivie chez un 2^{ème} groupe de chamelles : 8 femelles originaires de la station expérimentale de Laayoune au sud marocain -latitude 27°50'N, 13° 12'O-et placées depuis 2 ans au nord du Maroc dans la station d'Insémination Artificielle de Ain Jamâa - Latitude, 33°34' N, 7°40'O-. Ces chamelles étaient toutes adultes (âgées de 7-12 ans), non gestantes et de variétés Marmouri, Khouari et Guerzni. Elles ont été déparasitées régulièrement contre les parasites internes et externes avec la Doramectine et vaccinées contre le Poxvirus. Elles ont été élevées en système semi-intensif, s'alimentant sur le pâturage de la station et recevant une alimentation constituée, de foin de luzerne,

de paille, d'orge et de son de blé. L'eau était fournie à volonté avec des abreuvoirs automatiques auxquels les chèvres ont été entraînées depuis 2 ans.

1.2. Protocole expérimental

Les variations de la température rectale ont été suivies toutes les 2 heures. Le procédé du relevé de la température rectale était le même que celui décrit ci-dessus. Les conditions générales suivantes ont été adoptées dans cet essai, ainsi que dans l'ensemble des protocoles qui ont suivi :

Afin d'éviter la déshydratation et l'apparition d'un état de poïkilothermie, les animaux avaient un accès libre à l'eau. De même, afin d'éviter un entraînement du rythme par la distribution alimentaire, un cycle de 4 rations par 24 h a été adopté. Ces rations contenaient toutes, le fourrage et un aliment concentré. La paille dont les apports énergétiques et azotés sont minimes, a été fournie à volonté.

L'activité locomotrice des animaux a été restreinte. En attachant le licol à la barre des mangeoires ou aux murs de l'étable, les chèvres pouvaient, uniquement, se mettre debout ou s'asseoir en décubitus sternal. L'objectif était de prévenir un entraînement du rythme de la température corporelle par une activité locomotrice intense. Cette technique de restriction a été contrôlée en dehors de l'expérience 2 par la mesure de l'activité locomotrice. La figure 75 montre l'enregistrement de ce rythme par un actimètre (Actirac®, IM Systems, USA), qui a été placé sur le membre thoracique (au niveau du paturon) d'une chèvre, d'abord attachée par le licol aux mangeoires et par la suite libérée de toutes entraves. D'après cette figure, les mouvements enregistrés par l'actimètre durant la période pendant laquelle la chèvre est attachée, sont très faibles et aléatoires par rapport à la deuxième période, pendant laquelle elle était libre et détachée d'entraves. Ceci a permis de valider la technique de contention utilisée pour la restriction de l'activité locomotrice.

L'expérimentation s'est déroulée en trois phases :

Phase I, LD naturel +TC : à l'étable, les chèvres ont été maintenues sous une photopériode naturelle de saison (mois d'avril, LD 13,5:10,5) et sous une température ambiante contrôlée et fixée à $22,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Cette phase a duré 5 jours.

Phase II, DD + TC : les chèvres ont été maintenues durant 5 jours sous des conditions constantes, c'est-à-dire en obscurité totale (DD) et à une température ambiante contrôlée et fixée à $22,4 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$.

Phase III, environnement naturel : les animaux ont été remis à l'extérieur sous les conditions naturelles de l'environnement en photopériode (LD 13,5:10,5) et en température ambiante. Cette phase a duré 2 jours.

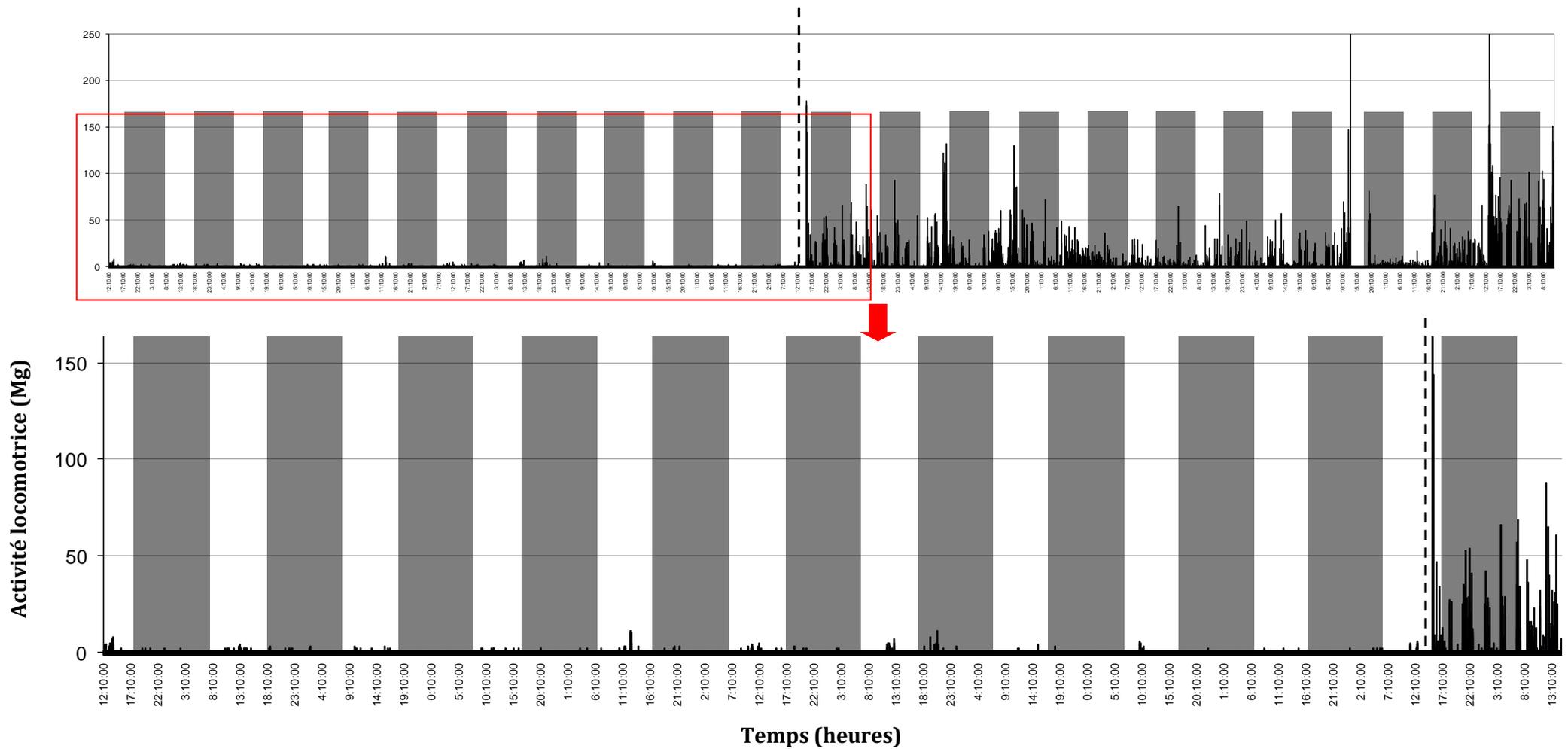


Figure 75 : Mesure de l'activité locomotrice d'une chamelle par un actimètre (Actirac®, IM Systems, USA) placé sur le membre thoracique (au niveau du paturon). La chamelle a subi d'abord une phase de restriction de son activité locomotrice en attachant le licol aux mangeoires, pendant 10 jours et par la suite elle a été libérée de toutes entraves pendant la deuxième phase qui a durée 11 jours. Le graphique en haut montre l'activité locomotrice en fonction du temps pendant toute la période des deux phases et l'autre graphique en bas, représente un agrandissement sur le premier graphique, en montrant la première phase et le début de la deuxième phase. L'activité locomotrice est donnée en Mg (milli g) où g est la vitesse d'accélération de la gravité sur Terre. Le passage de la 1ère phase à la 2ème phase est marqué par un trait discontinu. Les rectangles gris correspondent à la phase obscure du cycle lumière-obscurité naturel.

1.3. Résultats

Les résultats obtenus montrent que sous une photopériode naturelle et une température ambiante fixe (phase I), un rythme de la température rectale existe avec une période de 24,0h et que ce rythme persiste sous les conditions constantes : phase II (Figure 76) avec une période de 24,5h. La persistance de ce rythme sous les conditions constantes avec une période proche de 24,0h, démontre la nature circadienne de ce rythme et l'existence d'une horloge biologique endogène chez le Dromadaire. Ces conclusions seront confirmées par les expériences 6 et 7 avec le capteur électronique Ibutton.

Durant la phase I, la moyenne du rythme est de $37,39 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ et l'amplitude est de $0,86 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$. Sous la photopériode naturelle et la température ambiante fixe de cette phase, le rythme moyen de la température rectale commence sa phase ascendante au début du jour, atteint son point de référence à 17h00 : 1 heure et 58 minutes avant la transition lumière–obscurité (Figure 77) et continue par la suite son augmentation pour engendrer un pic durant la nuit avec une acrophase survenant à $00\text{h}12 \pm 17\text{min}$ (Figure 78). Comme le montre cette figure, le cycle adopté pour la distribution alimentaire et qui consiste en 4 rations par 24h, n'affecte pas le rythme de la température rectale. Durant les conditions constantes de la phase II, la température moyenne du rythme est de $37,37 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$, l'amplitude est de $1,21 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$ et l'acrophase est à $21\text{h}24 \pm 36\text{min}$. En remettant les animaux à l'extérieur, sous les conditions naturelles de photopériode et de température ambiante (phase III), l'amplitude du rythme de la température rectale devient élevée (Figure 76) : $2,50 \pm 0,35^{\circ}\text{C}$ et la moyenne reste stabilisée à $37,20 \pm 0,29^{\circ}\text{C}$. L'acrophase survient à $16\text{h}48 \pm 66\text{min}$ presque 5 heures d'avance par rapport aux phases précédentes. Ceci indique que la température ambiante affecte la phase et l'amplitude du rythme circadien de la température rectale.

Les résultats de cette expérience 2, démontrent que chez le Dromadaire, le rythme de la température rectale est de nature endogène avec une période circadienne de 24,5h sous obscurité constante et que la température ambiante pourrait être un facteur d'entraînement.

2. Suivi du rythme de la température corporelle avec un capteur électronique

Les développements technologiques dans notre domaine, nous ont permis d'introduire un nouvel outil électronique pour la mesure en continu de la température corporelle sur des animaux libres de leurs mouvements. Les expériences entreprises

avec le thermomètre digital ont été donc reprises, affinées et complétées avec ce nouveau capteur électronique. Pour ces études, nous avons acquis un nouveau troupeau de chamelles qui correspond au groupe 3 et qui a été placé au nord du Maroc, à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat (Latitude 34°03'N, 6°46'O).

Le caractère endogène du rythme de la température corporelle démontré sous DD en utilisant le thermomètre digital est retrouvé en DD et également mis en évidence sous LL dans certaines phases des nouveaux protocoles (voir plus loin les expériences 6 et 7).

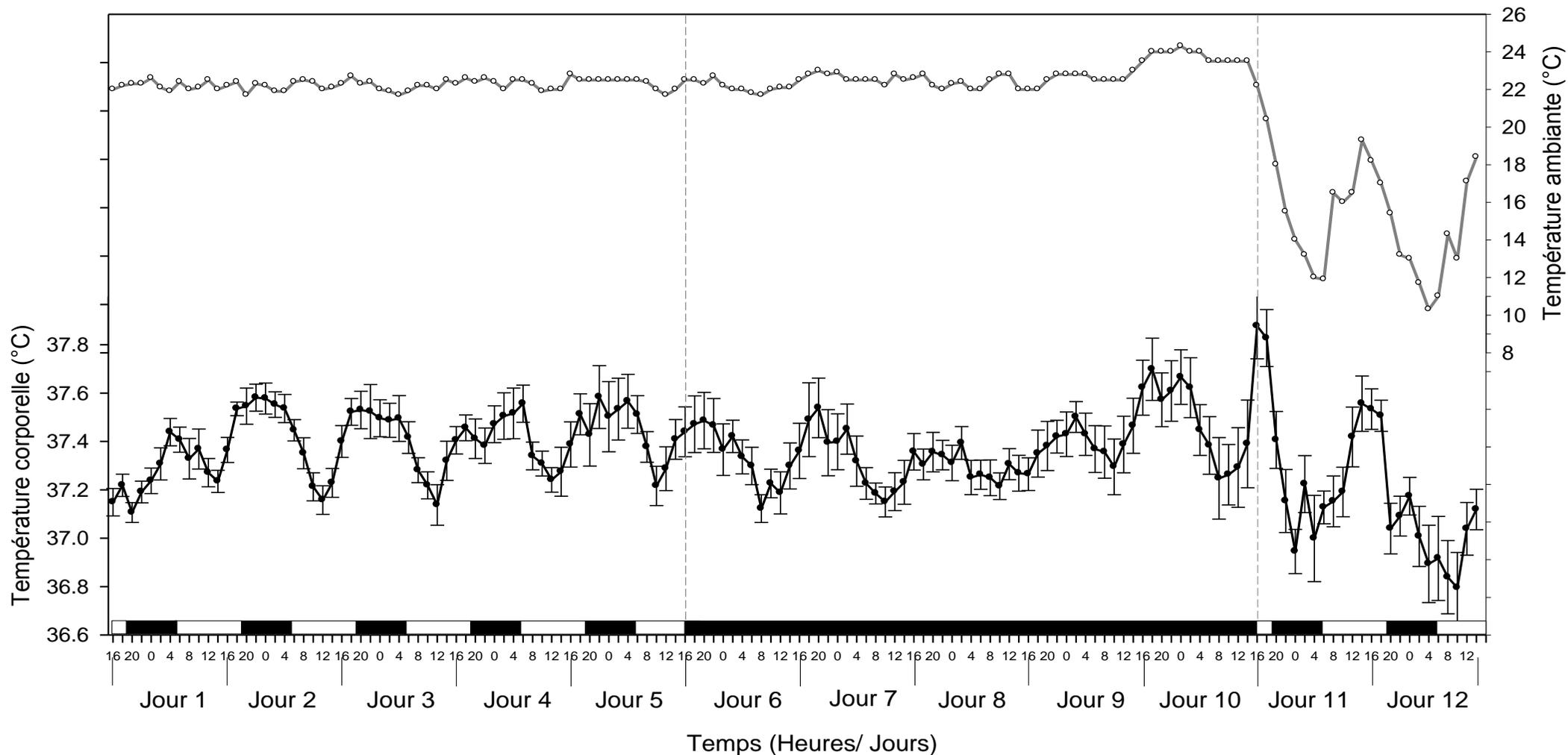


Figure 76 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des huit chamelles du groupe 2, sous les différentes conditions expérimentales des 3 phases de l'expérience 2 : phase I : à l'étable, sous une photopériode naturelle de saison et une température ambiante fixe, phase II : conditions constantes, phase III : remise des animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles de l'environnement. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des huit chamelles \pm SEM. La température rectale a été relevée par un thermomètre digital à un intervalle de 2h pendant 12 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée avec le même intervalle et est représentée par la courbe supérieure. Les rectangles noirs et blancs en bas de la figure, correspondent respectivement à la succession de la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité et le rectangle noir et long correspond à l'obscurité permanente de la phase II. Les traits discontinus, montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre chaque deux phases. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.

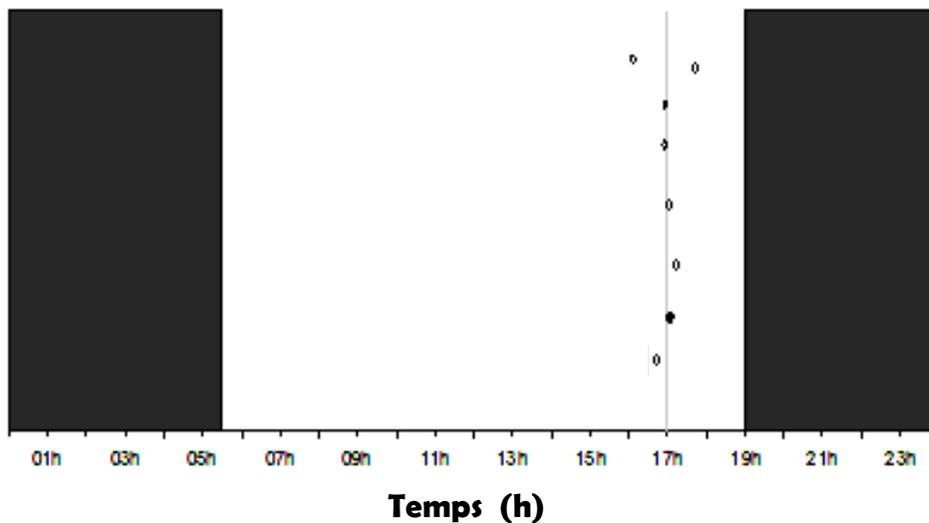


Figure 77 : Représentation des de points de références de la phase ascendante chez les huit chamelles du groupe 2 durant la phase I de l'expérience 2. Le point de référence correspond au moment où la courbe croise la valeur de la moyenne durant sa montée journalière. Chaque point sur la courbe représente le point de référence d'une des huit chamelles. Les rectangles noirs et blancs correspondent respectivement à la succession de la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité naturel.

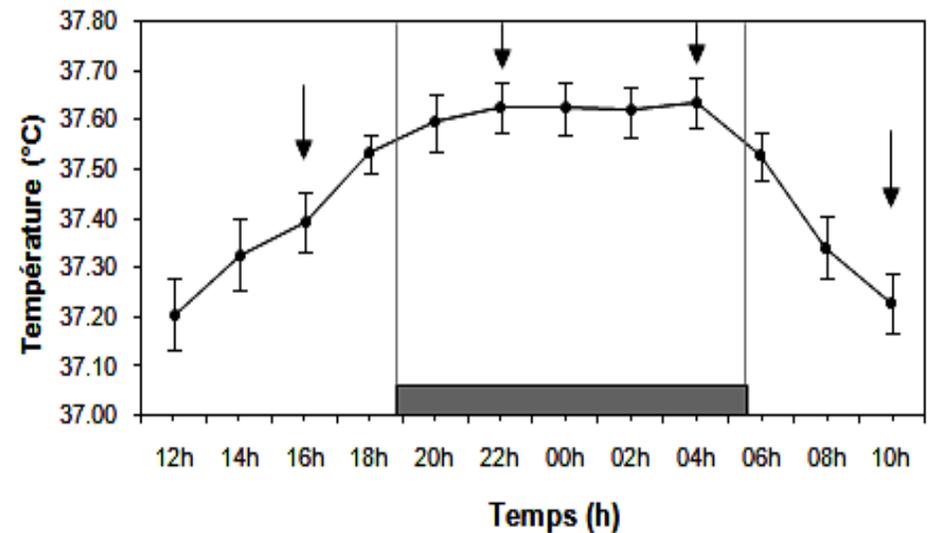


Figure 78 : Courbe moyenne de 24 heures de la température corporelle des huit chamelles du groupe 2, calculée pour la phase I de l'expérience 2. Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures enregistrées à un moment (t) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des huit chamelles pour ce point t. La courbe moyenne est représentée par les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Le rectangle gris correspond à la phase obscure du cycle lumière-obscurité naturel. Les flèches correspondent au moment de la distribution alimentaire.

III. Démonstration de l'entraînement par le cycle lumière-obscurité

1. Suivi du rythme de la température corporelle avec un thermomètre digital : Expérience 3

1.1. Animaux

Les variations de la température rectale ont été suivies chez les 8 chamelles de la station d'Insémination Artificielle de Ain Jamâa (groupe2). Les relevés de la température ont été réalisés en utilisant le même type de thermomètre digital décrit auparavant.

1.2. Protocole expérimental

Le procédé du relevé de la température rectale était le même que celui décrit ci-dessus tout en respectant les mêmes conditions expérimentales à savoir :

- les animaux avaient un accès libre à l'eau à l'aide d'abreuvoirs automatiques,
- la distribution alimentaire en un cycle de 4 rations/24 heures,
- l'activité locomotrice des animaux était restreinte en attachant le licol aux mangeoires.

Cette expérience a été réalisée en deux phases :

Phase I, LD + TC : les chamelles ont été placées en photopériode artificielle (LD 12:12, obscurité : de 17h00 à 05h00) et à une température ambiante contrôlée et fixe de $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cette phase a duré 4 jours.

Phase II, avance LD + TC : en restant sous une photopériode artificielle, une avance de phase de 6 heures a été appliquée sur la période obscure (LD 12:12, obscurité : de 11h00 à 23h00). La température ambiante était contrôlée et fixée à $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Cette phase a duré 7 jours.

1.3. Résultats

L'application pendant la phase I, d'une photopériode artificielle correspondant à la photopériode naturelle et d'une température ambiante constante a permis de confirmer encore une fois l'existence d'un rythme de la température rectale avec une acrophase pendant la nuit : $22\text{h}36 \pm 40\text{min}$. la moyenne du rythme pendant cette phase est de $37,36 \pm 0,25^{\circ}\text{C}$ et l'amplitude est de $0,23 \pm 0,07^{\circ}\text{C}$. L'avance de phase de 6 heures sur la période obscure du cycle LD durant la phase II, entraîne une avance

de phase de presque 5 heures de l'acrophase : $17h48min \pm 50min$. la moyenne du rythme durant cette phase est de $37,22 \pm 0,21^\circ C$ et l'amplitude est de $0,2 \pm 0,06^\circ C$. La figure 79 montre les courbes moyennes de 24h, calculées en réalisant pour chaque point (t) d'une journée (x), la moyenne des températures des huit chamelles à ce point t. Les résultats montrent que l'avance de phase de 6h, réalisée sur la phase obscure entraîne une avance de phase du rythme de la température rectale. Ainsi l'acrophase au septième jour de cette avance de phase survient aux alentours de 18h00 et correspond donc à 7 heures après le début d'obscurité (LD 12:12, obscurité : de 11h00 à 23h00). D'après la figure 79, le rythme de la température corporelle nécessite 5 à 6 jours avant de se synchroniser totalement avec le nouveau régime horaire du cycle lumière-obscurité.

Ces résultats démontrent que chez le Dromadaire, le cycle lumière-obscurité est un facteur d'entraînement du rythme circadien de la température rectale.

Figure 79 : Courbes moyennes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des huit chamelles du groupe 2 durant l'expérience 3 : phase I : photopériode artificielle (LD 12:12) et température ambiante fixe et phase II : mêmes conditions expérimentales mais avec une avance de phase de 6 heures, appliquée sur la période obscure. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t), la température des huit chamelles. Les flèches indiquent le moment du début de la phase obscure (rectangles noirs) du cycle lumière-obscurité.



2. Suivi du rythme de la température corporelle avec un capteur électronique : expérience 4

Afin de vérifier les résultats obtenus dans l'expérience 3, un protocole similaire a été adopté en utilisant le capteur électronique Ibutton.

2.1. Animaux

Cet essai a été réalisé sur les chamelles acquises pour les essais avec l'Ibutton et qui ont été placées à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat. Ces sept chamelles constituent le groupe 3. Elles étaient toutes pubères, âgées

de 7-10 ans, non gestantes, appartenant à la race du Nord (2 chammes de la variété Jebli) et à celle du Sud (5 chammes de variétés, Guerzni, Khouari et Marmouri). Les chammes avaient un accès libre à l'eau. Elles recevaient également une alimentation à base de foin de luzerne, de paille, d'orge, de maïs et de tourteaux de luzerne. Afin d'éviter l'entraînement du rythme de la température corporelle par la distribution alimentaire, un cycle d'alimentation de quatre rations espacées de 6h a été adopté sauf pour la paille qui était distribuée ad libitum. Elles ont pu bénéficier d'un contrôle médical strict. Ainsi elles ont été déparasitées très régulièrement avec de l'Ivermectine et vaccinées contre le Poxvirus, traitées pour les parasitoses externes avec le Phoxim (*Sebacil*®, Bayer) et recevaient mensuellement un complément d'acides aminés et de vitamines par voie orale (*Promotor*®, Lamavet Maroc).

2.2. *Protocole expérimental*

Le protocole expérimental s'est déroulé en plusieurs phases :

Phase I, d'adaptation : les chammes ont été placées pendant 10 jours dans l'étable pour s'adapter à ce nouvel environnement. La photopériode était naturelle (LD 14:10 du mois de juillet, lever de soleil : 05h33, coucher de soleil : 19h33).

Phase II, LD+TC : un cycle de photopériode artificielle a été mis en place (LD 12:12) avec un passage lumière-obscurité à 18h00. La température ambiante a été fixée et gardée constante à $21,9 \pm 0,4^\circ\text{C}$. La durée de cette phase a été de 14 jours.

Phase III, avance LD+TC : en ayant gardé la même photopériode artificielle LD 12:12, une avance de phase de 6 heures a été réalisée sur la phase obscure (passage lumière-obscurité à 12h00). La température ambiante a été gardée constante, à $22,1 \pm 0,6^\circ\text{C}$. Cette phase a duré 21 jours.

Phase IV, environnement naturel : les animaux ont été remis à l'extérieur, sous les conditions naturelles de photopériode et de température ambiante. Cette phase a duré 8 jours.

2.3. *Résultats*

L'évolution du rythme de la température corporelle enregistré par le capteur Ibutton, suivant les quatre phases expérimentales du protocole est représentée sous forme d'un exemple représentatif d'une chamelle (Figure 80) et sous forme de la moyenne des 7 chammes (Figure 81). Il faut signaler à ce niveau la qualité parfaite des enregistrements utilisant la technologie Ibutton. D'après les deux figures, un rythme circadien de la température corporelle existe en présence d'une photopériode naturelle ou artificielle et en présence ou en absence d'un cycle de la température ambiante.

Dans les phases II et III, l'existence de ce rythme en absence du cycle de la température ambiante, démontre une fois encore que ce rythme n'est pas généré par les variations de la température. Toutefois, d'après les figures 80 et 81 l'amplitude du rythme est plus importante durant la phase IV. Ceci est relié directement aux écarts élevés de la température ambiante. Cette amplitude était de $0,71 \pm 0,24^\circ\text{C}$ pendant la phase I, de $0,63 \pm 0,08^\circ\text{C}$ pendant la phase II, de $0,73 \pm 0,08^\circ\text{C}$ pendant la phase III et a passé à $3,55 \pm 0,28^\circ\text{C}$ sous environnement naturel de la phase IV. Il s'agit d'une démonstration supplémentaire de l'effet de la température ambiante sur l'amplitude du rythme de la température corporelle chez cette espèce.

Les températures élevées de l'environnement extérieur de la phase IV, engendre également une élévation de la moyenne du rythme. Celle-ci était de $37,78 \pm 0,28^\circ\text{C}$ pendant la phase I, de $37,59 \pm 0,24^\circ\text{C}$ pendant la phase II, de $37,86 \pm 0,25^\circ\text{C}$ pendant la phase III et a passé à $38,86 \pm 0,13^\circ\text{C}$, pendant la phase IV.

La forme générale de la courbe de la température corporelle (Figures 80 et 81) montre en plus des variations circadiennes, des composantes de rythme avec des pics ultatradiens.

Les courbes de 24 h, calculées pendant les cinq derniers jours de chaque phase, en moyennant pour chaque animal et ensuite pour l'ensemble des animaux les températures enregistrées à un point (t), sont montrées dans la figure 82 (exemple chez une chamelle) et la figure 83 (moyenne des 7 chamelles). Durant la phase II, le pic du rythme sous une photopériode artificielle (LD 12:12) et une température ambiante fixe, se situe juste avant (2heures) la transition lumière-obscurité. L'application pendant la phase II, d'une avance de phase de 6h sur le début de la phase obscure, engendre un déplacement et un avancement du pic qui apparait avant la transition lumière-obscurité du nouveau régime photopériodique. Cette avance de phase est estimée selon la courbe moyenne de la figure 83 à 4 heures. La figure 84 montre les courbes moyennes de 24h de chaque phase avec la meilleure courbe du Cosinor qui superpose chacune d'elles. Les résultats de ces régressions montrent que l'acrophase (Figure 84 et 85) est avancée uniquement d'1heure. Celle-ci survient durant la phase II à $14\text{h}43 \pm 50\text{min}$; alors qu'elle survient durant la phase III à $13\text{h}43 \pm 58\text{min}$. Ces différences dans l'importance de l'avancement de l'acrophase du rythme entre l'estimation directe à partir de la courbe et la méthode du Cosinor, sont attribuées à la limite de la fonction Cosinor quand la forme du rythme n'est pas sinusoïde : par exemple cubique. Dans notre cas, les courbes de régressions du Cosinor ne prennent pas en considération le pic le plus apparent comme étant un pic pointu, mais prennent toute la partie de la courbe montrant des valeurs élevées, comme étant le pic d'une forme sinusale.

L'avance de phase de 6h du cycle lumière-obscurité entraîne une avance du rythme de la température corporelle. Selon la figure 82A et 83A, le rythme nécessite 10 jours pour se synchroniser à la nouvelle phase du cycle lumière-obscurité.

Le point de référence de la phase ascendante correspond au moment où la courbe de 24h croise la moyenne totale du rythme durant sa montée. Il s'agit d'un autre paramètre qui marque la phase du rythme. La figure 86 montre le point de référence moyen de la phase ascendante, calculé pour chaque phase expérimentale. Comme pour l'acrophase, l'avance de 6heures appliquée sur le cycle lumière-obscurité engendre une avance d'1 heure et demie de ce point de référence. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que comme le calcul a été effectué sur les 5 derniers jours de chaque phase expérimentale et après synchronisation totale du rythme, l'erreur standard moyenne est ainsi très faible comme le montre la figure 86.

Le calcul de la période par les périodogrammes montre que durant les quatre phases expérimentales la période est de 24.0h. L'ensemble de ces résultats démontre que le cycle lumière-obscurité est capable d'entraîner le rythme de la température corporelle chez le Dromadaire en entraînant l'horloge à une période de 24.00h.

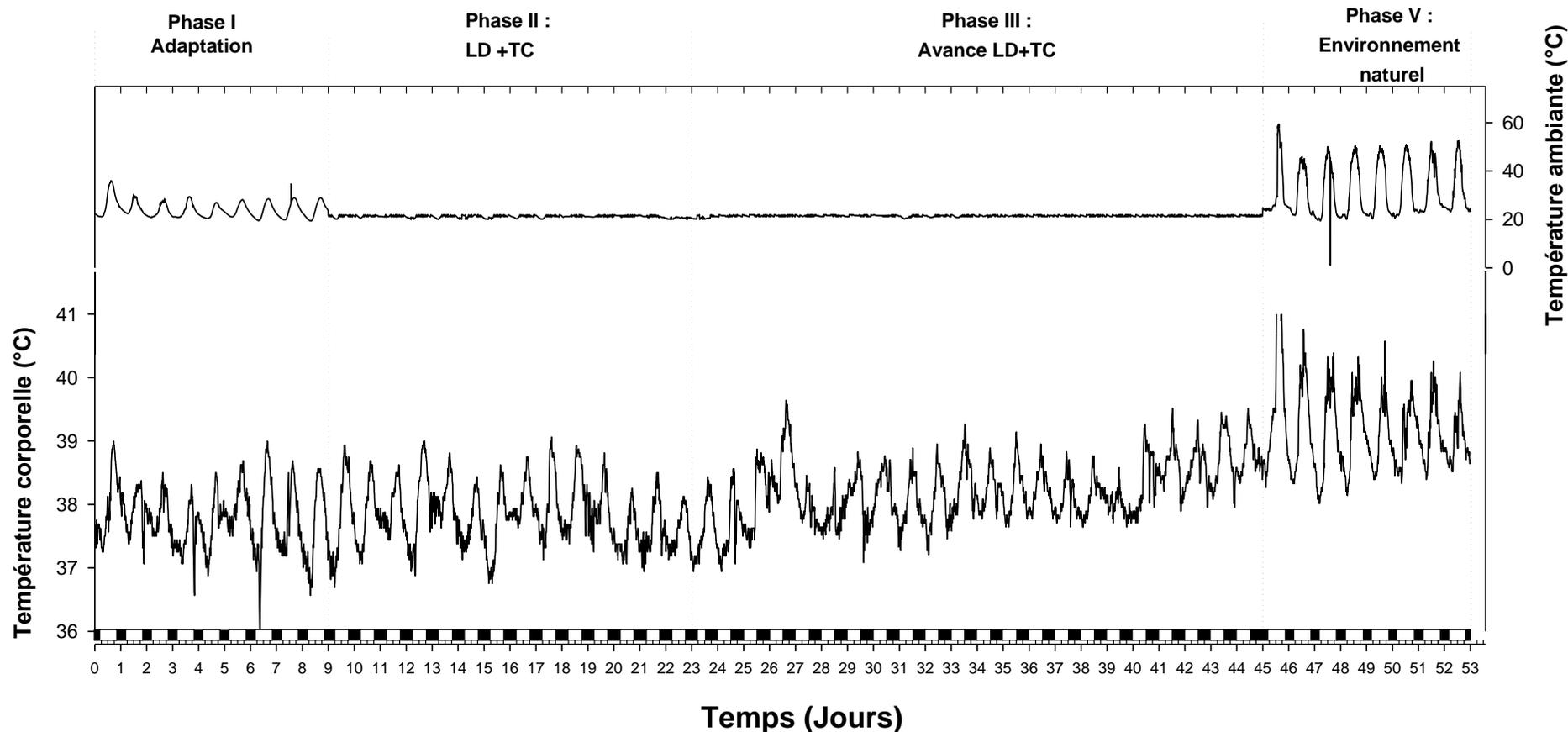


Figure 80 : Evolution de la température corporelle chez une chamelle représentative, sous les conditions de l'expérience 4 : phase I : adaptation des chamelles à l'étable, phase II : cycle artificielle lumière-obscurité et température constante, phase III : avance de phase de 6 heures sur le cycle lumière-obscurité et température constante, phase IV : animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton et pendant 53 jours consécutives. La température ambiante a été relevée avec le même intervalle et est représentée par la courbe supérieure. Les rectangles noirs et blancs en bas de la figure, correspondent respectivement à la succession de la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre deux phases.

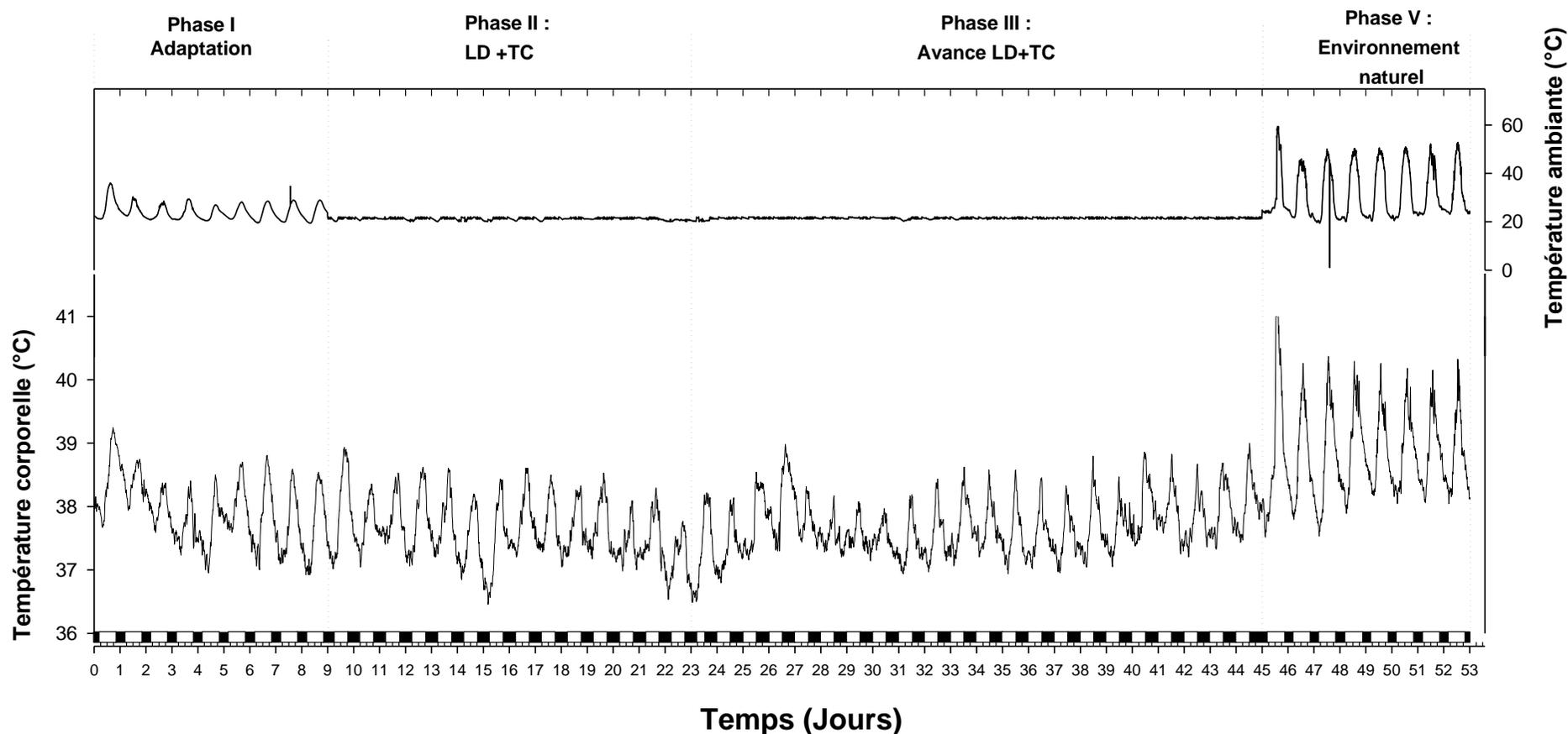


Figure 81 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chèvres du groupe 3 sous les conditions de l'expérience 4 : phase I : adaptation des chèvres à l'étable, phase II : cycle artificielle lumière-obscurité et température constante, phase III : avance de phase de 6 heures sur le cycle lumière-obscurité et température constante, phase IV : animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles. Chaque point correspond à la moyenne des sept chèvres. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton et pendant 53 jours consécutives. La température ambiante relevée avec le même intervalle est représentée par la courbe supérieure. Les rectangles noirs et blancs en bas de la figure, correspondent respectivement à la succession de la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre deux phases.

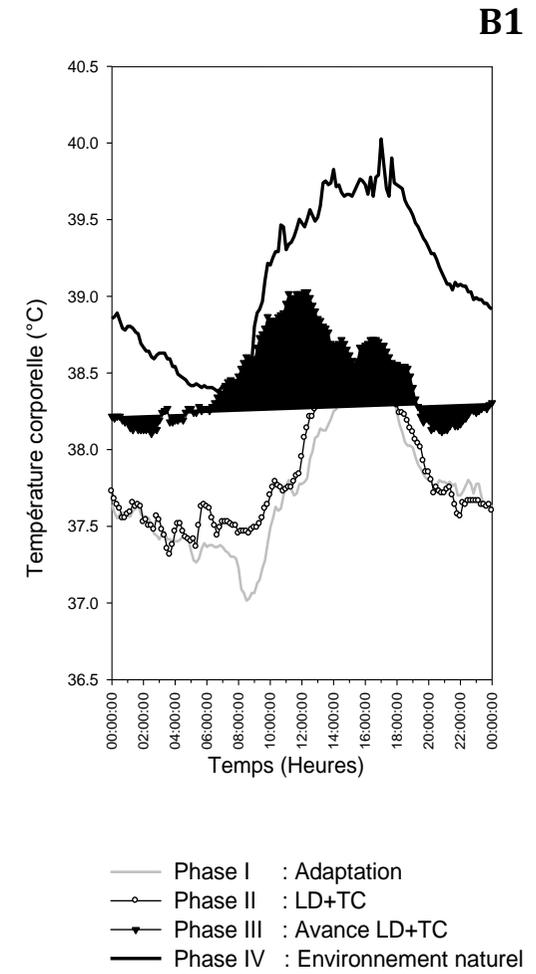
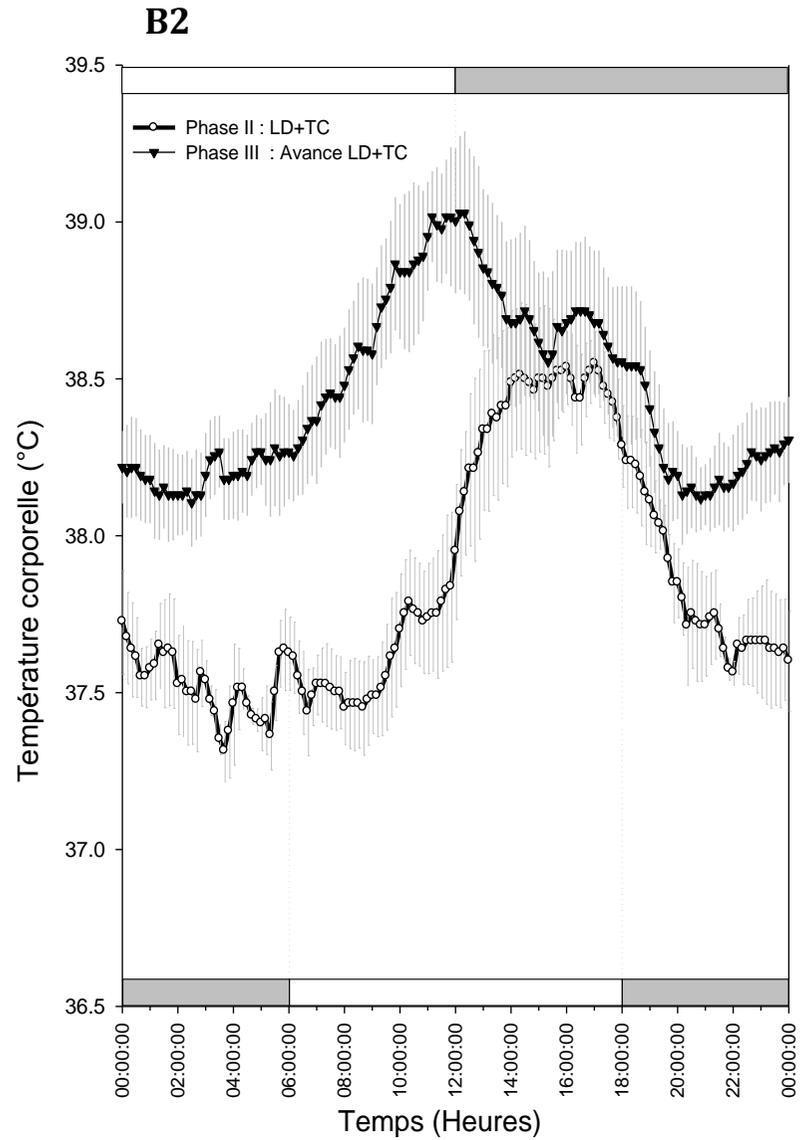
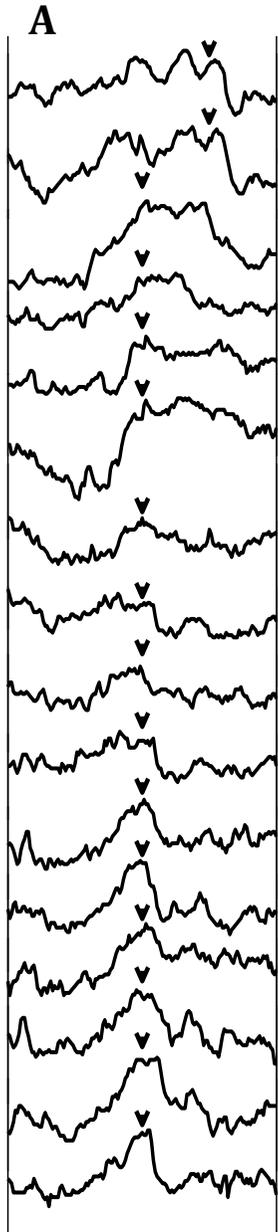


Figure 82 :

A : Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle représentant les 2 derniers jours de la phase II suivis des 14 premiers jours de la phase III de l'expérience 4. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèche indiquent le moment du début de la phase obscure du cycle lumière-obscurité qui a été adopté.

B1 : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle représentative, calculée en moyennant les 5 derniers jours de chacune des 4 phases expérimentales de l'expérience 4. Chaque point de la courbe représente la moyenne des températures des 5 jours enregistrées à un moment (t) de la journée chez cette chamelle.

B2 : Sélection à partir du graphique B1, de la courbe de 24 heures de la phase II et III représentant l'application d'une photopériode artificielle (LD 12:12) et ensuite l'avance de phase de 6 heures sur la période obscure. La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les rectangles blancs et gris correspondent respectivement à la phase lumineuse et obscure du cycle lumière-obscurité de chaque phase et les traits discontinus montrent les moments du début de la phase obscure.

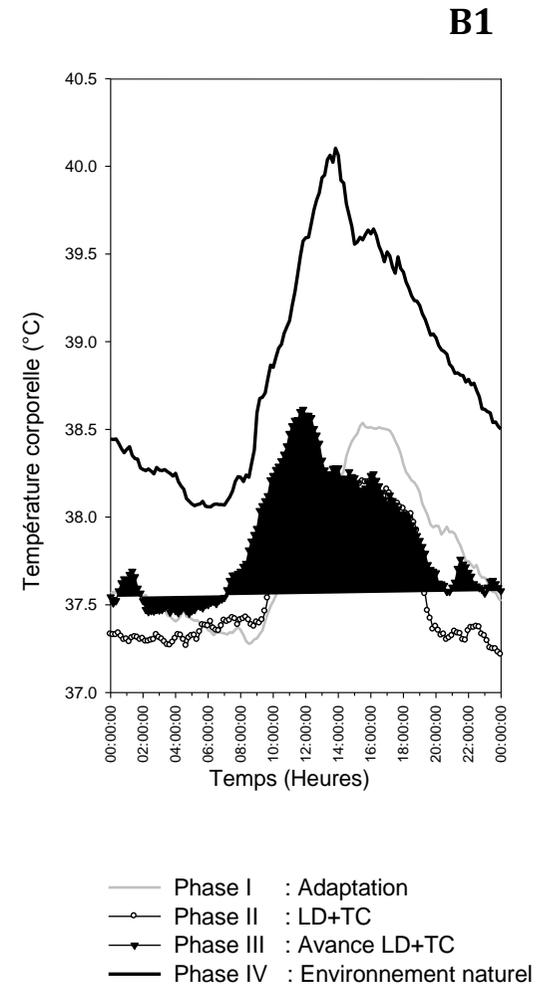
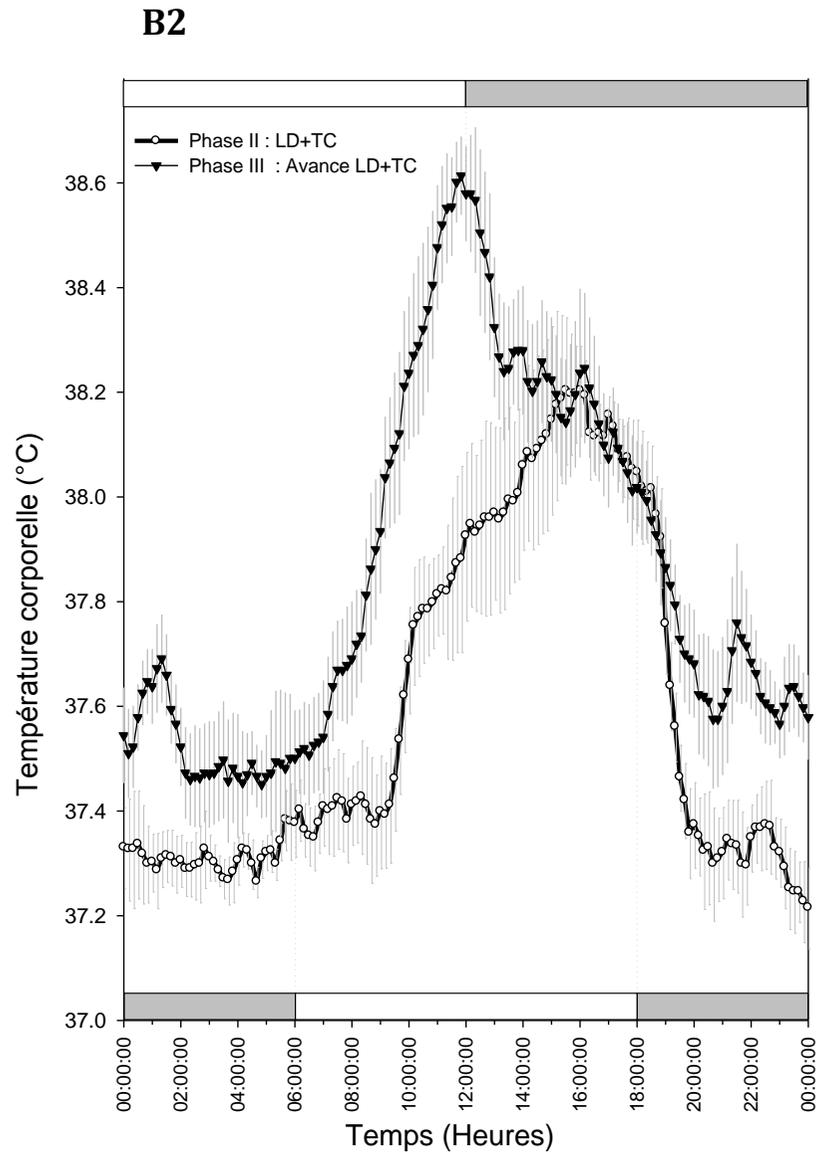
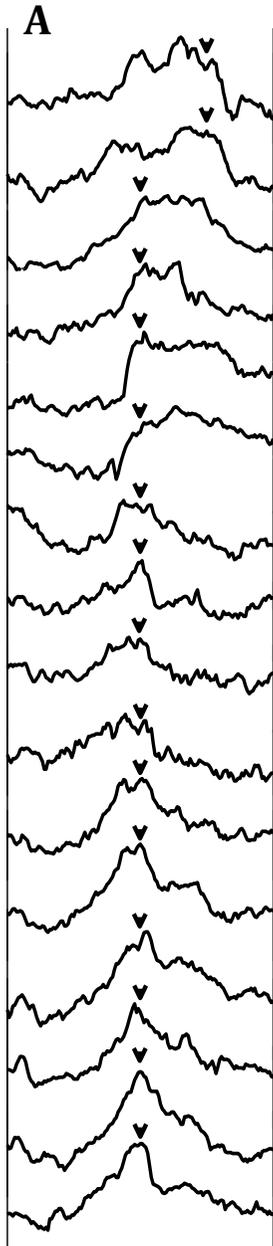
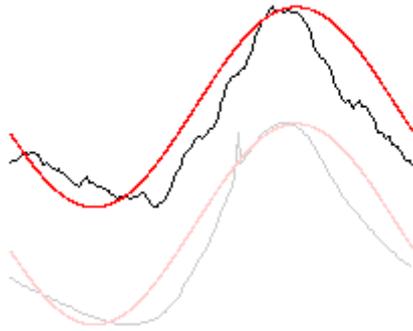


Figure 83 :

A : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chamelles durant les 2 derniers jours de la phase II suivis des 14 premiers jours de la phase III de l'expérience 4. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t) la température des 7 chamelles. Les flèches indiquent le moment du début de la phase obscure du cycle lumière obscurité qui a été adopté.

B1 : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle des 7 chamelles, calculée pour les 5 derniers jours de chacune des 4 phases expérimentales de l'expérience 4. Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures enregistrées à un moment (t) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chamelles pour ce point (t).

B2 : Sélection à partir du graphique B1, de la courbe de 24 heures de la phase II et III représentant l'application d'une photopériode artificielle (LD 12:12) et ensuite l'avance de phase de 6 heures sur la période obscure. La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les rectangles blancs et gris correspondent respectivement à la phase lumineuse et obscure du cycle lumière-obscurité de chaque phase et les traits discontinus montrent les moments du début de la phase obscure.



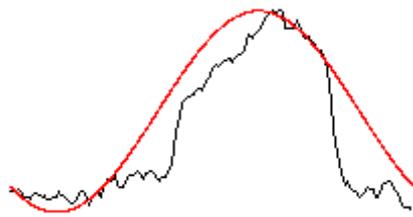
Phase I : Adaptation

Température corporelle :

Mean: 37.785 (95% CI: 37.508 to 38.063), Amplitude: 0.716 (95% CI: 0.47 to 0.961), Acrophase: 16.95 h (95% CI: 16.1 to 17.8), Goodness of fit: 0.042 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Température ambiante

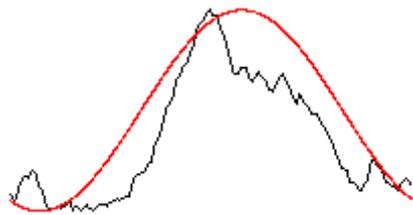
Mean: 23.646, Amplitude: 3.957, Acrophase: 16.95 h (95% CI: 16.38 to 17.52), Goodness of fit: 0.021 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



Phase II : LD + TC

Température corporelle :

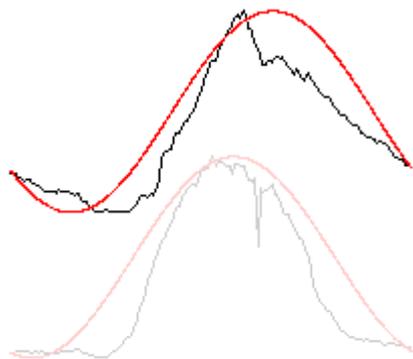
Mean: 37.599 (95% CI: 37.352 to 37.847)
Amplitude: 0.635 (95% CI: 0.551 to 0.718)
Acrophase: 14 h43 (95% CI: 13.87 to 15.56)
Goodness of fit: 0.047 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



Phase III : Avance LD + TC

Température corporelle

Mean: 37.864 (95% CI: 37.616 to 38.112)
Amplitude: 0.73 (95% CI: 0.659 to 0.8)
Acrophase: 13h43 (95% CI: 12.75 to 14.68)
Goodness of fit: 0.053 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



Phase IV : Environnement naturel

Mean: 38.862 (95% CI: 38.739 to 38.984)
Amplitude: 3.55 (95% CI: 0.873 to 4.437)
Acrophase: 15.58 h (95% CI: 14.79 to 16.38)
Goodness of fit: 0.035 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Mean: 31.582

Amplitude: 14.447

Acrophase: 13.25 h (95% CI: 12.59 to 13.91)

Goodness of fit: 0.03 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Figure 84 : Régression par la méthode du Cosinor, effectué sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 4. La régression représente la meilleure courbe (en rouge) qui superpose la courbe moyenne de 24h des données de la température corporelle(en noir). Quand un cycle de la température ambiante existe, sa courbe de 24h et sa courbe de régression sont également montrées, en filigrane. Pour chaque régression, les paramètres suivant sont données : la moyenne, l'amplitude, l'acrophase et le degré de signification de la régression.

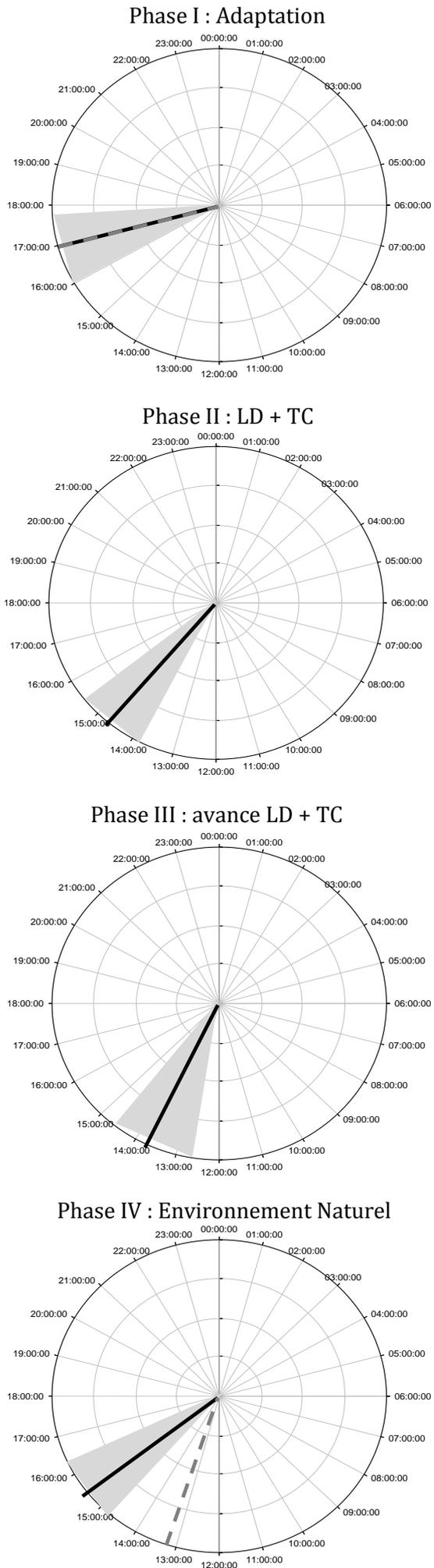


Figure 85 : Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées dans chaque phase de l'expérience 4. Les acrophases sont calculées par la méthode de Cosinor, représentées dans la figure précédente. Chaque cercle représente un horaire d'une journée en 24 heures. L'acrophase moyenne de la température corporelle est indiquée par une ligne noire limitée par un triangle gris qui représente l'intervalle de confiance à 95% de probabilité. Quand un cycle de la température ambiante existe, son acrophase est représentée par une ligne discontinue grise.

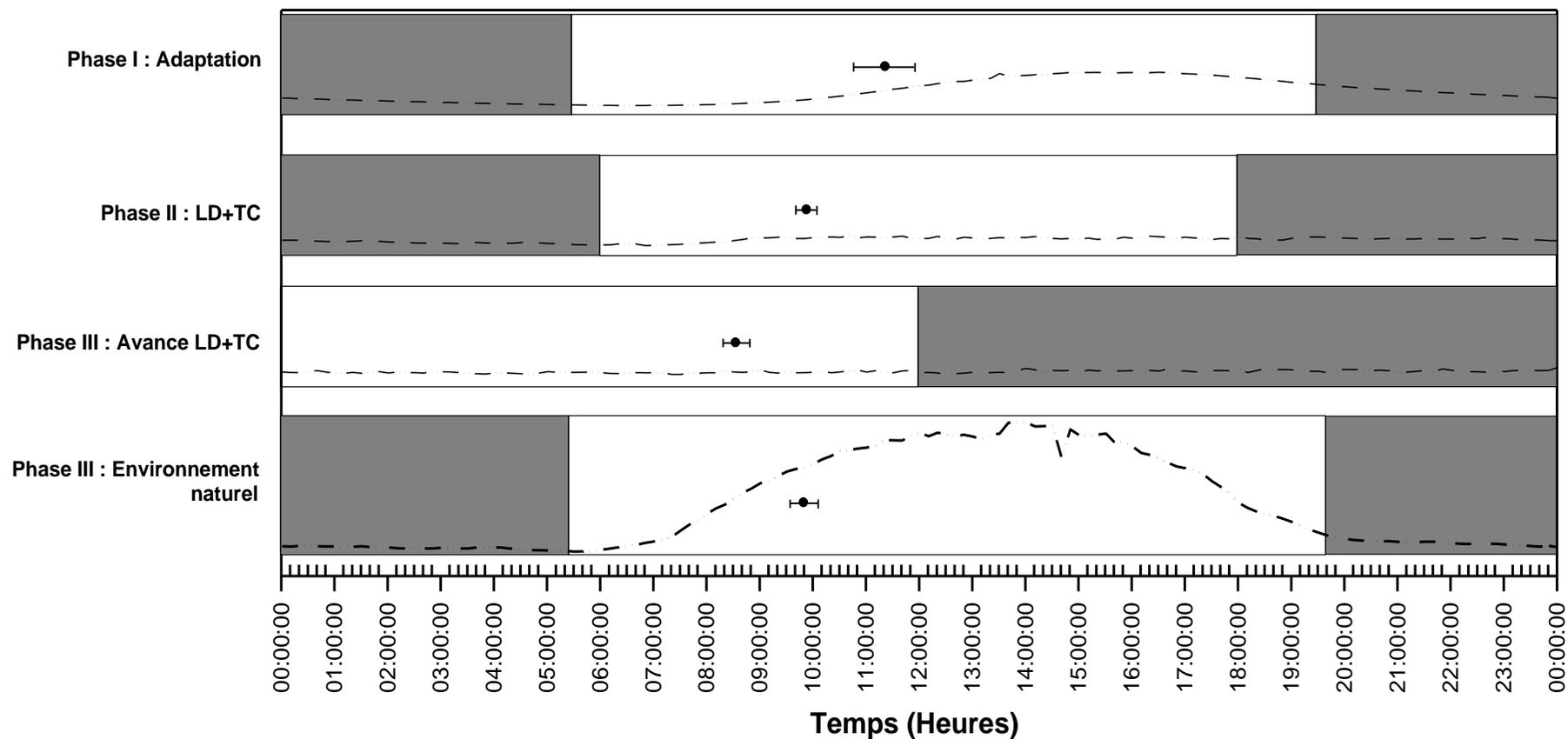


Figure 86 : Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 4. Le moment du point de référence correspond au moment où la courbe croise durant sa montée journalière, la valeur de la moyenne du rythme. Il est indiqué par un cercle avec la barre d'erreur (SEM). Les rectangles gris et blancs correspondent respectivement à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité de chaque phase expérimentale. La courbe moyenne de 24h du cycle de la température ambiante est représentée pour chaque phase par une ligne discontinue.

IV. Démonstration de l'entraînement du rythme par le cycle de la température ambiante

Après avoir démontré l'existence d'une horloge endogène et l'entraînement du rythme circadien de la température corporelle par le cycle lumière-obscurité, l'objectif était de vérifier si les variations journalières de la température ambiante pouvaient également être un facteur d'entraînement. Rappelons que cette hypothèse repose sur les résultats obtenus dans l'expérience 2 qui démontrent que la température ambiante affecte l'amplitude et la phase du rythme étudié. En effet, la remise des animaux à l'extérieur sous une température ambiante naturelle et sans changer la photopériode, provoque un déplacement de l'acrophase. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons adopté un protocole expérimental basé sur la suppression du cycle jour-nuit et l'adoption d'un cycle artificiel de la température ambiante qui à un moment donné est inversé. Au début des expériences nous avons eu recours à la prise de la température rectale chaque 2 heures, avec un thermomètre digital et par la suite, nous avons repris les expérimentations avec le capteur électronique Ibutton pour un enregistrement chaque 10 minutes.

1. Suivi du rythme de la température corporelle avec un thermomètre digital : Expérience 5

1.1. Animaux

Cet essai s'est déroulé en utilisant le groupe 2, constitué des huit chamelles de la station d'Insémination Artificielle de Ain Jamâa.

1.2. Protocole expérimental

La température rectale a été relevée avec un thermomètre digital suivant la procédure décrite dans les paragraphes précédents. Les conditions expérimentales suivantes ont été respectées :

- les animaux avaient un accès libre à l'eau (abreuvoir automatique),
- un cycle de 4 rations de nourriture/24,
- l'activité locomotrice des animaux était restreinte.

Afin d'éviter tout entraînement possible par le cycle lumière-obscurité, l'expérience s'est déroulée en deux phases durant lesquelles les 8 chamelles étaient placées sous un régime de lumière constante (LL) :

Phase I : les animaux ont été maintenus pendant 5 jours sous une photopériode artificielle LL et un cycle artificiel de température ambiante, mimant les variations extérieures et naturelles, avec un pic de chaleur à la deuxième moitié de la journée.

Phase II : en gardant les animaux en LL, le cycle artificiel de la température ambiante a été inversé pour avoir le pic de chaleur ambiante vers la deuxième moitié de la nuit astronomique. Cette phase a duré 6 jours.

1.3. *Résultats*

Un rythme journalier de la température corporelle régulier existe sous toutes les conditions expérimentales de la phase I et II. L'application de conditions lumineuses constantes (LL) n'abolit pas le rythme. Ceci est en accord avec les résultats précédents démontrant que ce rythme journalier de température corporelle n'est pas généré par le cycle LD. Il est de nature endogène.

Durant la phase I, le rythme de la température corporelle montre une moyenne de $37,03 \pm 0,31^\circ\text{C}$ et une amplitude de $0,30 \pm 0,12^\circ\text{C}$. Ces valeurs sont presque conservées durant la phase II, avec respectivement $36,65 \pm 0,36^\circ\text{C}$ pour la moyenne et $0,35 \pm 0,13^\circ\text{C}$ pour l'amplitude. Dans la phase I (LL et cycle artificiel de la température ambiante avec un pic de chaleur l'après midi), le rythme de la température rectale montre une acrophase moyenne à $19\text{h}48 \pm 57\text{min}$. L'inversion du cycle de la température ambiante induit un décalage de la phase du rythme, avec au sixième jour une acrophase observée à $0\text{h}24 \pm 32\text{min}$. La Figure 87 montre les courbes de 24 heures, représentant la moyenne de la température corporelle des 8 chamelles durant la phase I et la phase II et montre le décalage. Un retard de phase d'environ $4\text{h}30\text{min}$ est observé. En effet, la figure 87 montre que si le rythme répond rapidement à l'inversion du cycle de la température ambiante (le jour même où l'inversion est opérée) cette resynchronisation se fait progressivement les jours suivants. Il est donc probable que la synchronisation du rythme demande dans ces conditions expérimentales plus de 6 jours.

En conclusion, les résultats de cette expérience démontrent que chez le Dromadaire, le cycle de la température ambiante affecte la phase et entraîne le rythme de la température rectale, sans pouvoir dire s'il s'agit uniquement d'une réponse passive sous forme d'un transfert de chaleur avec l'environnement ou d'un véritable entraînement de l'horloge circadienne.

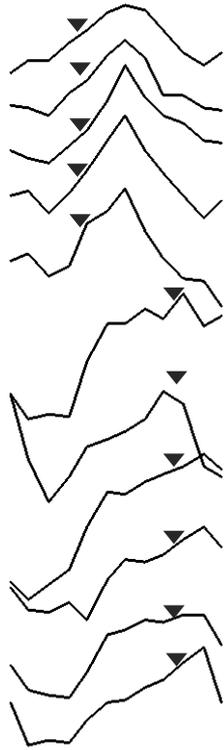


Figure 87 : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 8 chamelles (groupe 2) pendant chacune des deux phases de l'expérience 5. Phase I : LL et cycle artificiel de la température ambiante avec un pic à la deuxième moitié du jour (durée 5 jours) et phase II : LL et inversion du cycle artificiel de la température ambiante avec un pic à la deuxième moitié de la nuit (durée 6 jours). Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t) d'une journée (x), la température des 8 chamelles. Les flèches indiquent le pic de la chaleur du cycle de la température ambiante.

2. Suivi du rythme de la température corporelle avec un capteur électronique

La température corporelle a été suivie en utilisant le capteur électronique Ibutton chez les sept chamelles du groupe 3.

Pour vérifier que les variations journalières de la température ambiante sont capables d'entraîner le rythme circadien de la température corporelle, nous avons repris nos protocoles en utilisant des conditions d'éclairage constantes (LL puis sous une obscurité constante DD) :

2.1. *Entraînement par le cycle de température ambiante en lumière constante LL : Expérience 6*

2.1.1 *Protocole expérimental*

Les chamelles ont été placées à l'étable pour une adaptation de 5 jours, (photopériode naturelle, LD 10h45 : 13h15 ; température ambiante non contrôlée avec une variation de 5°C en moyenne entre le jour et la nuit).

Après cette phase d'adaptation, l'expérimentation s'est déroulée en cinq phases

Phase I, LLTC : les animaux ont été exposés à un régime de lumière constante LL et de température ambiante constante de $22,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$ pendant une durée de 10 jours.

Phase II, LLTNI1 : les animaux ont été maintenus sous le même régime de lumière constante (LL), mais un cycle artificiel de la température ambiante, parallèle au profil des variations extérieures et naturelles, a été créé avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour (subjectif). Cette phase a duré 29 jours.

Phase III, LLTI : en conservant les mêmes conditions lumineuses (LL), le cycle artificiel de la température ambiante a été inversé de façon à avoir le pic de chaleur vers la 2^{ème} moitié de la nuit subjective (avance de phase de 12h). Cette phase a duré 20 jours.

Phase IV, LLTNI2 : retour aux conditions de la phase III, LL et cycle artificiel de température ambiante parallèle à celui de l'environnement extérieur (Pic de chaleur en 2^{ème} moitié du jour). Cette phase a duré 13 jours.

Phase V, Environnement naturel : remise des chamelles à l'extérieur sous les conditions naturelles. Cette phase a duré 10 jours.

2.1.2. Résultats

L'évolution du rythme de la température corporelle en fonction du temps, durant les 5 phases expérimentales chez une chamelle représentative, est montrée dans la figure 88. L'évolution moyennée chez les sept chamelles est présentée dans la figure 89. Un rythme journalier de la température corporelle persiste sous les conditions constantes de la phase I (Lumière et température). Ce rythme est d'une période circadienne de 23,8h. Il s'agit là d'une autre démonstration de l'origine endogène et de la nature circadienne du rythme de la température corporelle chez le Dromadaire. Dans la phase II, l'application d'un cycle artificiel de la température ambiante d'une période de 24,1h et avec un maximum de chaleur durant la deuxième moitié du jour, permet d'obtenir un rythme de la température corporelle d'une période précise de 24,0h. Dans la phase III, le cycle journalier de la température ambiante est inversé sa période étant de 24,0h, on retrouve cette période de 24.h avec le rythme de la température corporelle. Enfin, dans la phase IV, retour à un cycle de la température mimant la température ambiante, le rythme s'adapte mais conserve la période du synchroniseur externe (24h).

La moyenne et l'amplitude du rythme varient peu durant les étapes où les animaux sont à l'étable sous LL et sous une température artificielle, fixe ou variable (phase I, II, III et IV.) La moyenne est de $36,45 \pm 0,24$, $36,63 \pm 0,13$, $36,46 \pm 0,09$ et $36,66 \pm 0,16^\circ\text{C}$, respectivement pour les phases. La moyenne devient plus faible quand les chamelles sont à l'extérieur et soumises aux conditions naturelles de l'environnement avec des températures d'hiver (Phase V, moyenne $35,86 \pm 0,08^\circ\text{C}$) Comme il est possible de voir sur les figures 88 et 89, la remise des animaux à l'extérieur

(plus grandes variations naturelles du cycle de la température ambiante) induit une forme plus régulière du rythme circadien de la température corporelle conséquence de l'augmentation de l'amplitude du rythme. Encore une fois, il apparaît que l'amplitude du cycle de la température ambiante (artificiel ou naturel) affecte directement l'amplitude du rythme de la température corporelle. Durant la phase II, l'amplitude du rythme est de $0,20 \pm 0,04^\circ\text{C}$ pour des écarts de température ambiante de $1,60^\circ\text{C}$. Durant la phase III, l'amplitude est de $0,34 \pm 0,07^\circ\text{C}$ pour un écart de température ambiante, de $4,45^\circ\text{C}$, de $0,51 \pm 0,09^\circ\text{C}$ pour un écart de $4,28^\circ\text{C}$ (phase IV) et enfin avec $1,45 \pm 0,21^\circ\text{C}$ pour un écart de $9,07^\circ\text{C}$. Dans la phase V (températures naturelles de l'extérieur). Précédemment nous avons rapporté que le rythme journalier de la température corporelle chez le Dromadaire, montrait aussi des variations avec des pics ultradiens et infradiennes. Ces variations ultradiennes et infradiennes s'atténuent en présence d'un cycle de la température ambiante important (phase IV).

Les figures 90 et 91 montrent les courbes de 24h du rythme journalier de la température corporelle dans chaque phase expérimentale, d'abord chez une chamelle représentative ensuite pour l'ensemble des 7 chamelles. Les courbes montrent que l'application d'un cycle artificielle de la température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour, induit une acrophase du rythme de la température corporelle durant la même période. L'inversion de ce cycle de température ambiante (phase III), avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit subjective, provoque une inversion du rythme de la température corporelle. Pareillement, le retour au cycle de température ambiante initial, ré-entraîne le rythme de température corporelle à sa phase initiale. En réalisant les régressions de la fonction Cosinor sur le rythme moyen (figure 92) nous avons calculé le temps de l'acrophase moyenne (intervalle de confiance à 95% de probabilité). Nous constatons, que le premier cycle de la température ambiante de la phase I, engendre une acrophase à 16h28. L'inversion du cycle dans la phase II, induit une avance de phase de l'acrophase qui survient à 09h19. Enfin, le retour à un nouveau cycle de température ambiante avec un pic de chaleur vers la fin du jour subjectif (vers 16h28h) entraîne un retour de l'acrophase du rythme à son horaire initial (à 17h45). Malgré les différences qui peuvent apparaître entre les moments d'acrophases estimés directement sur les courbes et ceux calculés mathématiquement par la régression de la fonction Cosinor, le résultat concernant l'avance de phase du rythme suite à l'inversion du cycle de la température ambiante, reste le même et donc bien démontré.

D'après la représentation schématique (Figure 93) des acrophases calculées par la régression du Cosinor, l'acrophase du rythme de la température corporelle survient toujours avec un retard de phase par rapport à celui du cycle de la température

ambiante. Ce retard de phase est de 2 heures durant la phase II, d'1 heure durant la phase IV et de presque 30 min durant la phase V. Quand l'inversion du cycle de la température ambiante est opérée (phase III), le retard de phase est beaucoup plus important : plus de 5 heures. Toutefois, ce retard de phase de la température corporelle reste proportionnellement moins important en regard de l'inversion, presque totale, qui est exercée sur le cycle de la température ambiante.

La représentation du point de référence moyen de la phase ascendante calculé pour chaque phase expérimentale de l'essai, est représentée dans la Figure 94. Comme pour l'acrophase ce point de référence est déphasé par l'inversion du cycle de la température ambiante. Ce paramètre semble plus sensible au changement de la phase du cycle de la température ambiante. Ainsi, l'inversion de ce cycle entraîne une avance de 11 à 12 heures. Par ailleurs, comme nous l'avons souligné dans l'expérimentation précédente, l'erreur standard moyenne pour ce point de référence est très faible puisque le calcul a été effectué sur les 5 derniers jours de chaque phase et ceci après une synchronisation complète du rythme.

L'ensemble de ces résultats démontre que le cycle de la température ambiante est capable d'affecter non seulement l'amplitude du rythme de la température corporelle mais aussi sa phase et sa période. Il constitue un facteur d'entraînement du rythme. Toutefois comme nous l'avons souligné pour les résultats obtenus dans l'expérience 5, cet entraînement pourrait être passif et ne pas correspondre à un entraînement de l'horloge.

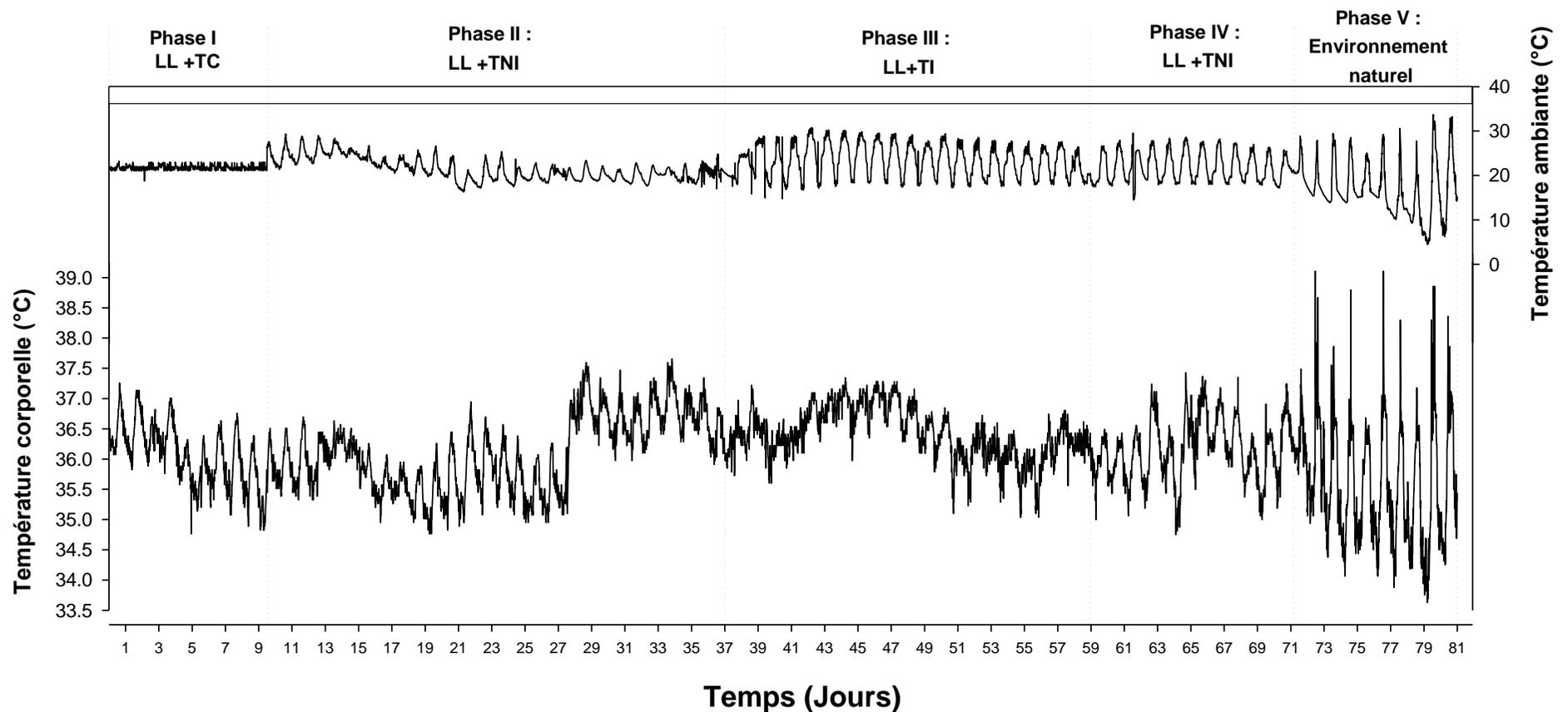


Figure 88 : Evolution de la température corporelle chez une chamelle représentative, dans les conditions de l'expérience 6 : phase I : lumière constante et température constante (LL + TC). Phase II : lumière constante et cycle de température avec un pic de chaleur, le jour (LL+TNI) ; phase III : lumière constante et cycle de température inversé, avec un pic de chaleur, la nuit (LL+TI) ; phase IV : lumière constante et retour au cycle normal de température ambiante avec un pic le jour (LL+TNI) ; phase V : animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton, pendant 81 jours consécutifs. La température ambiante sur la courbe supérieure a été relevée avec le même intervalle les ibuttons étant placés dans l'étable. Le rectangle blanc en haut de la figure, correspond à une photopériode en LL. Les traits discontinus montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre deux phases. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.

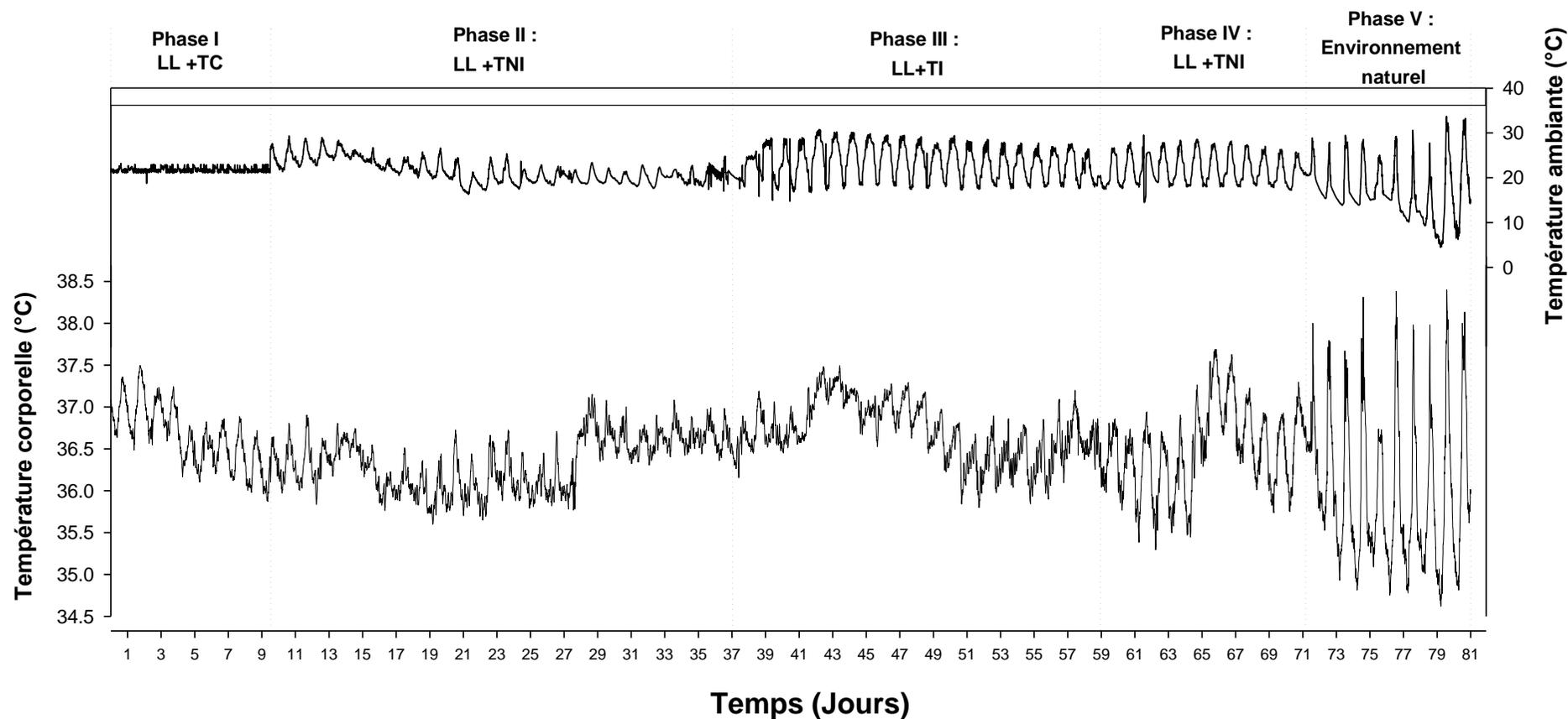
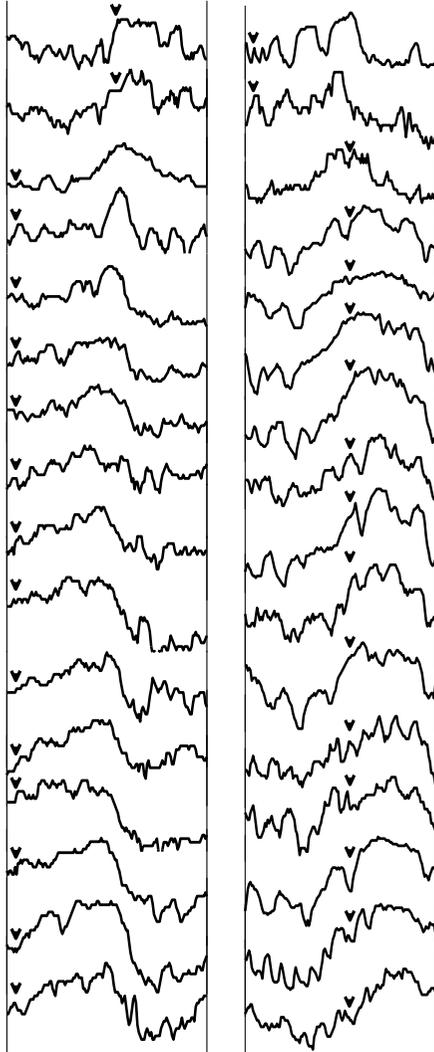


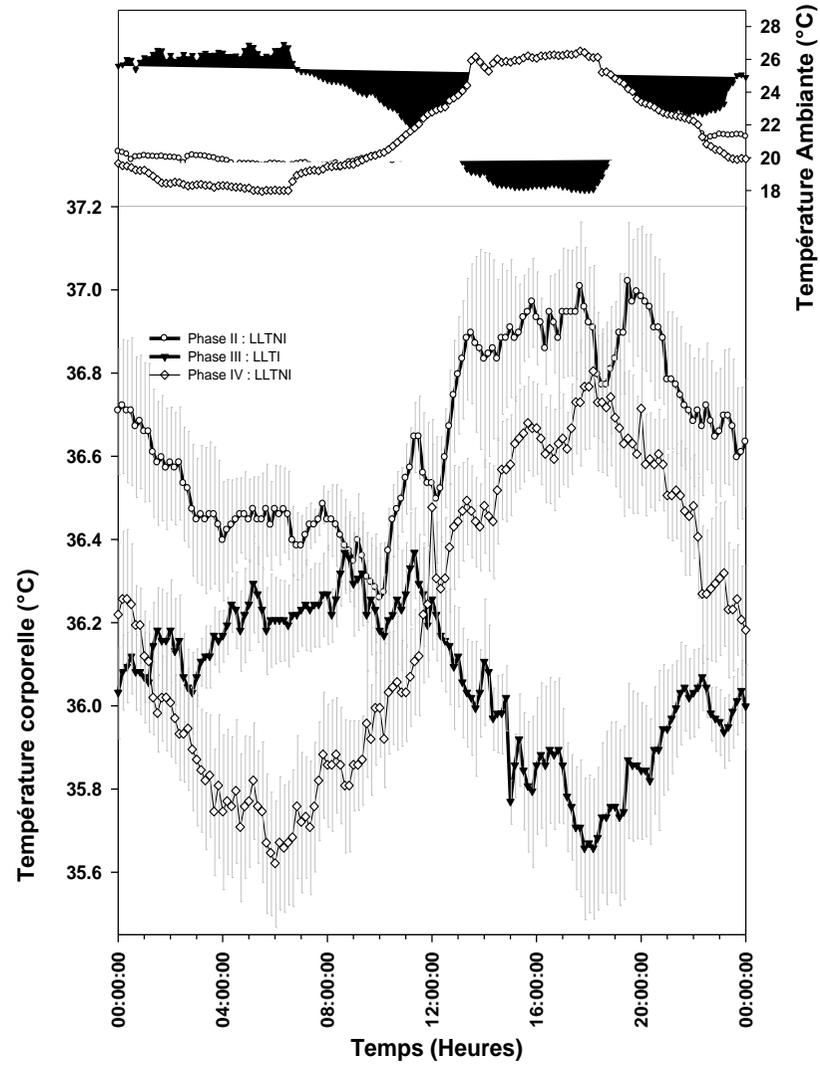
Figure 89 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chamelles du groupe 3, dans les conditions de l'expérience 6. Phase I : lumière constante et température constante (LL + TC) ; phase II : lumière constante et cycle de température avec un pic de chaleur, le jour (LL+TNI), phase III : lumière constante et cycle de température inversé, avec un pic de chaleur, la nuit (LL+TI) ; phase IV : lumière constante et retour au cycle normal de température avec un pic le jour (LL+TNI) ; phase V : animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles. Chaque point correspond à la moyenne des sept chamelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton pendant 81 jours consécutifs. Courbe supérieure : température ambiante relevée dans l'étable. Le rectangle blanc en haut de la figure, correspond à une photopériode en LL. Les traits discontinus montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre deux phases. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien. puisque la différence entre les deux est minimale : quelques minutes.

A1

A2



B2



B1

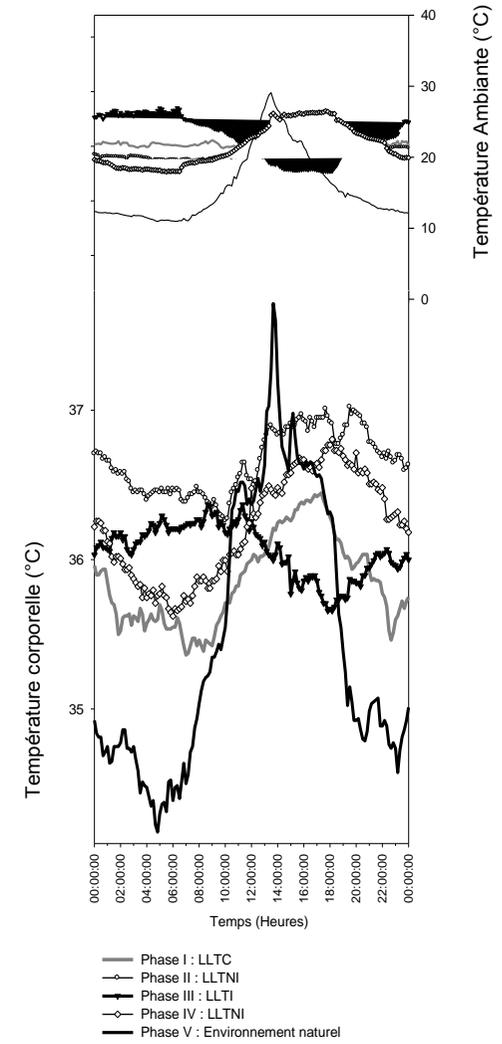


Figure 90 :

A1 : Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle les 2 derniers jours de la phase II suivis des 14 premiers jours de la phase III de l'expérience 6. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté.

A2 : Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle représentant les 2 derniers jours de la phase III suivis des 14 premiers jours de la phase IV de l'expérience 6. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté.

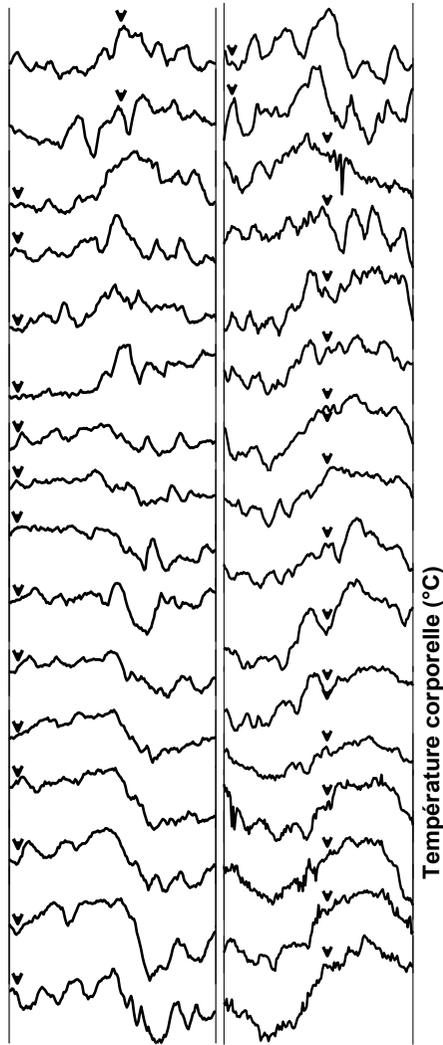
B1 : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle représentative, calculée pour les 5 derniers jours de chacune des 5 phases expérimentales de l'expérience 6. Chaque point de la courbe représente la moyenne des températures des 5 jours enregistrées à un moment (t) de la journée chez cette chamelle. Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle.

B2 : Sélection, à partir du graphique B1, des courbe moyenne de 24 heures de la phase II, III et IV de l'expérience 6, représentant l'application d'un cycle normal de température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour subjectif (phase II), son inversion avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit subjective (phase III) et enfin le retour à un cycle normal de cette température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour subjectif (phase IV). La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle.

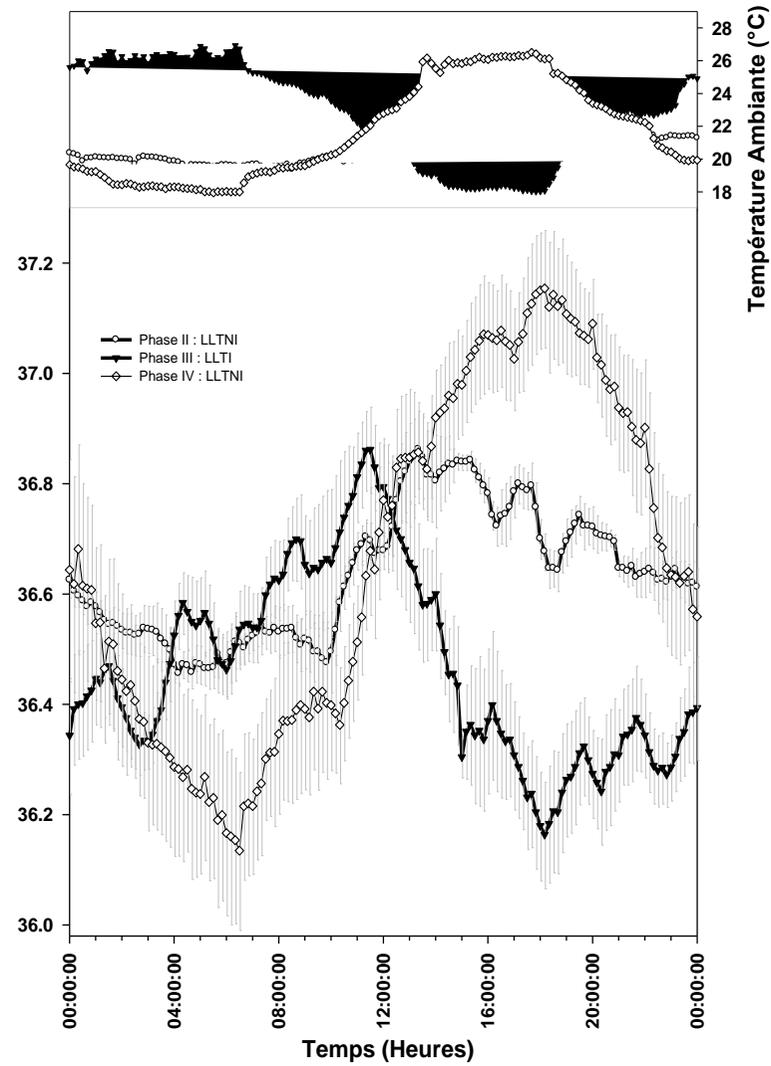
A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.

A1

A2



B2



B1

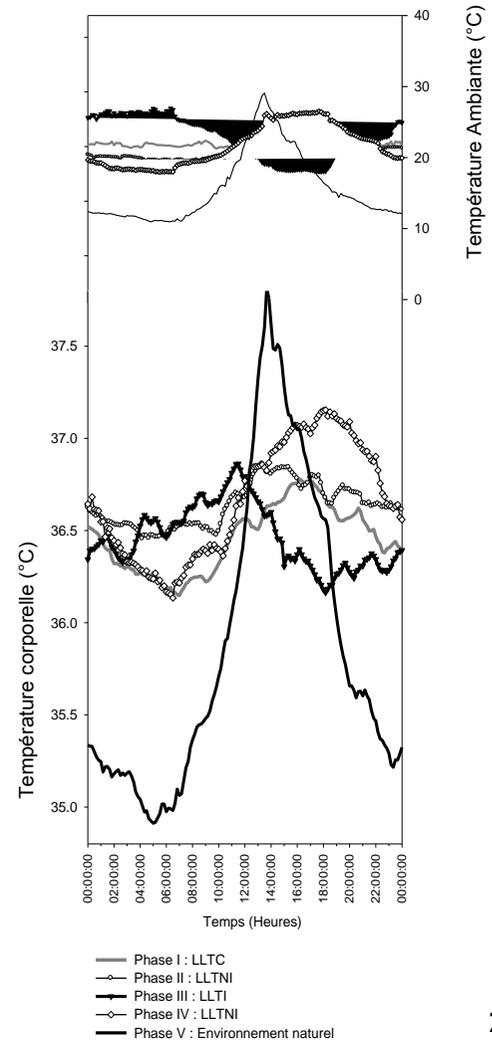


Figure 91 :

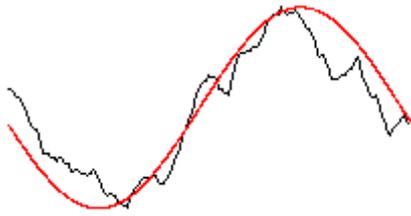
A1 : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chameles du groupe 3, durant les 2 derniers jours de la phase II suivis des 14 premiers jours de la phase III de l'expérience 6. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t) la température des 7 chameles. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté.

A2 : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chameles du groupe 3, durant les 2 derniers jours de la phase III suivis des 14 premiers jours de la phase IV de l'expérience 6. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t) la température des 7 chameles. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté.

B1 : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle des 7 chameles, calculées pour les 5 derniers jours de chacune des 5 phases expérimentales de l'expérience 6. Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamele, la moyenne des températures enregistrées pendant les 5 derniers jours à un moment (t) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chameles pour ce point (t). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle.

B2 : Sélection, à partir du graphique B1, des courbes de 24 heures de la phase II, III et IV de l'expérience 6, représentant l'application d'un cycle normal de température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour (phase II), son inversion avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit (phase III) et enfin le retour à un cycle normal de cette température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour (phase IV). La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle.

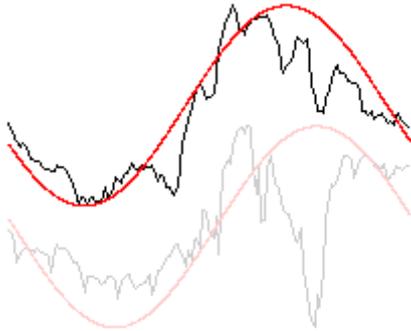
A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minimale : quelques minutes.



Phase I : LL + TC

Température corporelle :

Mean: 36.455, Amplitude: 0.317, Acrophase: 17.32 h, 95% CI: 16.44 to 18.19, Goodness of fit: 0.041 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



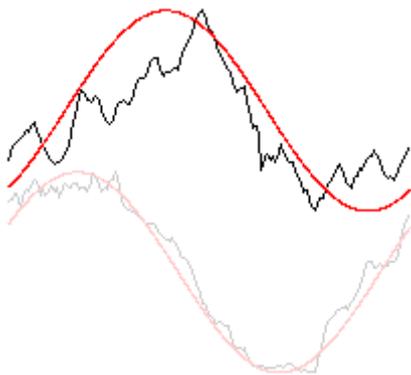
Phase II : LL + TNI

Température corporelle :

Mean: 36.635, Amplitude: 0.204, Acrophase: 16.47 h, 95% CI: 15.47 to 17.47, Goodness of fit: 0.056 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Température ambiante :

Mean: 20.434, Amplitude: 1.607, Acrophase: 18.28 h, 95% CI: 16.08 to 20.49, Goodness of fit: 0.271 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



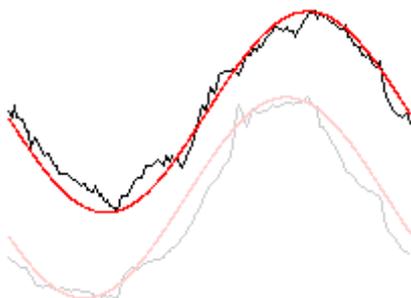
Phase II : LL+ TI

Température corporelle :

Mean: 36.466, Amplitude: 0.349, Acrophase: 9.32 h, 95% CI: 7.85 to 10.78, Goodness of fit: 0.101 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Température ambiante :

Mean: 22.706, Amplitude: 4.458, Acrophase: 4.05 h, 95% CI: 3.71 to 4.39, Goodness of fit: 0.007 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



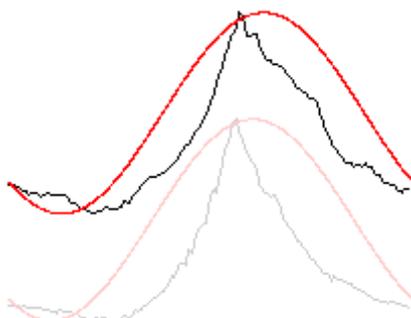
Phase IV : LL + TNI

Température corporelle :

Mean: 36.663, Amplitude: 0.51, Acrophase: 17.75 h (95% CI: 17.34 to 18.16) Goodness of fit: 0.01 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Température ambiante :

Mean: 21.668, Amplitude: 4.283, Acrophase: 16.47 h, 95% CI: 16.09 to 16.84 Goodness of fit: 0.009 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



Phase IV : Environnement naturel

Température corporelle :

Mean: 35.866, Amplitude: 1.45, Acrophase: 15.12 h, 95% CI: 14.12 to 16.12 Goodness of fit: 0.054 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

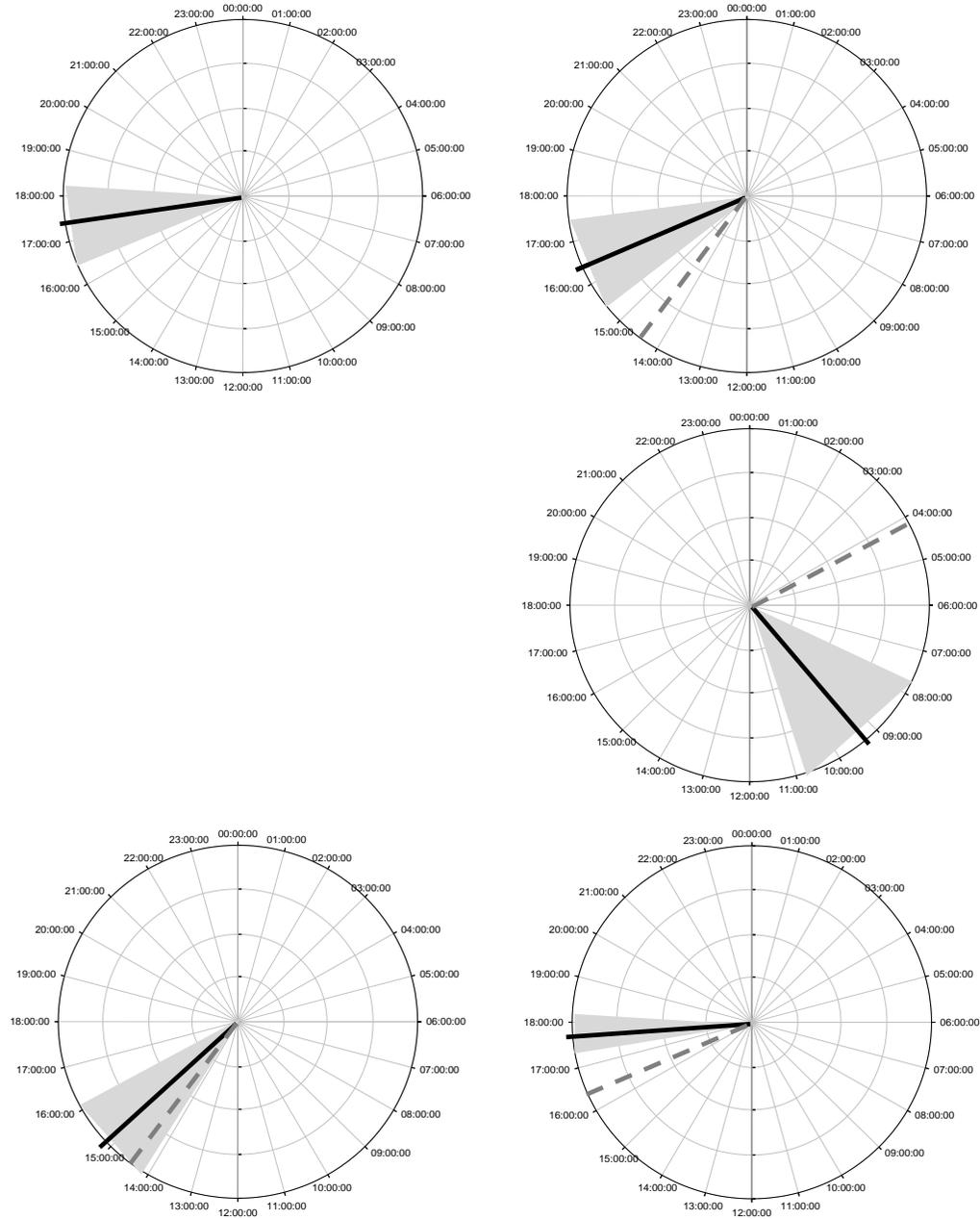
Température ambiante :

Mean: 15.623, Amplitude: 9.074, Acrophase: 14.48 h, 95% CI: 13.17 to 15.8 Goodness of fit: 0.09 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Figure 92 : Régression par la méthode du Cosinor, effectuée sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 6. La régression représente la meilleure courbe (en rouge) qui superpose la courbe moyenne de 24h des données de la température corporelle (en noir). Quand un cycle de la température ambiante existe, sa courbe de 24h et sa courbe de régression sont également montrées, en filigrane. Pour chaque régression, les paramètres suivants sont donnés : la moyenne, l'amplitude, l'acrophase et le degré de signification de la régression.

Figure 93 :

Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées dans chaque phase de l'expérience 6. Les acrophases sont calculées par la méthode de Cosinor, représentées dans la figure précédente. Chaque cercle représente un horaire d'une journée en 24 heures. L'acrophase moyenne de la température corporelle est indiquée par une ligne noire limitée par un triangle gris qui représente l'intervalle de confiance à 95% de probabilité. Quand un cycle de la température ambiante existe, son acrophase est représentée par une ligne discontinue grise.



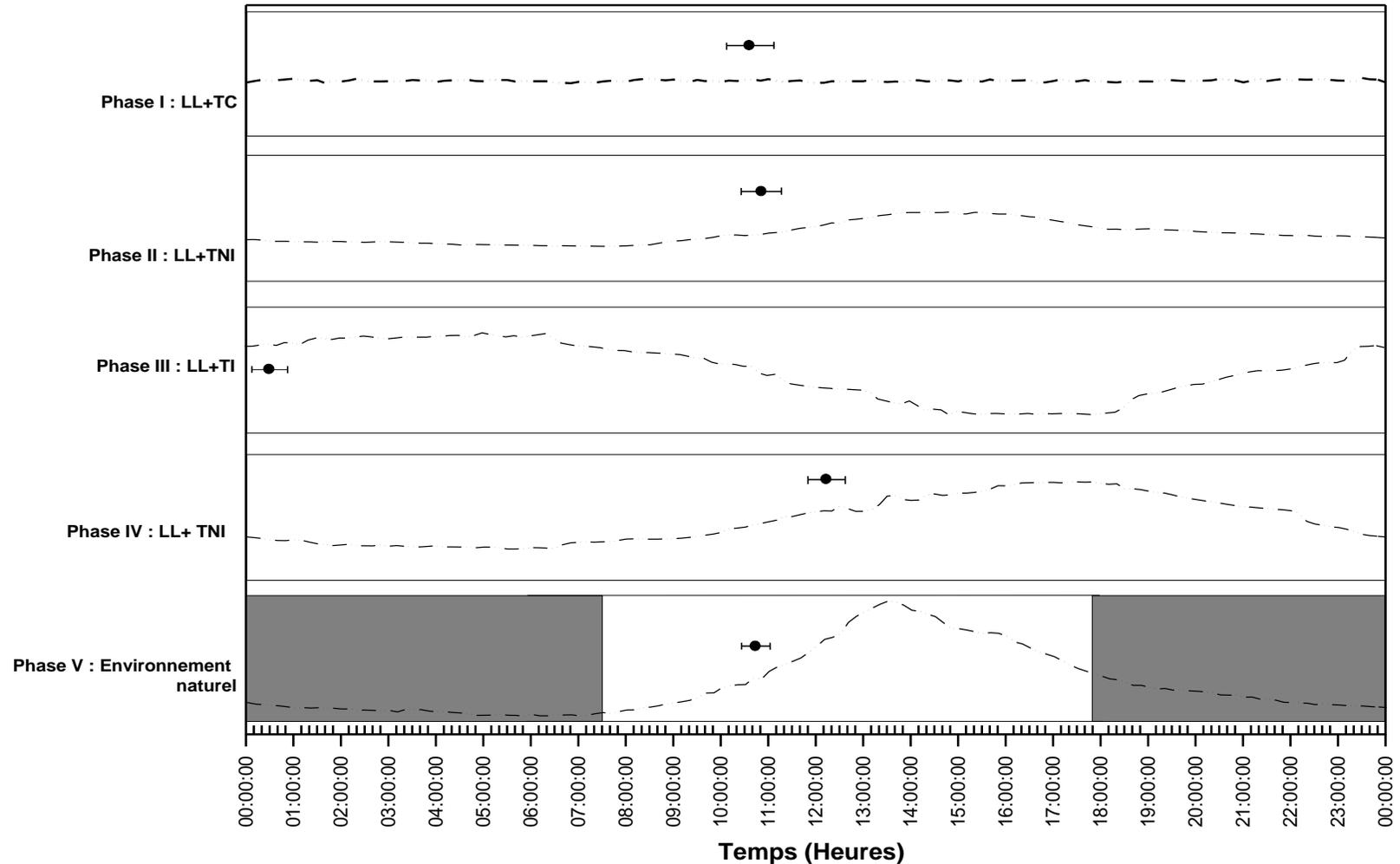


Figure 94 : Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 6. Le moment du point de référence correspond au moment où la courbe croise durant sa montée journalière, la valeur de la moyenne du rythme. Il est indiqué par un cercle avec la barre d'erreur (SEM). Les rectangles gris et blancs correspondent respectivement à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité de chaque phase expérimentale. La courbe moyenne de 24h du cycle de la température ambiante est représentée pour chaque phase par une ligne discontinue. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.

2.2. *Entraînement par le cycle de température ambiante en obscurité constante DD : Expérience 7*

Après avoir vérifié les capacités d'entraînement du cycle de la température ambiante sous une lumière constante, dans un deuxième temps nous avons voulu vérifier si cet effet était aussi observable dans des conditions d'obscurité constante (DD). Le protocole adopté nous permettra également de vérifier une fois de plus l'existence d'une horloge endogène et le calcul de la période circadienne dans le cas d'une obscurité constante.

2.2.1. *Protocole expérimental*

Après adaptation des chamelles aux conditions de l'étable, l'expérience s'est déroulée sur 4 phases :

Phase I, LD +TC : 4 jours sous une photopériode LD 12:12 et une température constante de $21,2 \pm 0,6^\circ\text{C}$.

Phase II, DDTC : température constante ($21,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$) et obscurité DD (lumière rouge de très faible intensité). Cette phase a duré 17 jours.

Phase III, DDTNI : les conditions DD ont été maintenues mais par contre, un cycle artificiel de la température ambiante mimant celui de l'environnement extérieur a été mis en place avec un maximum de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour subjectif. La durée de cette phase a été de 13 jours.

Phase IV, DDTI : en maintenant le DD, nous avons inversé le cycle artificiel de la température ambiante (avance de phase de 12 h) avec un pic de chaleur à la 2^{ème} moitié de la nuit subjective. Cette phase a duré 12 jours.

Nous savons suite aux expériences précédentes que le cycle inversé de température entraîne le rythme de température corporelle. Avec ce seul paramètre, nous ne pouvions pas exclure que ce résultat est la conséquence d'un entraînement passif par diffusion de la température ambiante. Afin de vérifier que cette observation pouvait être la résultante de l'entraînement de l'horloge circadienne par le cycle de température ambiante, nous avons étudié parallèlement une autre sortie de l'horloge connue pour être indépendante de la température, la sécrétion de mélatonine. Des prélèvements sanguins ont été effectués à un intervalle de 2 à 3 heures durant la fin de la phase II (16^{ème} jour), de la phase III (12^{ème} jour) et durant la fin de la phase IV (11^{ème} jour). La technique de prélèvement et le dosage radio-immunologique de la mélatonine ont été réalisés suivant les protocoles détaillés précédemment (voir matériel et méthodes).

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. *Rythme de la température corporelle*

L'évolution chez une chamelle de la température corporelle en fonction du temps durant les quatre phases expérimentales de l'expérience 7, est représentée dans la figure 95. Dans la figure 96 c'est l'évolution moyenne chez les 7 femelles qui est présentée. Un rythme de la température corporelle avec une période de 24,0h existe quand les animaux sont placés en LD et température constante. Ce rythme persiste en DD et température constante (phase II) démontrant encore une fois la nature endogène/circadienne du rythme. La période endogène sous ces conditions constantes est de 24,2h. En phase III, en maintenant les mêmes conditions de DD et en appliquant un cycle de température ambiante avec un maximum de chaleur pendant la 2^{ème} moitié du jour subjectif, un rythme de la température corporelle régulier existe avec une période calculée de 24,0h. Après l'inversion du cycle de la température corporelle dans la phase IV, le rythme de la température corporelle persiste avec la même période de 24,0h.

La moyenne et l'amplitude du rythme varient peu durant les différentes étapes de cette expérience. Ainsi, la moyenne est de $36,33 \pm 0,13$, $36,26 \pm 0,11$, $36,19 \pm 0,06$ et $36,25 \pm 0,14^\circ\text{C}$, respectivement pour les phases I, II, III et IV. L'amplitude est respectivement de $0,34 \pm 0,09$, $0,37 \pm 0,10$, $0,81 \pm 0,22$ et $0,76 \pm 0,15^\circ\text{C}$, pour les phases I, II, III et IV.

Les figures 95 et 96 montrent en absence d'un cycle de température ambiante (phase I et II), que le rythme de la température corporelle présentent de grandes variations ultradiennes et infradiennes. Sous l'influence d'un cycle de température (phase III et IV) une régularité de la forme de la courbe du rythme journalier de la température corporelle existe. Ces variations ultradiennes et infradiennes semblent être masquées. De même, l'application de ce cycle de température ambiante, entraîne une élévation de l'amplitude du rythme de la température corporelle. Toutefois, quand ce cycle est inversé (Phase IV), la régularité de la forme du rythme est affectée, avec l'apparition d'un deuxième pic du rythme entre deux pics principaux. Ce deuxième pic est plus apparent sur les courbes moyennes de 24h représentées dans les figures 97 et 98. D'après ces deux figures, les courbes moyennes de 24h sont en phase avec la courbe du rythme endogène (phase II) sauf quand il y'a une application d'un cycle de température inversé (phase IV). En effet, durant cette phase expérimentale, le rythme de la température corporelle est inversé et sa courbe de 24h est en antiphasse avec la courbe du rythme endogène. Les acrophases de ces courbes, calculées par la méthode de régression du Cosinor (Figure 100) et leurs représentations

schématiques (Figure 101) montrent un déplacement de l'acrophase de 15h57 à 02h36 quand on passe du cycle artificiel de la phase III à son inversion opérée durant la phase IV. De même le point de référence de la phase ascendante du rythme (Figure 102) est déphasé de 11h par cette inversion du cycle de la température ambiante. Nous pouvons observer également à partir de cette figure, la stabilité de cette phase ascendante du rythme (erreur standard moyenne plus faible) quand un cycle de température ambiante est établi (phase III et IV), contrairement aux conditions où ce cycle est absent (phase I et II). Ceci est en accord avec le résultat déjà relevé, d'une régularité de la forme générale du rythme quand un cycle de température ambiante existe.

La figure 99 montre les évolutions des courbes de 24 heures de la température corporelle, calculées durant les 4 phases expérimentales, d'abord chez deux chèvres ensuite chez l'ensemble des 7 chèvres sous forme de moyenne. Les conditions constantes de la phase II, affectent considérablement la forme générale du rythme de la température corporelle notamment dans les exemples de données enregistrées chez les deux chèvres. L'application d'un cycle artificielle de température ambiante avec un pic durant la 2^{ème} moitié du jour subjectif (phase III), permet au rythme endogène de se synchroniser en 3 jours et d'avoir une forme et une amplitude plus régulière. L'inversion du cycle de la température ambiante (phase IV) avec une phase opposée à celle du rythme endogène, nécessite un temps plus long pour obtenir la synchronisation du rythme. 8 à 9 jours sont nécessaires.

L'ensemble de ces résultats démontre encore la nature circadienne du rythme de la température corporelle chez le Dromadaire. Les données obtenues démontrent également que sous l'obscurité totale, le cycle de la température ambiante impose sa période de 24,0h au rythme de la température corporelle et constitue par conséquent un facteur d'entraînement de ce rythme. Toutefois, seuls les résultats du rythme de la mélatonine peuvent démontrer s'il s'agit d'une adaptation passive ou d'un entraînement réel de l'horloge.

2.2.2.2. *Rythme de la mélatonine*

La figure 103 montre le rythme individuel de 24 heures de la mélatonine chez les 7 chèvres, en fonction des conditions expérimentales des trois phases : II, III et IV. La phase du rythme de la mélatonine est différente entre les sept chèvres. Ceci est logique puisque les animaux étant en DD ils sont en libre cours. Durant la phase III, l'application d'un cycle artificielle de la température ambiante avec un maximum de chaleur durant la deuxième moitié du jour subjectif permet de conserver la même phase du rythme de mélatonine que celle observée sous les conditions constantes

de la phase II. Ceci est en accord avec les résultats de la température corporelle dont le rythme montre pratiquement la même phase entre les conditions expérimentales de la phase II et III. L'inversion du cycle de la température ambiante opérée durant la phase IV engendre soit une inversion soit un déphasage du rythme de la mélatonine ; Ceci est observé chez six chamelles sur sept.

D'une manière générale en regardant le rythme de 24h de la mélatonine sous une obscurité constante, celui-ci montre un pic quand le cycle de la température ambiante est en bathyphase. Le moment de ce pic est presque similaire sous les conditions constantes et sous un cycle de la température ambiante parallèle aux variations naturelles de l'environnement.

Ces résultats sont particulièrement intéressants dans la mesure où ils démontrent que chez le Dromadaire, le cycle journalier de la température ambiante entraîne le rythme de la mélatonine. Ceci est donc la démonstration que ce cycle de température ambiante est un véritable synchronisateur de l'horloge circadienne, du moins en absence d'un entraînement par le cycle lumière-obscurité.

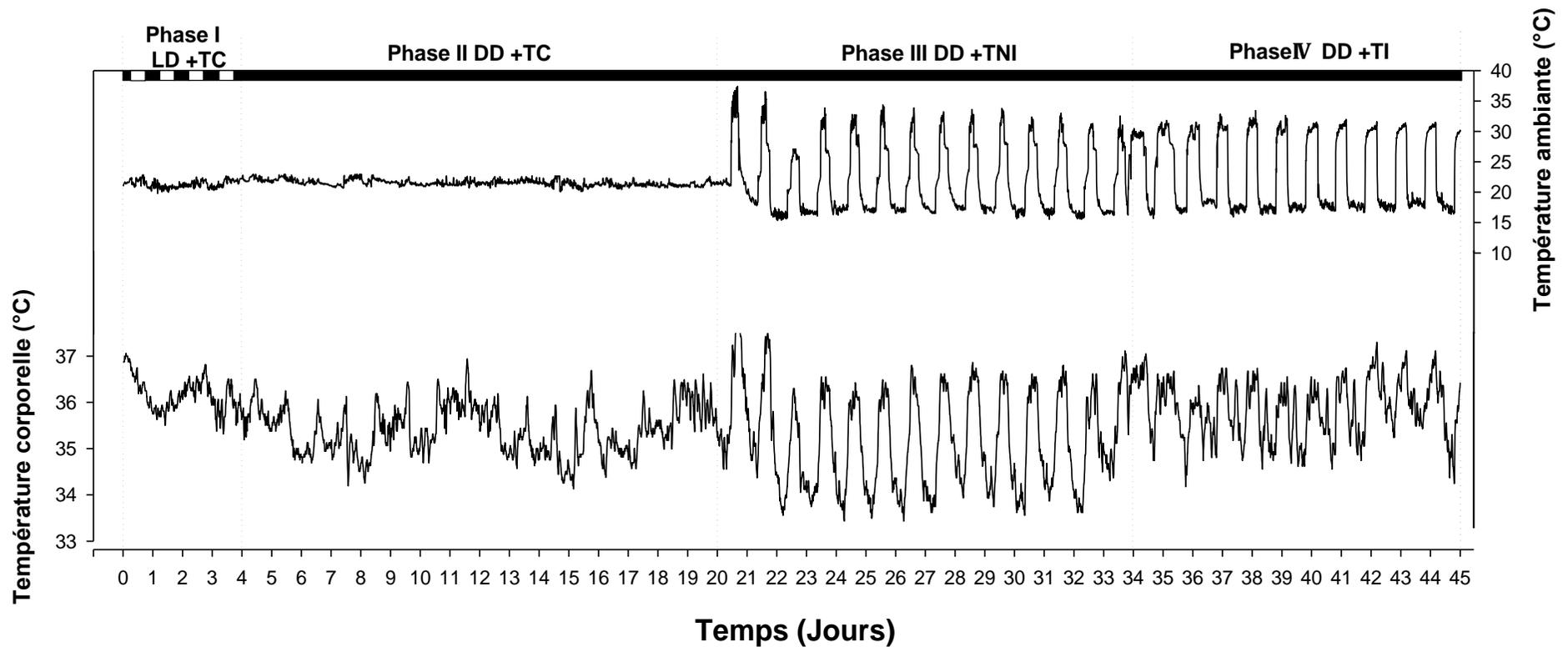


Figure 95 : Evolution de la température corporelle chez une chamelle représentative, sous les conditions de l'expérience 7. Phase I : cycle lumière-obscurité et température ambiante constante (LD + TC) ; phase II : obscurité constante et température ambiante constante (DD+TC), phase III : obscurité constante et cycle normal de température ambiante avec un pic de chaleur durant le jour (DD+TNI) ; phase IV : obscurité constante et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (DD+TI). La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton et pendant une durée totale de 45 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée avec le même intervalle et est représentée par la courbe supérieure. En haut de la figure, les rectangles noirs et blancs correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité de la phase I, par la suite le rectangle noir et long, marque l'absence de ce cycle et l'instauration d'une obscurité constante. Les traits discontinus montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre deux phases. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minimale : quelques minutes.

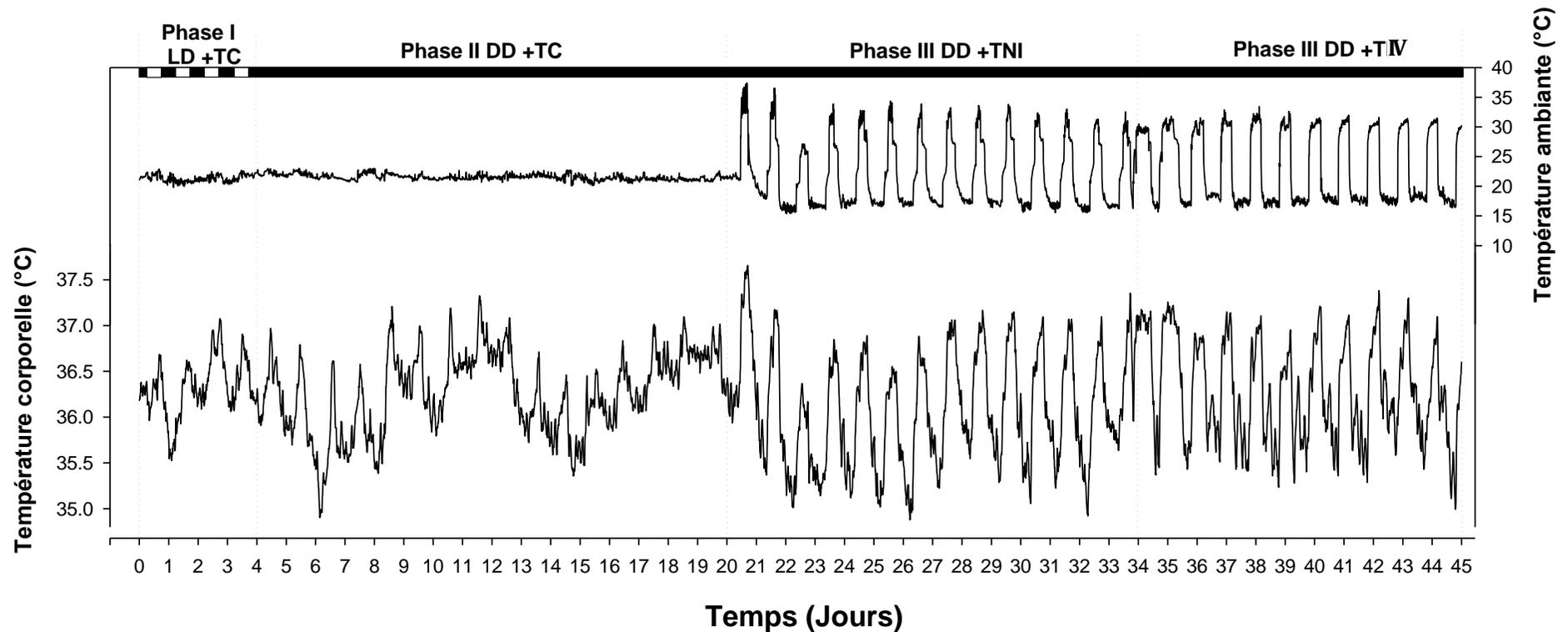


Figure 96 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chameles du groupe 3, sous les conditions de l'expérience 7. Phase I : cycle lumière-obscurité et température ambiante constante (LD + TC) ; phase II : obscurité constante et température ambiante constante (DD+TC), phase III : obscurité constante et cycle normal de température ambiante avec un pic de chaleur durant le jour (DD+TNI) ; phase IV : obscurité constante et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (DD+TI). Chaque point correspond à la moyenne des sept chameles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur lbutton et pendant une durée totale de 45 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée avec le même intervalle et est représentée par la courbe supérieure. En haut de la figure, les rectangles noirs et blancs correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité de la phase I, par la suite le rectangle noir et long, marque l'absence de ce cycle et l'instauration d'une obscurité constante. Les traits discontinus montrent les moments de changement des conditions expérimentales entre deux phases. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.

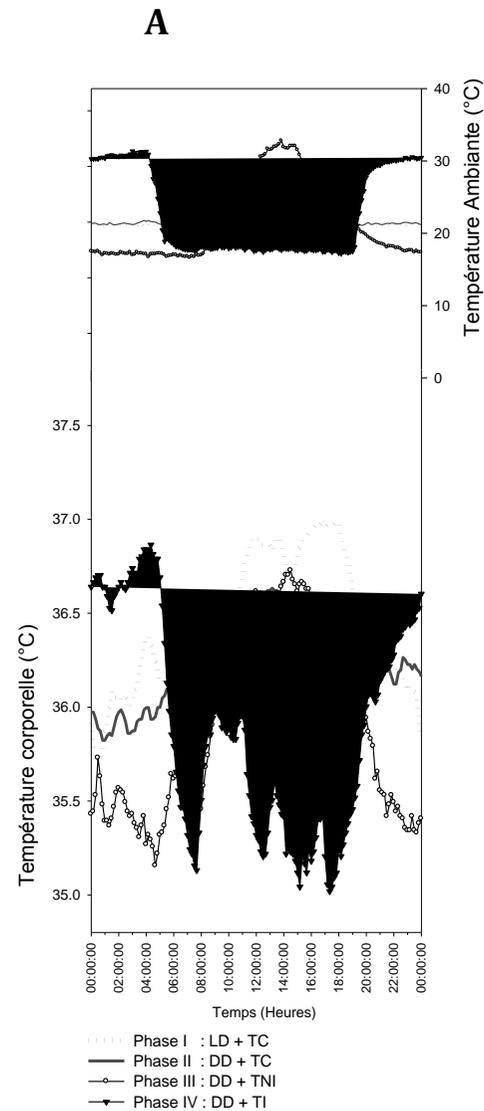
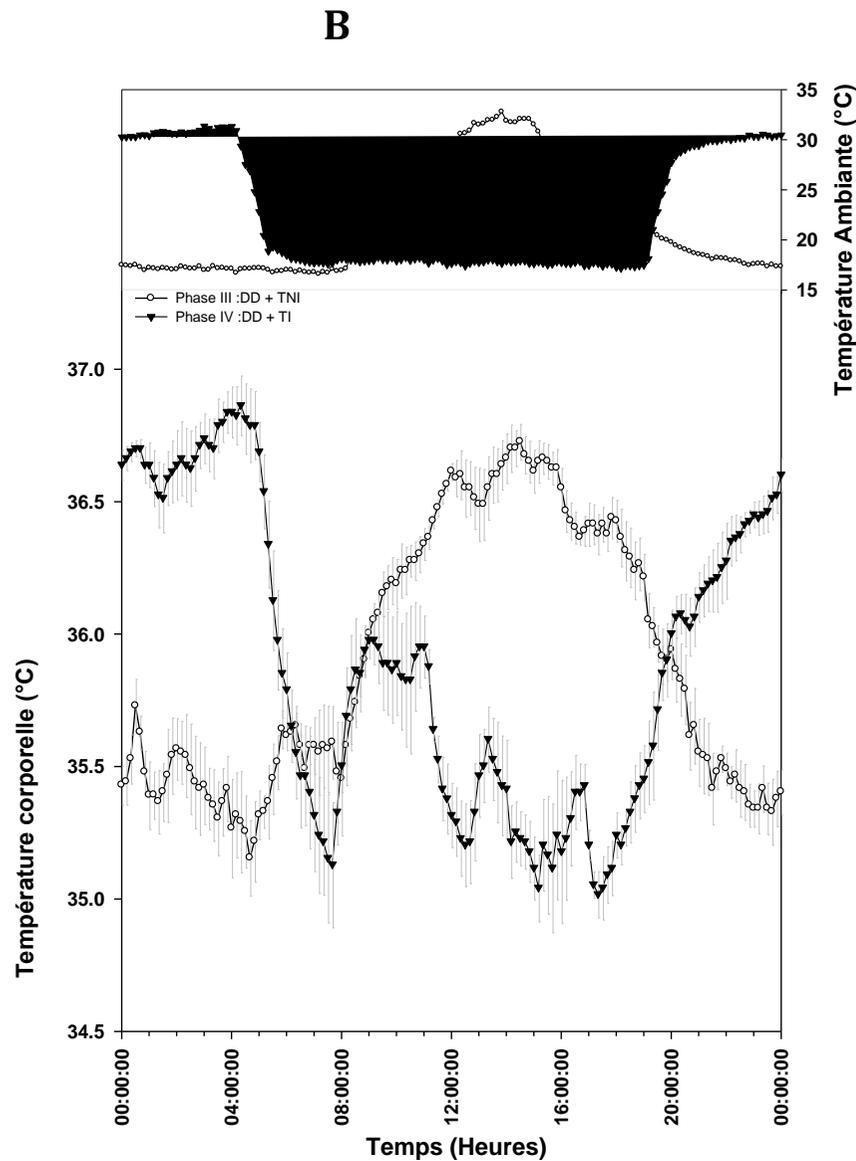


Figure 97 :

A : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle représentative, calculée pour les 5 derniers jours de chacune des 4 phases expérimentales de l'expérience 7. Chaque point de la courbe représente la moyenne des températures des 5 jours enregistrées à un moment (t) de la journée chez cette chamelle. Les courbes moyennes de 24h de la température ambiante correspondant à chaque phase sont représentées en parallèle.

B : Sélection, à partir du graphique A, des courbes de 24 heures de la phase III et IV de l'expérience 7, représentant l'application d'un cycle normal de la température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour (phase III) et son inversion avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit (phase IV). La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minimale : quelques minutes.

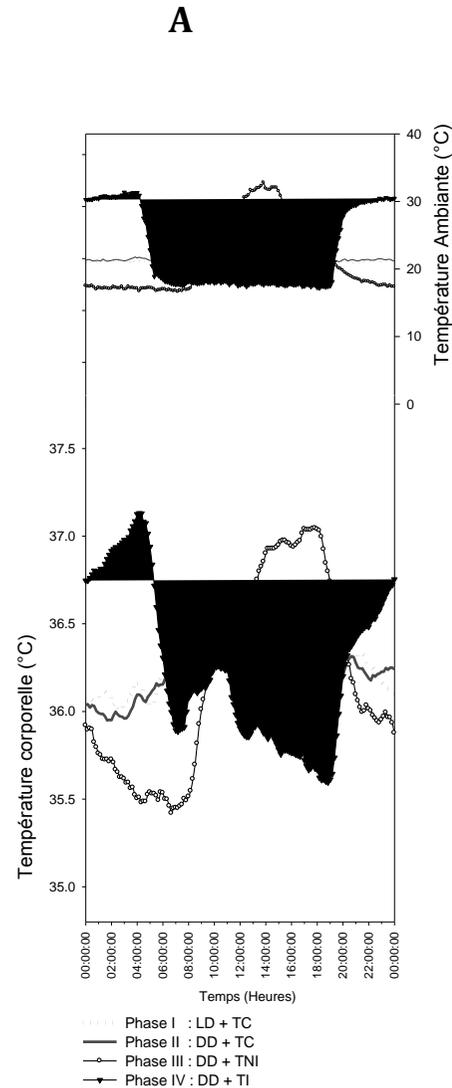
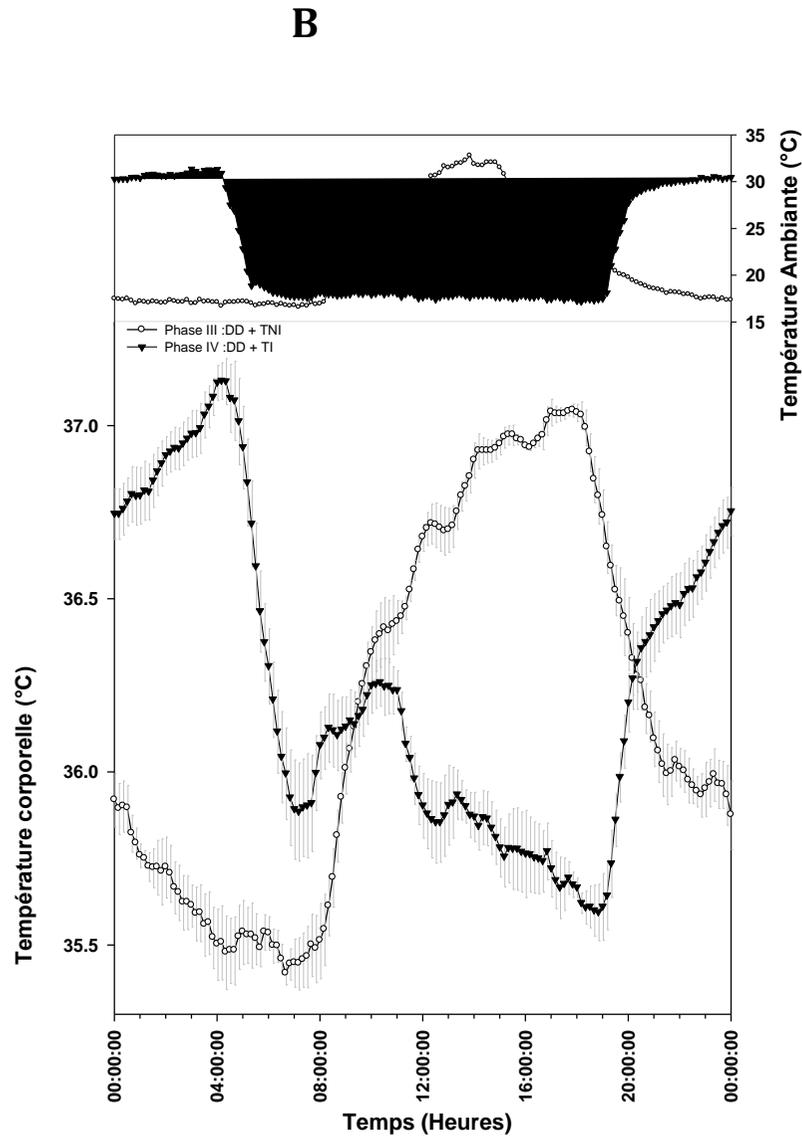


Figure 98 :

A : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle des 7 chameilles, calculée pour les 5 derniers jours de chacune des 4 phases expérimentales de l'expérience 7. Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chameille, la moyenne des températures enregistrées pendant les 5 derniers jours à un moment (t) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chameilles pour ce point (t). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle.

B : Sélection, à partir du graphique A, des courbes de 24 heures de la phase III et IV de l'expérience 7, représentant l'application d'un cycle normal de température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour (phase III) et son inversion avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit (phase IV). La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les courbes de 24h de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle.

A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.

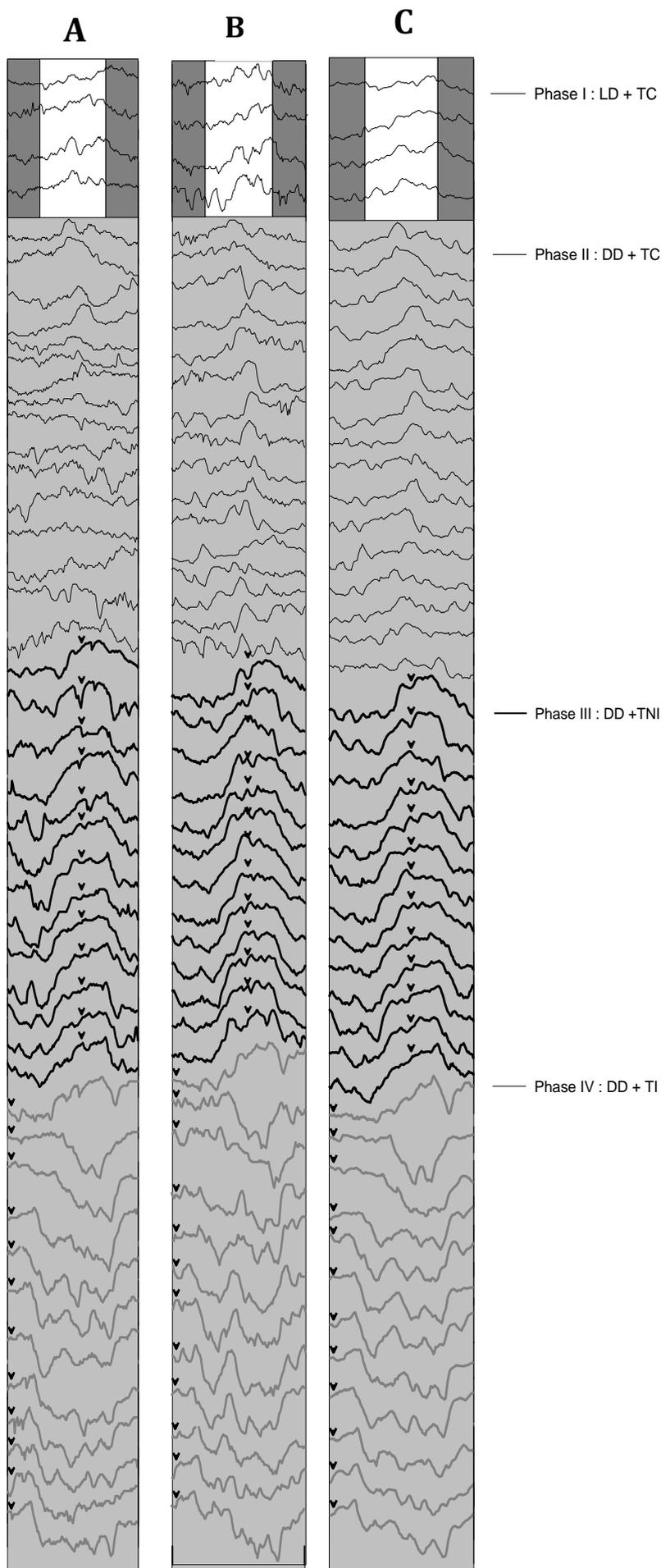
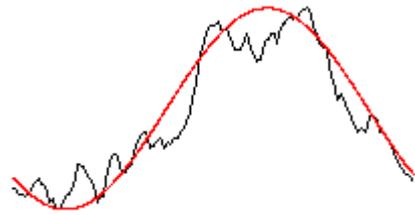


Figure 99 :

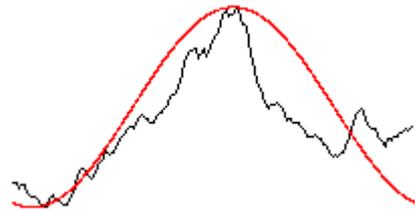
A et B : Courbes de 24 heures de la température corporelle de deux chamelles (1^{ère} Chamelle : graphique A; 2^{ème} chamelle : graphique B) durant l'expérience 7 et représentant les 4 derniers jours de la phase I suivis des 16 jours de la phase II, ensuite des 14 jours de la phase III et finalement des 11 jours de la phase IV. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté. Les barres noires représentent les moments de l'obscurité et la barre blanche, la phase lumineuse du cycle lumière-obscurité. La barre grise durant la phase II, III et IV correspond à une obscurité constante.

C : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chamelles durant les 4 derniers jours de la phase I suivis des 16 jours de la phase II, ensuite des 14 jours de la phase III et finalement des 11 jours de la phase IV. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t), la température des 7 chamelles. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle adopté de la température ambiante. Les barres noires représentent les moments de l'obscurité et la barre blanche la phase lumineuse du cycle lumière-obscurité. La barre grise durant la phase II, III et IV correspond à une obscurité constante.



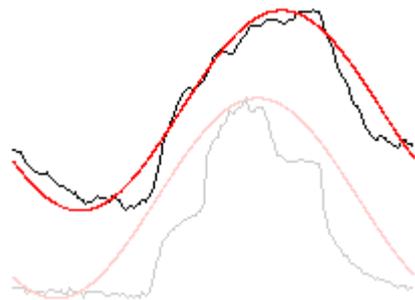
Phase I : LD + TC

Mean: 36.334, Amplitude: 0.346, Acrophase: 15.1 h, 95% CI: 14.43 to 15.77, Goodness of fit: 0.026 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



Phase II : DD + TC

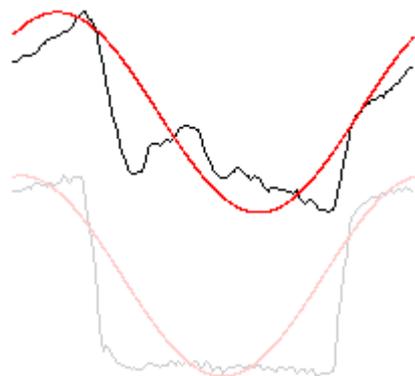
Mean: 36.262, Amplitude: 0.376, Acrophase: 13.08 h (95% CI: 11.64 to 14.53) Goodness of fit: 0.103 $p < 0.001$, SIGNIFICANT



Phase III : DD+ TNI

Mean: 36.196, Amplitude: 0.814, Acrophase: 15.95 h (95% CI: 15.44 to 16.46) Goodness of fit: 0.017 $p < 0.001$, SIGNIFICANT

Mean: 21.844, Amplitude: 8.1, Acrophase: 14.53 h (95% CI: 13.72 to 15.35) Goodness of fit: 0.043 $p < 0.001$ SIGNIFICANT



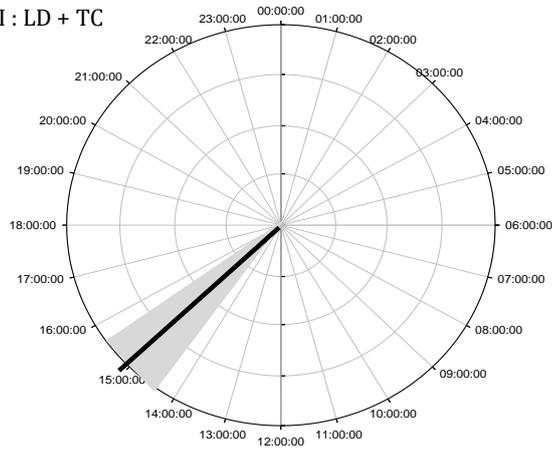
Phase IV : DD+ TI

Mean: 36.259, Amplitude: 0.768, Acrophase: 2.6 h (95% CI: 1.46 to 3.74), Goodness of fit: 0.075 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

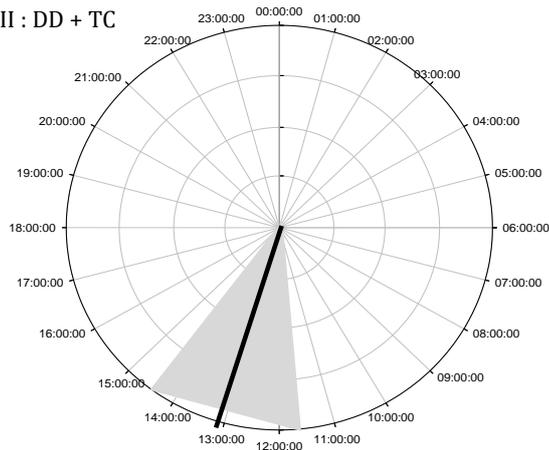
Mean: 22.639, Amplitude: 7.088, Acrophase: 0.45 h (95% CI: -0.44 to 1.34) Goodness of fit: 0.063 $p < 0.001$ SIGNIFICANT

Figure 100 : Régression par la méthode du Cosinor, effectué sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 7. La régression représente la meilleure courbe (en rouge) qui superpose la courbe moyenne de 24h des données de la température corporelle(en noir). Quand un cycle de la température ambiante existe, sa courbe de 24h et sa courbe de régression sont également montrées, en filigrane. Pour chaque régression, les paramètres suivant sont donnés : la moyenne, l'amplitude, l'acrophase et le degré de signification de la régression.

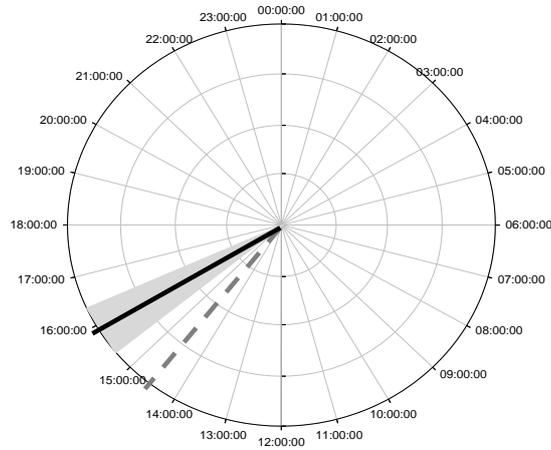
Phase I : LD + TC



Phase II : DD + TC



Phase III : DD+ TNI



Phase IV : DD+ TI

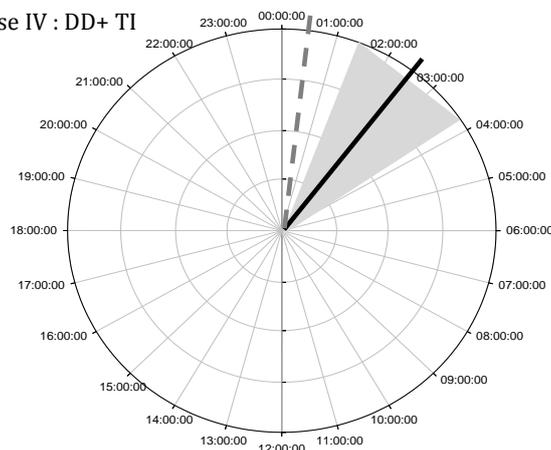


Figure 101 :

Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées dans chaque phase de l'expérience 7. Les acrophases sont calculées par la méthode de Cosinor, représentée dans la figure précédente. Chaque cercle représente un horaire d'une journée en 24 heures. L'acrophase moyenne de la température corporelle est indiquée par une ligne noire limitée par un triangle gris qui représente l'intervalle de confiance à 95% de probabilité. Quand un cycle de la température ambiante existe, son acrophase est représentée par une ligne discontinue grise.

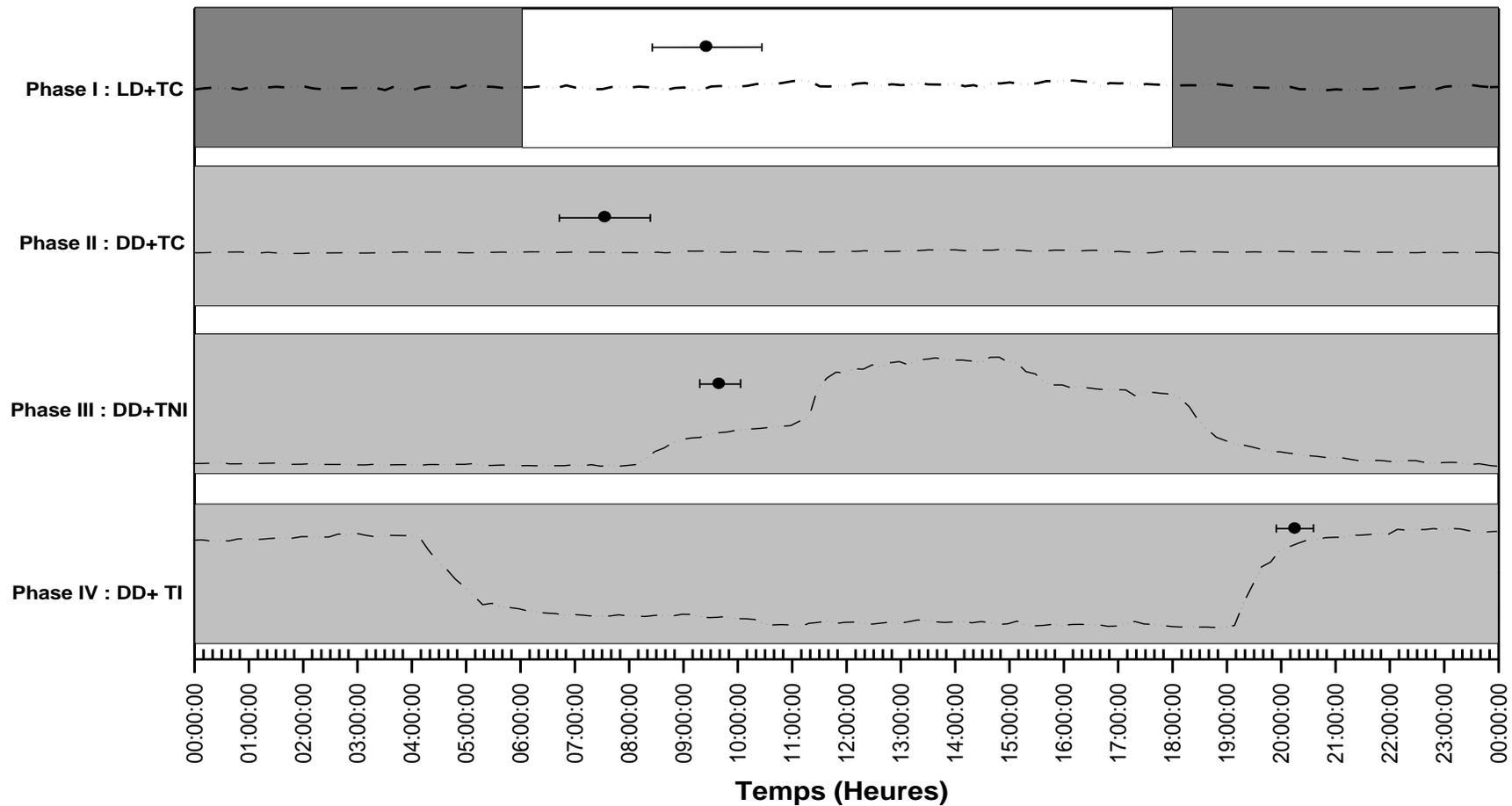
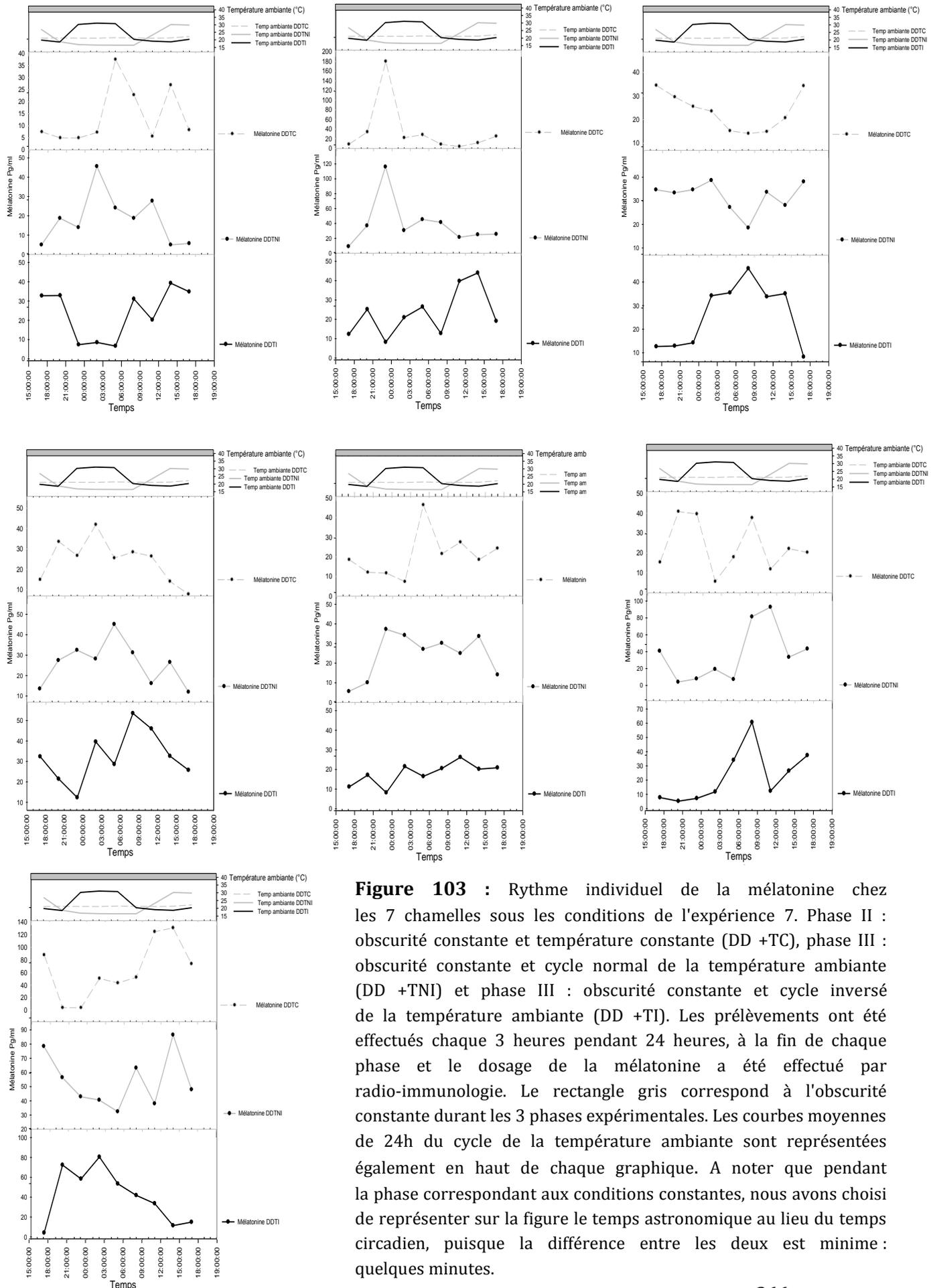


Figure 102 : Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 7. Le moment du point de référence correspond au moment où la courbe croise durant sa montée journalière, la valeur de la moyenne du rythme. Il est indiqué par un cercle avec la barre d'erreur (SEM). Les rectangles blancs et gris correspondent respectivement à la phase lumineuse et obscure du cycle lumière-obscurité de la phase I, les rectangles gris à l'obscurité constante de la phase II, III et IV. La courbe moyenne de 24h du cycle de la température ambiante est représentée pour chaque phase par une ligne discontinue. A noter que pendant la phase correspondant aux conditions constantes, nous avons choisi de représenter sur la figure le temps astronomique au lieu du temps circadien, puisque la différence entre les deux est minime : quelques minutes.



V. Puissance d'entraînement du cycle LD versus le cycle de température ambiante : Expérience 8

Nous avons démontré précédemment qu'en absence d'un cycle lumière obscurité, le cycle de température ambiante est un synchroniseur de l'horloge biologique, entraînant le rythme circadien de la température corporelle et le rythme circadien de sécrétion de mélatonine. L'existence d'un tel synchroniseur face au synchroniseur puissant qu'est le cycle lumière-obscurité, pose la question de l'importance (ou la puissance) relative du cycle de la température versus le cycle lumière-obscurité. Nous avons donc voulu savoir, si en présence d'un cycle lumière obscurité, un cycle journalier de la température ambiante était toujours capable d'agir sur l'horloge circadienne.

1. Animaux

Pour cet essai nous avons utilisé les sept chamelles du groupe 3 (étable de Rabat). La température corporelle a été suivie en utilisant le thermochron Ibutton. Avec un relevé toutes les 10 minutes. Des prélèvements sanguins ont été également effectués à la fin de chaque phase afin de doser la mélatonine : voir protocole.

2. Protocole expérimental

Pour répondre à la question posée, nous avons fixé la photopériode à LD 12:12 et nous avons fait varier le cycle journalier de la température ambiante. Puis nous avons suivi deux paramètres dépendant de l'horloge circadienne, le rythme de la température corporelle et le rythme de la mélatonine :

Phase I LDTNI : les chamelles ont été placées sous une photopériode artificielle LD 12:12 et un cycle de la température ambiante parallèle aux variations extérieures et naturelles (pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour). La durée de cette phase a été de 28 jours.

Phase II LDTI : en gardant la même photopériode LD 12:12, le cycle de la température ambiante a été inversé de 12 h avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit. Cette phase a duré 20 jours.

Nous avons démontré précédemment que sous une obscurité constante, le cycle de la température ambiante est capable d'entraîner l'horloge et d'entraîner par conséquent **le rythme de la mélatonine**. Dans le présent protocole nous avons voulu vérifier si cet entraînement persiste quand un cycle lumière-obscurité est appliqué. Des prélèvements sanguins ont été ainsi effectués à un intervalle

de 3heures durant la fin de la phase I (27^{ème} jour) et durant la fin de la phase II (19^{ème} jour). La technique du prélèvement et de dosage utilisée est bien détaillée dans la partie : matériel et méthodes.

3. Résultats

3.1. Rythme de la température corporelle

L'évolution de la température corporelle en fonction du temps durant la phase I et la phase II est représentée pour une chamelle (figure 104), et pour la moyenne des 7 chamelles (figure 105). L'expérience montre que l'application d'un cycle de température ambiante, induit une forme régulière du rythme de la température corporelle et que l'inversion de ce cycle durant la phase II, n'affecte que moyennement la forme générale du rythme. Cependant, après inversion du cycle de température, un deuxième pic apparaît dans le rythme journalier. Ceci correspond à ce que nous avons relevé précédemment en présence d'un cycle de température ambiante en contre phase du rythme endogène de la température corporelle. Les deux figures 104 et 105 montrent également l'existence de variations ultradiennes et infradiennes mais qui sont d'un degré moindre que celles observées et rapportées sous conditions constantes ou en absence d'un cycle de température ambiante. L'ensemble de ces constatations ré-renforce l'idée que le cycle de température ambiante affecte l'amplitude et la forme générale du rythme de la température corporelle.

La moyenne et l'amplitude du rythme varient peu durant les deux étapes de cette expérience. Ainsi, la moyenne est de $35,90 \pm 0,23^\circ\text{C}$ et de $36,07 \pm 0,29^\circ\text{C}$, et l'amplitude de $0,64 \pm 0,10^\circ\text{C}$ et de $0,64 \pm 0,15^\circ\text{C}$, respectivement pour les phases I, II.

Les courbes moyennes de 24h pour une chamelle représentées dans la figure 106 et dans la figure 107 pour les 7 chamelles montrent, que même en présence d'un cycle artificiel de lumière-obscurité : LD 12 :12, l'inversion du cycle de la température ambiante induit une inversion du rythme de la température corporelle. Cette inversion du rythme se réalise en 12 à 13 jours.

Les résultats obtenus à partir des régressions utilisant l'analyse Cosinor (Figure 108) comme la représentation schématique des acrophases calculées (Figure 109), montrent après inversion du cycle, que le rythme de température corporelle présente une avance de phase de presque de 8 heures. L'acrophase de la phase I est à 15h05 et celui de la phase II est à 07h09. En fait, l'acrophase du rythme de la température corporelle se situe toujours après celui du cycle de la température ambiante. Toutefois, le délai semble plus important quand le cycle de la température est inversé : 3heures durant la phase II contre une demi-heure durant

la phase I. Ce résultat conforte les observations précédentes à savoir un déplacement et une inversion non totale et non proportionnelle à l'inversion opérée sur le cycle de la température ambiante. Par ailleurs, dans la phase II, à côté du grand pic du rythme qui montre une acrophase à 07h09, un deuxième pic plus tardif et petit, a été observé (figure 106 et 107). Ce dernier pic coïncide avec le moment du pic initial, relevé dans la phase I.

L'avance de phase de l'acrophase du rythme de température corporelle obtenue suite à l'inversion du cycle de la température ambiante, a été également observée pour le point de référence de la phase ascendante (Figure 110). Elle est presque de 6 heures mais reste partielle, comparativement à l'inversion du cycle de la température corporelle (12heures).

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'en présence d'un cycle lumière-obscurité artificielle : LD 12 :12, l'inversion du cycle de la température ambiante est capable d'avancer considérablement la phase du rythme de température corporelle. Ceci semblerait dire que le cycle de température ambiante est un synchroniseur plus puissant que le cycle jour/nuit. Toutefois, cette conclusion ne serait valable que si le cycle de température ambiante agissait parallèlement sur d'autres sorties circadiennes de l'horloge par exemple la mélatonine.

3.2. Rythme de la mélatonine

Les résultats obtenus dans ces conditions expérimentales sur les rythmes de mélatonine des sept chamelles sont présentés dans la figure 111. En présence d'un cycle LD (LD 12:12) et d'un cycle de la température ambiante avec un maximum de chaleur durant la deuxième moitié du jour (phase I), la mélatonine est secrétée la nuit et les concentrations plasmatiques commencent à s'élever rapidement immédiatement après le passage lumière-obscurité et atteignent un pic au milieu de la nuit. Ceci est conforme aux résultats obtenus dans le chapitre 1 et 2 et en accord avec tout ce que l'on sait des mécanismes cellulaires impliqués dans le contrôle de cette synthèse et sécrétion. En inversant le cycle de la température ambiante, avec un maximum de chaleur pendant la deuxième moitié de la nuit (phase II), le profil de la mélatonine ne change pas avec une sécrétion pendant la phase obscure, (élévation rapide après le passage lumière -obscurité maximum au milieu de la nuit). Le rythme de la mélatonine n'est pas donc affecté par l'inversion du cycle de la température ambiante. Un léger effet toutefois peut être noté chez deux chamelles (les deux derniers graphiques de la figure 111) où une légère avance de phase du rythme de la mélatonine est observée.

L'ensemble de ces résultats démontrent que sous un cycle lumière obscurité, la température corporelle est incapable d'entraîner le rythme de la mélatonine.

Ce résultat indique donc clairement que l'inversion du cycle de température ambiante démontrée comme synchronisateur de l'horloge en condition constante (expériences précédentes) n'est pas capable en présence du cycle jour/nuit d'entraîner l'horloge circadienne. L'inversion du rythme de température corporelle observée dans ces conditions relève d'un effet de la température ambiante sur la régulation thermique du Dromadaire qui n'implique pas l'horloge.

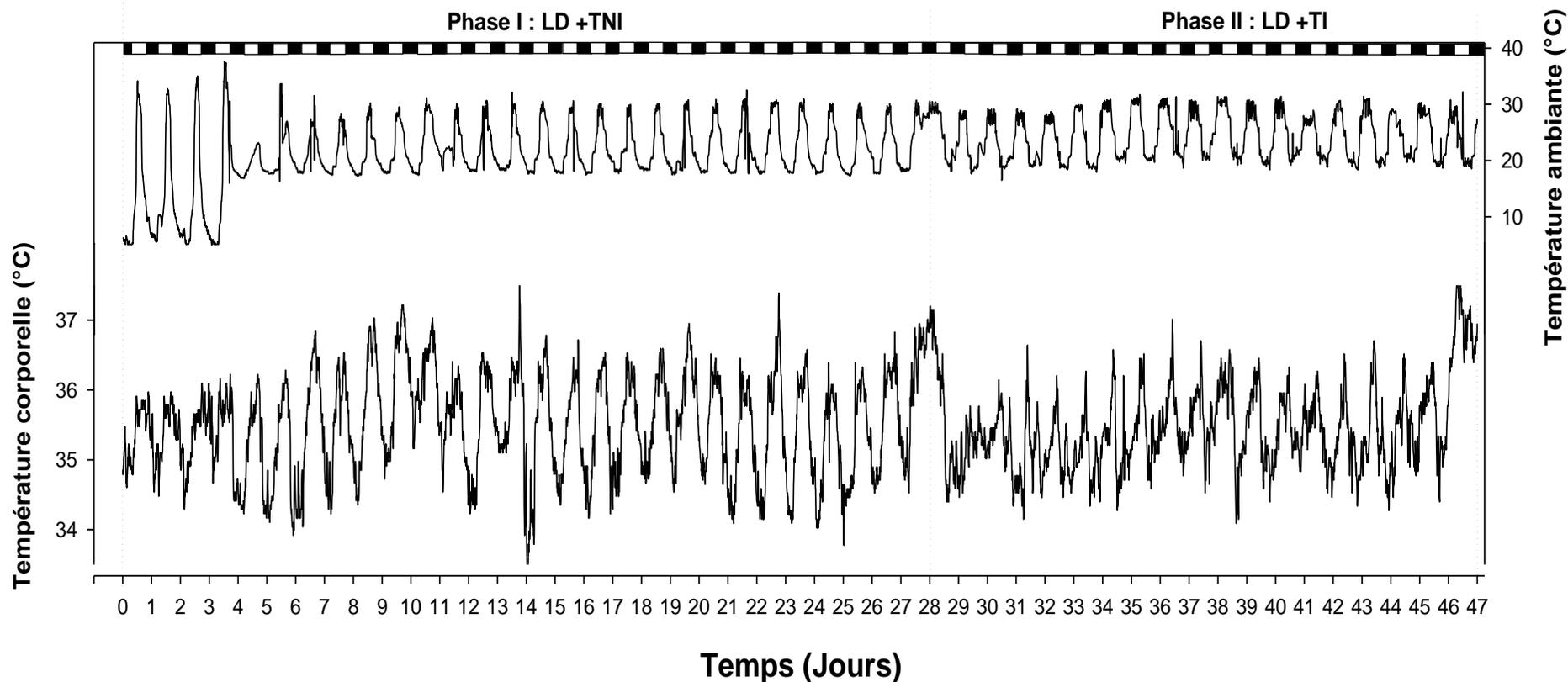


Figure 104 : Evolution de la température corporelle chez une chamelle, dans les conditions de l'expérience 8. Phase I : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante avec un pic de chaleur durant le jour (LD+TNI) ; phase II : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (LD+TI). La température a été relevée en intramusculaire, chaque 10 minutes par le capteur Ibutton et pendant une durée totale de 47 jours consécutifs. La température ambiante sur la courbe supérieure a été relevée avec le même intervalle, les Ibutton étant placés dans l'étable. En haut de la figure, les rectangles noirs et blancs correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus montrent le moment de changement des conditions expérimentales entre la phase I et II.

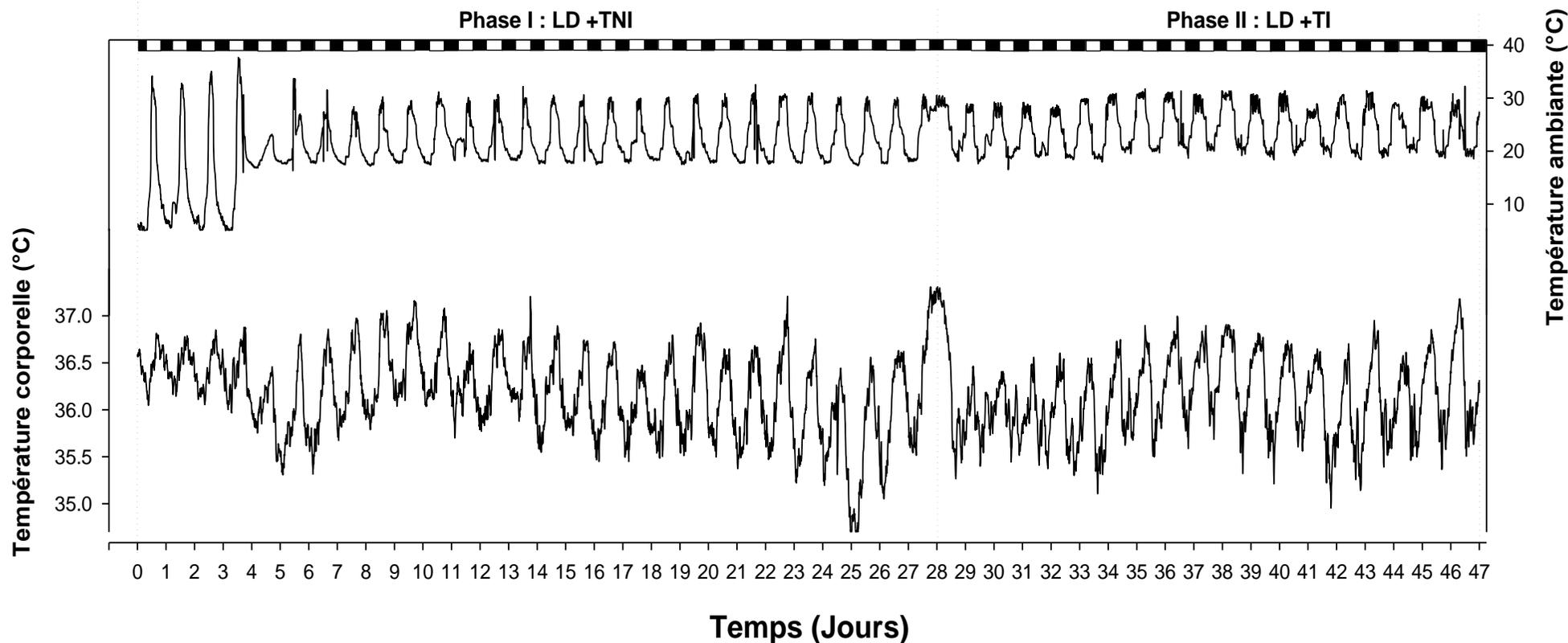


Figure 105 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des sept chamelles du groupe 3, dans les conditions de l'expérience 8. Phase I : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante avec un pic de chaleur durant le jour (LD+TNI) ; phase II : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (LD+TI). Chaque point correspond à la moyenne des sept chamelles. La température a été relevée en intramusculaire, chaque 10 minutes par le capteur Ibutton et pendant une durée totale de 47 jours consécutives. La température ambiante sur la courbe supérieure a été relevée avec le même intervalle avec des Ibutton placés dans l'étable. En haut de la figure, les rectangles noirs et blancs correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus montrent le moment de changement des conditions expérimentales entre la phase I et II.

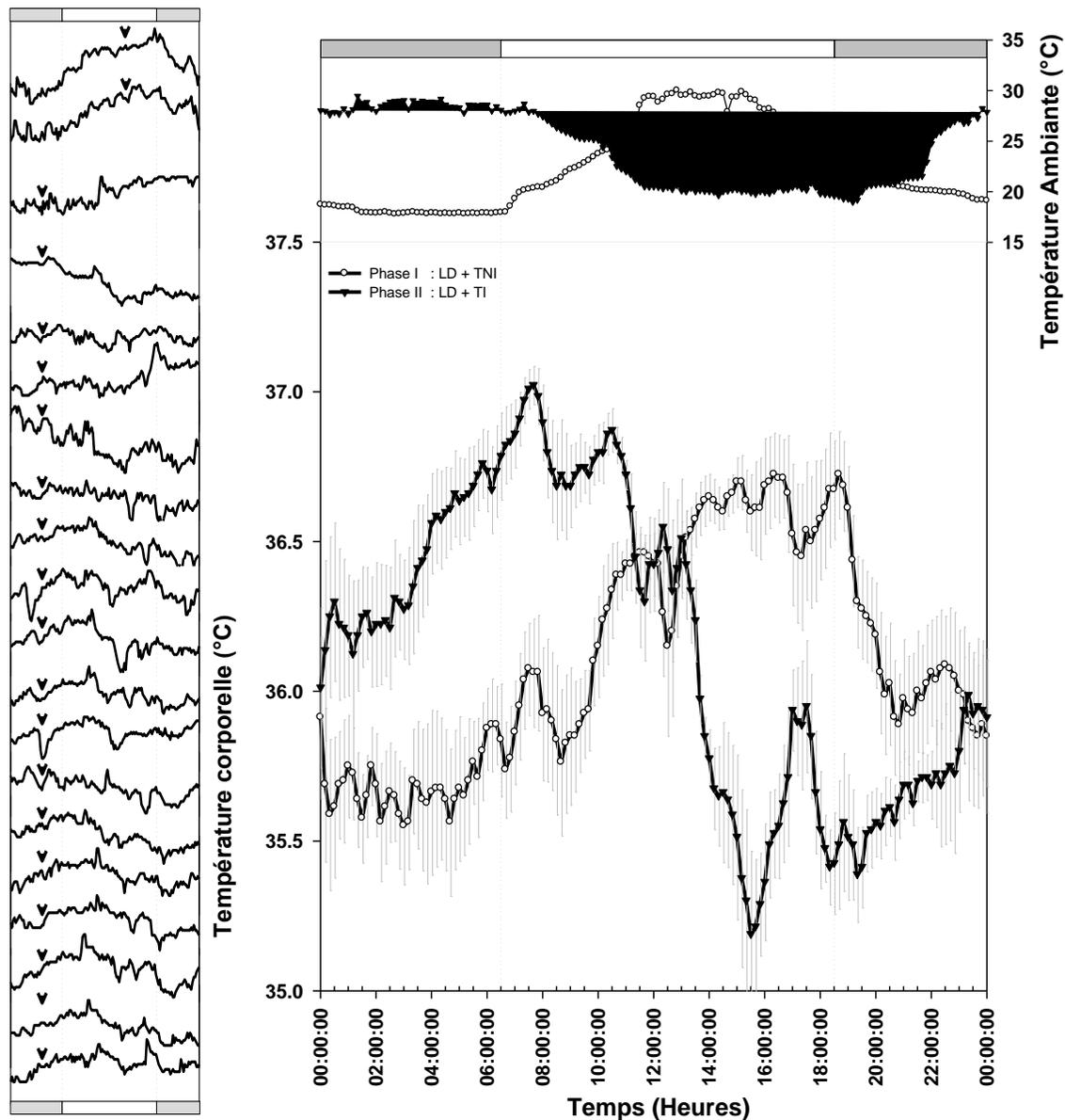


Figure 106 :

A : Courbes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle durant les 2 derniers jours de la phase I suivis des 18 jours de la phase II de l'expérience 8. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté et les rectangles gris et blancs correspondent respectivement aux phases obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité.

B : Courbes moyennes de 24 heures de la température corporelle d'une chamelle représentative. Les courbes sont calculées sur la base des données des 5 derniers jours de chacune des 2 phases expérimentales de l'expérience 8, avec la phase I correspondant à l'application d'un cycle normal de température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour et la phase II représentant l'inversion de ce cycle avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit. Chaque point de la courbe représente la moyenne des températures des 5 derniers jours, enregistrées à un moment (t) de la journée chez cette chamelle. La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle ainsi que les périodes d'obscurité (rectangles gris) et de luminosité (rectangle blanc) du cycle lumière-obscurité.

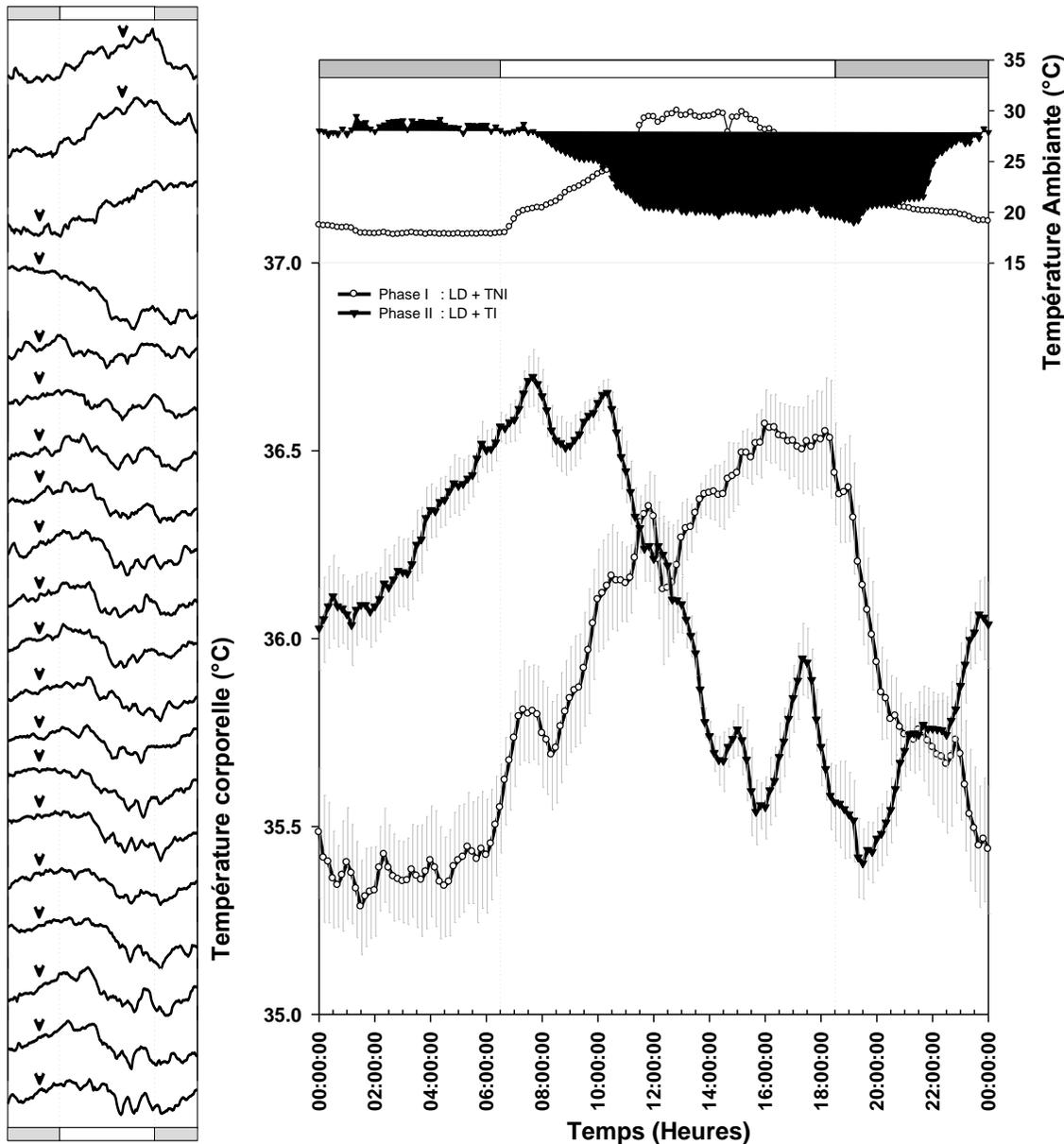
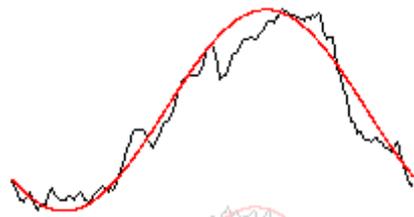


Figure 107 :

A1 : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chamelles durant les 2 derniers jours de la phase I suivis des 18 jours de la phase II de l'expérience 8. Chaque point de la courbe est obtenu en moyennant pour chaque moment (t) la température des 7 chamelles. Chaque ligne correspond à un jour (24h). Les lignes successives correspondent à des jours successifs. Les têtes de flèches indiquent le moment de l'acrophase du cycle de la température ambiante qui a été adopté et les rectangles gris et blancs correspondent respectivement aux phases obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité.

B : Courbes de 24 heures représentant la moyenne de la température corporelle des 7 chamelles. Les courbes sont calculées sur la base des données des 5 derniers jours de chacune des 2 phases expérimentales de l'expérience 8, avec la phase I correspondant à l'application d'un cycle normal de la température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour et la phase II représentant l'inversion de ce cycle avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié de la nuit. Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures des 5 derniers jour, enregistrées à un moment (t) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chamelles pour ce point (t). La courbe moyenne est représentée avec les barres d'erreurs (moyenne \pm SEM). Les courbes de la température ambiante de chaque phase sont représentées en parallèle ainsi que les périodes d'obscurité (rectangles gris) et de luminosité (rectangle blanc) du cycle lumière-obscurité.

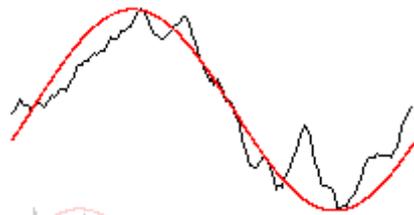


Phase I : LD + TNI

Mean: 35.9, Amplitude: 0.642, Acrophase: 15.08 h
 95% CI: 14.59 to 15.57, Goodness of fit: 0.015 $p < 0.001$
 SIGNIFICANT

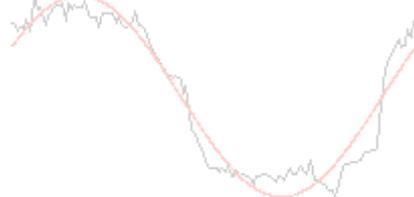


Mean: 22.431, Amplitude: 6.12, Acrophase: 14.45 h, 95%
 CI: 13.84 to 15.06 Goodness of fit: 0.024 $p < 0.001$
 SIGNIFICANT



Phase II : LD + TI

Mean: 36.071, Amplitude: 0.648, Acrophase: 7.15 h
 95% CI: 6.32 to 7.98, Goodness of fit: 0.037 $p < 0.001$
 SIGNIFICANT



Mean: 24.184, Amplitude: 5.244, Acrophase: 4.0 h, 95%
 CI: 3.52 to 4.48, Goodness of fit: 0.015 $p < 0.001$
 SIGNIFICANT

Figure 108 : Régression par la méthode du Cosinor, effectuée sur le rythme moyen de la température corporelle de chaque phase de l'expérience 8. La régression représente la meilleure courbe (en rouge) qui superpose la courbe moyenne de 24h des données de la température corporelle(en noir). Quand un cycle de la température ambiante existe, sa courbe de 24h et sa courbe de régression sont également montrées, en filigrane. Pour chaque régression, les paramètres suivant sont donnés : la moyenne, l'amplitude, l'acrophase et le degré de signification de la régression.

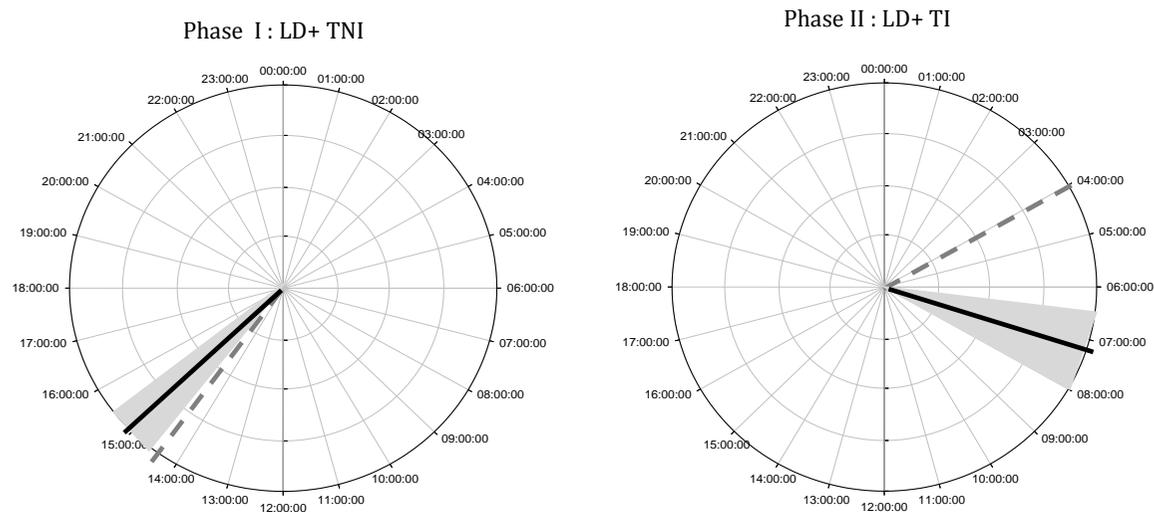


Figure 109 : Représentation schématique des acrophases du rythme de la température corporelle observées durant les deux phases expérimentales de l'expérience 8. Phase I : cycle lumière-obscurité et cycle normal de la température ambiante avec un pic de chaleur durant le jour (LD+TNI) ; phase II : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (LD+TI). Les acrophases sont calculées par la méthode de Cosinor, représentée dans la figure précédente. Chaque cercle représente un horaire d'une journée en 24 heures. L'acrophase moyenne de la température corporelle est indiquée avec une ligne noire limitée par un triangle gris qui représente l'intervalle de confiance à 95% de probabilité. Quand un cycle de la température ambiante existe, son acrophase est représentée par une ligne discontinue grise.

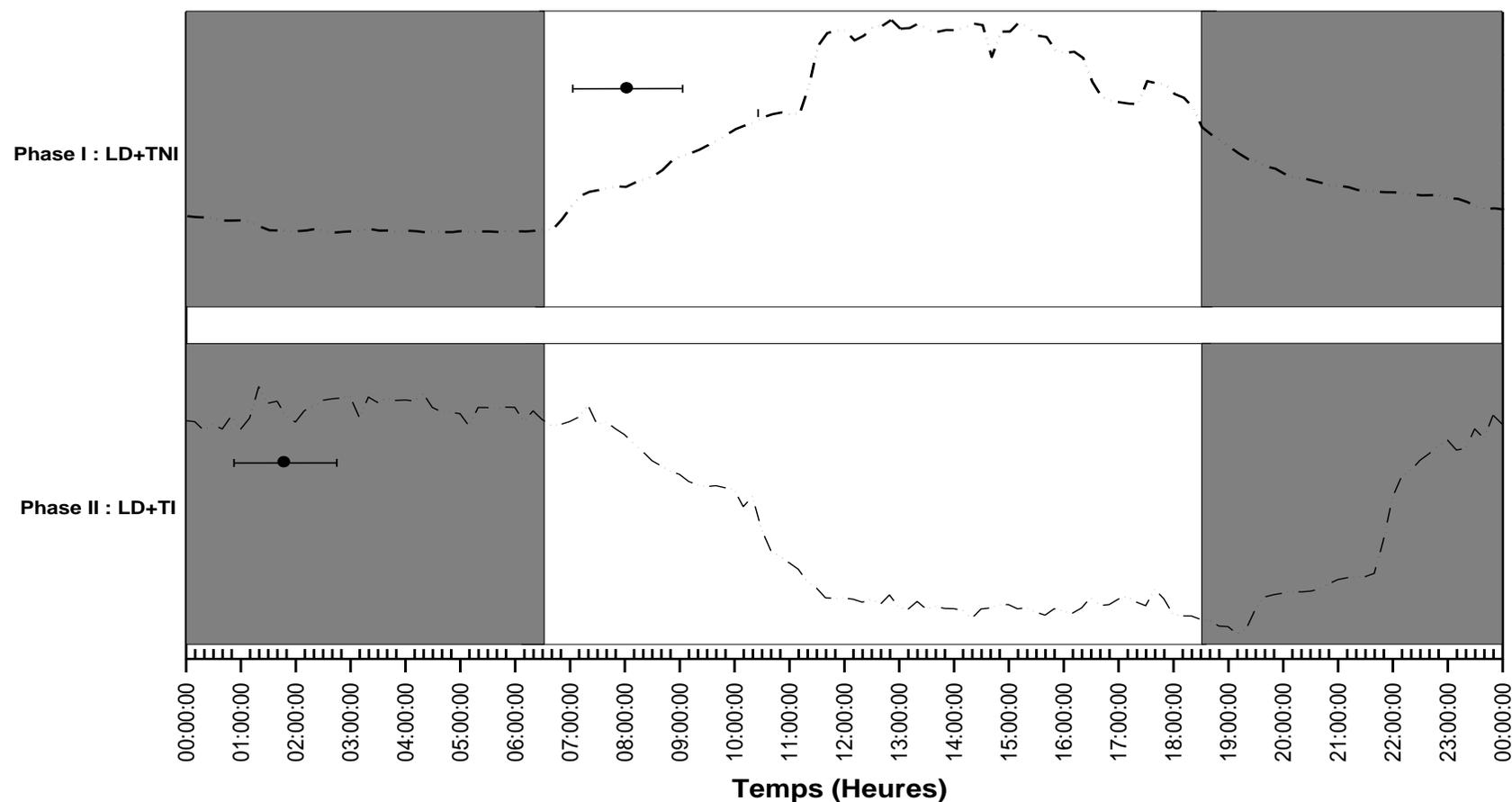


Figure 110 : Point de référence de la phase ascendante du rythme de la température corporelle, calculé par la méthode ascendante pour chacune des phases de l'expérience 8. Phase I : cycle lumière-obscrité et cycle normal de la température ambiante avec un pic de chaleur durant le jour (LD+TNI) ; phase II : cycle lumière-obscrité et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (LD+TI). Le moment du point de référence correspond au moment où la courbe croise durant sa montée journalière, la valeur de la moyenne du rythme. Il est indiqué par un cercle avec la barre d'erreur (SEM). Les rectangles blancs et gris correspondent respectivement à la phase lumineuse et obscure du cycle lumière-obscrité. Les courbes moyennes de 24h du cycle de la température ambiante sont représentées en ligne discontinue.

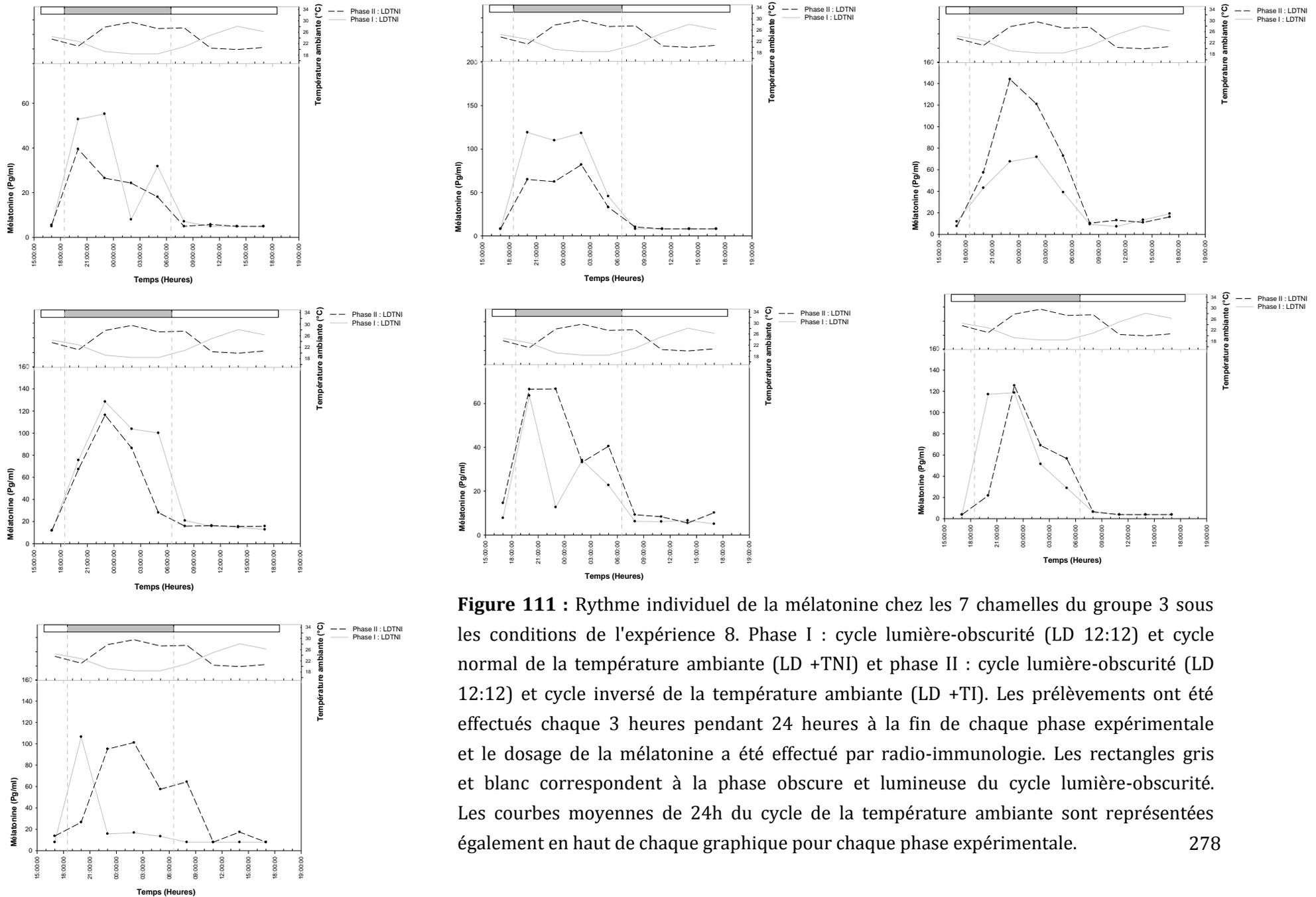


Figure 111 : Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chamelles du groupe 3 sous les conditions de l'expérience 8. Phase I : cycle lumière-obscurité (LD 12:12) et cycle normal de la température ambiante (LD +TNI) et phase II : cycle lumière-obscurité (LD 12:12) et cycle inversé de la température ambiante (LD +TI). Les prélèvements ont été effectués chaque 3 heures pendant 24 heures à la fin de chaque phase expérimentale et le dosage de la mélatonine a été effectué par radio-immunologie. Les rectangles gris et blanc correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les courbes moyennes de 24h du cycle de la température ambiante sont représentées également en haut de chaque graphique pour chaque phase expérimentale.

Discussion :

Dans le présent travail, nous avons fait la démonstration de l'existence d'un rythme circadien de la température corporelle chez le Dromadaire et la réponse de l'horloge endogène à deux zeitgebers : le cycle lumière-obscurité et la température ambiante. Ce rythme est entraîné par les deux facteurs de façon complexe avec une prédominance de l'influence du cycle lumière-obscurité. Comme nous allons le voir plus loin, cette complexité, particulièrement, la réponse passive à la température ambiante pose certaines interrogations par rapport à la fiabilité de l'utilisation de ce rythme seul comme une sortie pour étudier l'horloge chez cette espèce.

En se basant sur les résultats obtenus, nous allons discuter des facteurs internes et externes qui peuvent influencer le rythme de la température corporelle et nous allons aborder ainsi dans l'ordre, les points suivants :

Premièrement, la démonstration faite dans ce travail de la nature circadienne du rythme (existence de l'horloge endogène), ensuite l'influence de facteurs internes comme, l'activité locomotrice et la prise alimentaire. Dans une autre partie, seront discutés les facteurs externes : premièrement le cycle lumière-obscurité comme zeitgeber majeur et par la suite la température ambiante et son implication dans la physiologie de la thermorégulation chez le Dromadaire ainsi que sa particularité chez cette espèce comme un véritable zeitgeber capable d'entraîner l'horloge endogène. Et enfin nous terminerons en discutant les limites des interprétations qui peuvent être faites de l'utilisation de ce rythme pour étudier l'horloge.

1. La nature circadienne du rythme

Nos résultats démontrent, pour la première fois, que le rythme journalier de la température corporelle chez le Dromadaire, persiste sous les conditions constantes (températures constantes, régimes de lumière et d'obscurité constante, expériences 2, 6 (phase I), 7(phase II)) avec une période proche de 24 heures. Cela indique que comme chez les autres Mammifères le rythme de température corporelle est un rythme circadien dépendant de l'horloge. Dans certaines publications sur le Dromadaire les auteurs décrivent un 'rythme circadien de la température corporelle' (Al-Haidary, 2001 ; 2005 ; Al-Faraj et Al-Haidary, 2006...). La terminologie « circadien » réfère à des expériences qui démontrent la persistance du rythme sous des conditions constantes de l'environnement avec une période différente mais proche de 24 heures (ce qui marque l'implication d'une horloge circadienne). A la vue, des protocoles utilisés dans ces publications chez le Dromadaire, le terme approprié doit être 'rythme journalier de la température corporelle'. Cette nature circadienne du rythme

de température circadienne, a été démontrée chez nombreuses espèces, des oiseaux : Poulet (Aschoff, et *al.*, 1973 ; Aschoff et von Saint Paul, 1976), Pigeon (Oshima et Ebihara, 1988)) comme des Mammifères : le Chat (Kuwabara et *al.*, 1986 ; Randall et *al.*, 1985), le Tatou (Harlow et *al.*, 1982), le Rat (Satinoff et *al.*, 1982), le Hamster (Pickard et *al.*, 1984), la Chèvre (Piccione et *al.*, 2003b) le Cheval (Piccione et *al.*, 2002) et chez l'Homme (Aschoff et *al.*, 1967 ; Kriebel, 1974 ; Wever, 1980) et actuellement le rythme journalier de température est souvent utilisé comme sortie circadienne de l'horloge pour étudier les propriétés propres de l'horloge circadienne.

En s'appuyant sur des données bibliographiques, Refinetti et Menaker (1992), définissent l'intervalle de la période circadienne du rythme de la température corporelle entre 22h à 26 h. Comme l'exposition à une lumière constante à un effet propre (réduit la période du rythme endogène chez les espèces diurnes (<24h) et la rallonge chez les nocturnes (>24h) (Aschoff, 1960, 1979) et inhibe l'expression d'autres rythmes comme celui de la sécrétion de mélatonine, la période circadienne est généralement calculée en obscurité totale (Piccione et *al.*, 2002, 2003b). Dans notre travail, la période endogène chez le Dromadaire est supérieure à 24 h (24,5h dans la phase II de l'expérience 2, et 24.2h dans la phase II de l'expérience 7). La différence de 18 min entre les deux périodes relevées relève probablement des groupes utilisés de chamelles, génétiquement différentes. Chez les autres animaux de rente étudiés, la période endogène du rythme est également supérieure à 24h : 24,2h chez le Cheval (Piccione et *al.*, 2002), 24,9h chez la Chèvre (Piccione et *al.*, 2003b). Chez l'Homme la période est également supérieure à 24h entre 24.2 et 25h (Refinetti et Menaker, 1992 ; Campbell et Murphy, 2007).

2. Facteurs internes influençant le rythme : Activité locomotrice et prise alimentaire

L'activité physique, elle même rythmique et dépendante de l'horloge, produit de la chaleur qui *in fine* peut produire des effets de « masquage » sur le rythme étudié ou être responsable du rythme journalier de la température corporelle. Chez l'Homme par exemple, pour utiliser le rythme de température corporelle comme paramètre circadien une procédure dite de constante routine a été mise au point (Murray et *al.*, 1958 ; Winget et *al.*, 1968 ; Marotte et Timbal, 1981 ; Gander et *al.*, 1986). C'est-à-dire que les volontaires restent allongés sur un lit sans mouvement pendant 48 heures ce qui permet, en effet, d'éliminer les effets indirects de la posture ou de l'activité sur la température corporelle. En expérimentation animale ce type de procédure n'est pas envisageable. Les conséquences possible de l'activité sur la température corporelle

doivent être dans la mesure du possible être minimisée. Nous avons pu montrer dans ce présent travail que le rythme de température corporelle existe chez des Dromadaires sévèrement restreints (décubitus forcé : expérience 1) ou modérément restreints (Licol attaché aux mangeoires, expériences 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8). Sans nier des effets potentialisateurs possibles de l'activité, nos résultats montrent que la genèse du rythme n'est pas influencée par l'activité physique. Ce constat a été fait également chez l'Homme (Murray et *al.*, 1958 ; Winget et *al.*, 1968 ; Marotte et Timbal, 1981 ; Gander et *al.*, 1986) et chez plusieurs rongeurs (Grahn et *al.*, 1994 ; Refinetti, 1999)

La prise alimentaire est aussi un facteur externe qui influence le rythme de la température corporelle (Aschoff, 1970). Pour minimiser cet effet nous avons adopté dans certaines expériences le mode séquentiel de distribution de nourriture qui ne donne pas d'information circadienne. L'exemple de l'expérience 2 (Figure 78) montre que le cycle adopté, en 4 rations espacées de 6h, n'influence pas le rythme de la température corporelle et ne serait donc pas responsable de sa genèse. Plusieurs études rapportées chez l'Homme par Aschoff (1970), ont démontré que le rythme de la température corporelle persiste après un jeûne complet (allant jusqu'à 29 jours) et excluant ainsi l'implication de la prise alimentaire dans la genèse de ce rythme. De même, les résultats de Piccione et *al.* (2003b) montrent que le rythme persiste chez la Chèvre sous une privation totale de l'aliment. Si la distribution alimentaire ne génère pas le rythme, elle constitue toutefois, un véritable facteur d'entraînement de (Piccione et *al.*, 2003b) .

3. Facteurs externes influençant le rythme

3.1. *Entraînement du rythme par le cycle lumière-obscurité*

La principale caractéristique des rythmes circadiens, rythme dépendant de l'horloge circadienne, est d'être entrainable par un synchroniseur externe à la période propre du synchroniseur (zeitgeber). En fait ces zeitgebers agissent sur l'horloge elle-même et la période obtenue sur les rythmes étudiés correspond à la période de l'horloge synchronisée. Le zeitgeber le plus puissant connu à ce jour et le plus étudié est le cycle journalier lumière-obscurité qui quelque soit la saison ou quelque soit la latitude est toujours égal à 24 heures. Avec des régimes spécifiques d'alternance jour/nuit compris entre 18 et 27 heures il est possible d'imposer ces périodes à l'horloge circadienne et par là aux rythmes sortis de l'horloge. Pareillement, par une manipulation des phases de la lumière et de l'obscurité (avance ou retard de phase), il est possible de manipuler le fonctionnement de l'horloge. C'est l'ensemble de ces caractéristiques qui définit réellement un rythme circadien dépendant de l'horloge. La démonstration de l'entraînement du rythme par le cycle

lumière-obscurité a été démontré chez la plupart des espèces chez qui l'endogénie du rythme a été démontrée : chez le Rat (Krieger et Hauser, 1978) ; chez les rongeurs : voir la revue de Benstaali et *al.* en 2001 ; chez l'Homme (Aschoff, 1965, 1979 ; Aschoff et *al.*, 1967 ; Honma et *al.*, 1987) ; chez le Cheval (Piccione et *al.*, 2002 ; Murphy et *al.*, 2007). Chez le Dromadaire nous avons montré que le rythme journalier de la température corporelle non seulement, persiste en conditions environnementales constantes avec une période supérieure à 24 h mais que sous l'action de l'exposition à un cycle jour/nuit (Zeitgeber) le rythme de température corporelle est entraîné précisément à 24h. De plus, les résultats de l'expérience 3 et 4 démontrent que l'application d'une avance de phase de 6h sur ce cycle lumière obscurité, entraîne le rythme de la température corporelle qui se synchronise sur le nouvel horaire du cycle. Tout cela démontre que chez le Dromadaire, comme chez les autres Mammifères, le rythme de température corporelle est un rythme circadien dépendant de l'horloge. Le rythme de température corporelle est une « sortie » de l'horloge qui peut donc potentiellement être utilisé pour étudier l'horloge circadienne elle-même.

Connaissant la plasticité remarquable du système de la thermorégulation du Dromadaire face à la déshydratation nous nous sommes interrogés 1) sur le rôle de facteurs internes et 2) sur le rôle d'un facteur externe comme la température ambiante sur l'expression même de notre paramètre, le rythme de température corporelle. Nous nous sommes également interrogés 3) sur le rôle de zeitgeber possible du cycle journalier de température ambiante. Ces interrogations sont nécessaires pour connaître les limites d'utilisation du rythme de température corporelle comme rythme circadien reflétant l'activité de l'horloge.

3.2. Température ambiante : thermorégulation

Dans sa vie quotidienne, en fonction des périodes de sécheresse le Dromadaire passe régulièrement d'un état d'homéothermie à des états de poikilothermie. Une analyse des effets de la température ambiante sur le rythme de température corporelle et ses caractéristiques est donc nécessaire.

Plusieurs études, notamment celle de Schmidt-Nielsen et *al.* en 1957 et Schmidt-Nielsen en 1964 se sont intéressées aux variations de la température corporelle (rectale dans ce cas) chez le Dromadaire. Ces études menées sous des conditions naturelles, ont porté sur la thermophysologie, notamment l'adaptation à la déshydratation, mais sans traiter la composante rythmique de ce paramètre. Nos résultats démontrent que ce rythme répond aux variations de l'environnement. La moyenne générale de la température (moyenne calculé à partir du rythme) est variable selon les conditions de l'environnement. La plus faible moyenne

qui est de $35,86 \pm 0,31^{\circ}\text{C}$ est obtenue sous un environnement naturel avec une température ambiante fraîche de l'hiver : $15,62 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ (phase V de l'expérience 6). La plus élevée est de $38,86 \pm 0,13^{\circ}\text{C}$ et est obtenue sous un environnement naturel avec les températures élevées de l'été (phase IV de l'expérience 4). La moyenne générale du rythme, calculée sous les différentes conditions expérimentales est proche et le plus souvent comprise dans l'intervalle de la température corporelle des Mammifères placentaires rapporté par Cossins et Bowler (1987) et qui est de $36-39^{\circ}\text{C}$. Les valeurs calculées chez le Dromadaire sont inférieures à celle rapportées chez le Cheval, ($38,3^{\circ}\text{C}$ sous une photopériode naturelle et une température ambiante fraîche de 13°C Piccione et *al.*, 2002), chez la Vache ($38,3$ sous une photopériode naturel -LD 15:09- et une température ambiante de 22°C et 28°C : Piccione et *al.*, 2003a) et chez la Chèvre (de $38,4^{\circ}\text{C}$ et $38,9$ suivant les conditions naturelles ou contrôlées de l'environnement, Ayo et *al.*, 1998 ; Igono et *al.*, 1982 ; Jessen et *al.*, 1998 ; Piccione et *al.*, 2003b). Chez le Dromadaire, nos résultats démontrent que suivant les conditions expérimentales, la température corporelle est très variable. Il apparaît de nos travaux que chez le Dromadaire, l'amplitude la plus élevée est observée sous des conditions naturelles de l'environnement avec respectivement une amplitude moyenne du rythme de température corporelle de $2,50 \pm 0,43^{\circ}\text{C}$ pour un écart de température ambiante de 8°C : $18,5-26,6^{\circ}\text{C}$ (expérimentation 1) et de $3,55 \pm 0,28^{\circ}\text{C}$ quand l'écart de température ambiante sous radiation solaire est de 39°C : $21-60^{\circ}\text{C}$ (phase IV expérimentation 4). Dans les expériences où la température ambiante était fixe (condition constante), l'amplitude moyenne du rythme enregistrée était faible ($0,31 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$, pour la phase I de l'expérimentation 6 et $1,18 \pm 0,38^{\circ}\text{C}$ pour la phase II de l'expérimentation 2). Bien que son amplitude soit faible, en présence d'une température fixe (situé dans l'intervalle de neutralité thermique $18-28^{\circ}\text{C}$) le Dromadaire exprime un rythme journalier de température corporelle. Les amplitudes du rythme de la température corporelle rapportées dans le présent travail restent en accord avec les résultats de la littérature chez le Dromadaire. L'amplitude du rythme enregistrée sous des conditions naturelles de l'environnement chez des chamelles bien hydratées, est toutefois plus élevée que celle observée chez les Mammifères domestiques. Par exemple, sous des conditions naturelles de l'environnement (photopériode LD 09:15 et une température ambiante de $13 \pm 1^{\circ}\text{C}$), cette amplitude est de $01,0^{\circ}\text{C}$ ($1,02 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$) chez le Cheval (Piccione et *al.*, 2002), de $0,9^{\circ}\text{C}$ à $1,4^{\circ}\text{C}$ chez la Vache (Araki et *al.*, 1987 ; Piccione et *al.*, 2003a) et de $1,0^{\circ}\text{C}$ chez le Mouton (Bligh et *al.*, 1965). Il est aussi intéressant de noter que chez la Chèvre bédouine, l'amplitude est de $0,7^{\circ}\text{C}$ dans un climat froid (Piccione et *al.*, 2003b) et de $1,3^{\circ}\text{C}$ dans un climat chaud (Jessen et *al.*, 1998).

Nos résultats appuient ceux de Refinetti et Menaker, 1992 qui dans leur tableau comparatif des amplitudes du rythme de la température corporelle chez différentes espèces de mammifère ont indiqué pour le Dromadaire une amplitude supérieure à celle de la plupart des espèces. Toutefois, nos présents travaux montrent qu'il faut être très prudent dans cette approche comparative de l'amplitude du rythme entre les différentes espèces. Nous avons montré en effet que l'amplitude variait avec les conditions environnementales et ces conditions variaient d'une espèce à l'autre pour les valeurs rapportées dans ce tableau de Refinetti et Menaker. Faute d'une standardisation des procédures expérimentales ou de l'utilisation de plusieurs espèces à la fois dans la même expérimentation, il sera difficile d'être précis dans de telles comparaisons. Comme les états de déshydratations sont connus chez le Dromadaire pour induire des changements de la température, il serait essentiel de comparer avec les degrés de variation de cette amplitude du rythme chez des espèces vivant sous les mêmes latitudes que le Dromadaire et dans les mêmes milieux arides. Ceci permettrait de comprendre les mécanismes de régulation thermique sous les états de déshydratations chez cette espèce et d'analyser les relations avec le système circadien. Schmidt-Nielsen et *al.* (1957) ont comparé l'effet de la déshydratation chez le Dromadaire et chez l'Ane. Ils ont constaté que sous les mêmes conditions naturelles, avec une température ambiante de 0 à 15°C, l'amplitude du rythme chez le Dromadaire et chez l'âne pendant l'hiver est de 0,2°C. Pendant l'été, l'amplitude du rythme est aussi identique : 2,0°C chez l'âne et 2,1°C chez le Dromadaire (températures qui oscillent de 25 à 41°C). La déshydratation sous les mêmes températures élevées du désert entraîne une élévation de l'amplitude du rythme chez les deux espèces, 6,2°C à 8°C chez le Dromadaire et 5°C chez l'Ane. Toutefois, les changements induits par la déshydratation chez l'Ane, traduisent une altération de la thermorégulation et un état de décompensation qui se traduit par une mort au bout de 4 jours. Chez le Dromadaire au contraire, l'augmentation de l'amplitude du rythme (6-8°C) est durable (16 jours dans l'essai de Schmidt-Nielsen et *al.* (1957)) et traduit un processus d'adaptation à la déshydratation. Ce processus consiste en un état passager de poïkilothermie (la température corporelle varie dans des degrés incompatible avec la survie chez les espèces « normales »), qui permet au Dromadaire de minimiser les dépenses de l'eau, nécessaires à la lutte contre la chaleur (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957 ; Yagil, 1985). La température corporelle qui augmente pendant le jour correspond à un emmagasinage de la chaleur au lieu d'une dissipation par évaporation. Cette chaleur est gardée passivement jusqu'à son élimination la nuit par un transfert de chaleur passive avec l'air froid. En baissant sa température matinale, le Dromadaire anticipe le stress thermique de la journée et permet ainsi un meilleur

transfert de chaleur par un gradient thermique plus élevée et ainsi un stockage de chaleur dans son corps (Zine Filali, 1991). Ce type de mécanisme est peu compatible avec un rythme de température corporelle dépendant exclusivement de l'horloge circadienne. Cela pose la question chez le Dromadaire des relations exactes entre rythme journalier de la température, environnement et horloge circadienne

3.3. *Le cycle de température ambiante comme un zeitgeber*

Dans l'expérience 2 un déplacement de l'acrophase du rythme de la température corporelle est observé quand il y a passage d'une température ambiante constante à un cycle de température de 24h. Cela oblige à s'interroger sur le rôle du cycle journalier de température comme zeitgeber possible pour l'horloge circadienne du Dromadaire. Les expériences 5, 6, 7 démontrent que le cycle de la température ambiante est capable d'affecter non seulement l'amplitude du rythme de la température corporelle mais aussi le rythme endogène lui-même. En effet, sous une lumière constante LL ou une obscurité constante DD (absence de synchroniseurs photiques), l'application d'un cycle artificielle de la température ambiante de 24h avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour entraîne le rythme de la température corporelle à exactement 24h avec une acrophase en fin de jour. L'inversion de ce cycle de la température ambiante (12h d'avance de phase) entraîne après quelques jours une resynchronisation du rythme à ce nouveau signal extérieur. Après une nouvelle manipulation du cycle de la température ambiante pour revenir au signal précédent (retard de phase), le rythme de température corporelle est ré-entraîné aux nouvelles valeurs en quelques jours. Cet effet est obtenu que l'on soit en LL ou en DD.

L'ensemble de ces résultats montre que chez le Dromadaire, le cycle de la température ambiante affecte non seulement l'amplitude et la phase du rythme de la température corporelle mais peut également imposer sa propre période au rythme et ce en absence du cycle LD. Aschoff en 1951 définit un zeitgeber comme étant un facteur de l'environnement dont la variation cyclique est capable d'imposer sa propre période à un rythme biologique. Il serait donc possible de conclure ici que le cycle journalier de la température ambiante est un synchroniseur (zeitgeber) capable d'entraîner l'horloge circadienne à sa propre période. Toutefois, la particularité du Dromadaire qui présente une régulation particulière de sa température (voir avant) nous oblige à se poser la question non de la réalité du rythme de la température corporelle mais de sa nature. En effet, si les observations faites peuvent correspondre à un entraînement classique de l'horloge par ce zeitgeber particulier, la nature même du paramètre circadien utilisé pour caractériser les propriétés de l'horloge

(la température corporelle) impose une certaine prudence. En effet chez cet animal, un échange passif entre la température ambiante et la température corporelle pourrait tout aussi bien expliquer les résultats précédemment décrits. Pour être certain d'un entrainement de l'horloge il est donc nécessaire dans ce type de protocole, de suivre en parallèle deux paramètres circadiens totalement indépendants et connus pour être des sorties de l'horloge. Ce n'est que si les deux paramètres évoluent parallèlement que nous pourrions parler d'un entrainement de l'horloge. C'est pour répondre à cette interrogation que nous avons suivi chez certains animaux en plus du rythme de la température corporelle, le rythme de mélatonine dans le plasma.

Les résultats des rythmes individuels de la mélatonine sous les phases de l'expérience 7, démontrent que l'inversion du cycle de la température ambiante (dans des conditions de DD) induit en quelques jours une avance de phase du rythme de la température corporelle et du rythme de la mélatonine et ce chez 6 des 7 chamelles étudiées. Nous avons donc démontré chez le Dromadaire et ce pour la première fois, que le cycle de température ambiante est un véritable zeitgeber et qu'il est effectivement capable d'entraîner l'horloge circadienne.

L'entraînement du rythme de la température corporelle sous l'effet d'un cycle de température ambiante semble être unique chez le Dromadaire. Nous n'avons pas pu trouver trace d'un tel phénomène chez une autre espèce de mammifère. Il faut noter toutefois que cet aspect n'a été que très occasionnellement étudié. Dans la littérature, nous ne trouvons que des études qui traitent de l'effet du cycle de la température ambiante sur d'autre rythme, notamment l'activité locomotrice mais vu la relation physiologique entre l'activité et la température il est difficile de tirer des conclusions, même si la question a toujours été sous-jacente. Boissin et Canguilhem (1998) écrivent dans leur ouvrage, **Les rythmes du vivant** : "*Des facteurs autres que la lumière peuvent se comporter comme des zeitgeber. La température est ainsi capable chez les végétaux, les poïkilothermes et même chez certains homéothermes d'entraîner les rythmes biologiques...Mais dans l'ensemble, les variations nycthémerales de la température ne constituent pas un zeitgeber de puissance comparable à l'alternance lumière-obscurité.*". Tokura et Aschoff (1983) ont démontré, chez un primate (macaque) que le cycle de la température ambiante peut entraîner le rythme circadien de l'activité chez quelques animaux mais pas chez tous. Les auteurs ont conclu que le cycle de la température ambiante peut entraîner le rythme circadien de l'activité chez un mammifère homéotherme mais qu'il est un zeitgeber faible. Des résultats similaires ont été obtenus chez d'autres Mammifères (l'Ouistiti (*Callithrix j. jacchus*) : Pálková et al., 1999 ; le Singe-écureuil (*Saimiri sciureus*) : Aschoff et Tokura, 1986 ;

le Spalax : Goldman et *al.*, 1997 ; l'Ecureuil des palmes : Rajaratnam et Redman, 1998) mais le cycle de la température entraîne aussi le rythme circadien de l'activité uniquement chez quelques individus. D'une manière générale un cycle de température ambiante d'une période de 24,0h entraîne le système circadien chez tous les ectodermes (poïkilothermes) alors que chez les endothermique, seules les espèces qui présentent de grandes variations d'amplitude (supérieur à 2°C) journalière ou saisonnière (hétérothermes), semblent être concernées (Rensing et Ruoff, 2002). Cet « entrainement » n'a été étudié qu'avec l'activité locomotrice comme paramètre et n'est observable que chez quelques sujets et avec de grandes différences individuelles. Même si les auteurs concluent que le cycle de température ambiante est un Zeitgeber faible en anglais : "weak Zeitgeber effects", nous devons nous poser la question des limites des interprétations par rapport aux paramètres étudiés, car certaines des observations peuvent résulter d'effets sur le paramètre lui-même et non sur l'horloge.

Nos études sur les effets simultanés des deux synchroniseurs de l'horloge, (cycle de lumière obscurité et cycle de température ambiante) sur les rythmes de température corporelle et de mélatonine permettent de bien définir ce problème de limites des interprétations et de la complexité physiologiques des régulations. Le Dromadaire, un hétérotherme ce qui permet probablement d'expliquer pourquoi à l'opposé des autres Mammifères, le cycle de température ambiante est un vrai zeitgeber capable d'entraîner l'horloge circadienne (voir avant). Ce résultat toutefois n'est observé qu'en l'absence du synchroniseur Jour/nuit. En présence du synchroniseur jour/nuit les résultats obtenus sont différents. Dans ces conditions, l'inversion du cycle de la température ambiante induit également une inversion du rythme de la température corporelle. Cette inversion du rythme se fait en 12-13 jours et s'opère par avance de phase. Le rythme de température ambiante est donc capable d'entraîner le rythme de température corporelle. Comme de plus cette resynchronisation demande plusieurs jours, typique pour les resynchronisations de l'horloge, il serait possible de conclure que le cycle journalier de température ambiante est un synchroniseur (zeitgeber) puissant car même en présence du cycle jour/nuit, l'entrainement de l'horloge serait obtenu. Le cycle de température ambiante serait même un zeitgeber dominant par rapport au cycle jour/nuit. Si cela était le cas, l'horloge circadienne serait entraînée et toutes les sorties de l'horloge devraient, comme le rythme de température corporelle, être entraînées. Ce n'est pas le cas. Le rythme de mélatonine n'est pas entraîné et reste donc synchronisé par le cycle jour/nuit. Dans ces conditions expérimentales (présence d'un cycle jour/nuit), le cycle de température n'est donc pas capable d'entraîner l'horloge circadienne. L'inversion du rythme de température

corporelle observée dans ces conditions relève d'un effet de la température ambiante sur la régulation thermique du Dromadaire qui n'implique pas l'horloge. Cette idée est renforcée par la persistance d'un petit pic du rythme de la température corporelle en phase avec le pic du rythme avant l'inversion, ce qui indique que celui-ci correspond à la composante endogène du rythme qui reste stable et résiste à l'inversion et que le déplacement du grand pic du rythme n'est que le résultat d'un échange passif de la chaleur avec l'environnement. Toutefois, Il serait intéressant de vérifier ces résultats sous des conditions expérimentales différentes, notamment en modifiant le rapport de force entre les deux zeitgebers : diminution de la puissance du cycle LD (100 lux par exemple au lieu de 200 lux) et augmentation de l'amplitude de la température ambiante (15 à 40 °C au lieu de 20 à 30°C).

Ce travail démontre donc la complexité des mécanismes d'entraînement du système circadien avec aussi chez le Dromadaire comme chez les autres Mammifères une dominance forte du cycle jour/nuit comme zeitgeber. Il démontre aussi les limites de certains paramètres utilisés pour suivre les activités de l'horloge. Ces paramètres peuvent être eux-mêmes variables en fonctions des paramètres environnementaux. Les effets multiples du cycle de la température ambiante en sont un bon exemple et doivent imposer l'étude en parallèle de plusieurs sorties de l'horloge pour étudier les mécanismes de synchronisation de l'horloge.

L'effet de la température ambiante semble très important chez le Dromadaire. Le cycle de température ambiante contrôle l'expression du rythme journalier de température corporelle par une action directe sur l'horloge et par une action directe sur la régulation thermique. Ce phénomène qui n'a encore jamais été décrit peut être mis en rapport au biotope désertique de l'animal. Dans le milieu naturel, pour assurer la survie, les diverses fonctions physiologiques de l'animal doivent être parfaitement synchronisées avec les variations journalières de l'environnement (photopériode et température ambiante) qui changent fortement au cours de l'année. Cette combinaison des deux facteurs environnementaux, appliqués en phase (pic de chaleur avec la phase de lumière et pic de fraîcheur avec l'obscurité ce qui correspond aux conditions naturelles) induit une phase stable et un maximum d'amplitude des rythmes circadiens et donc une meilleure flexibilité dans les processus d'adaptation.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La grande majorité des études fonctionnelles sur les rythmes circadiens et saisonniers ont été réalisées chez les rongeurs, même si pour les rythmes saisonniers, le Mouton a été aussi un modèle expérimental très utilisé. Les connaissances acquises sont le plus souvent systématiquement généralisées et cela contribue à une analyse très réductrice de la problématique. Comprendre la physiologie des adaptations et la diversité des processus impliqués demande une approche à la fois globale et comparée. En particulier, des études sur des modèles animaux spécifiques à certains biotopes sont indispensables. C'est dans ce cadre que nous avons entrepris cette étude sur le Dromadaire (*Camelus dromedarius*) un grand mammifère connu pour ses processus physiologiques particuliers d'adaptation au désert. Outre leurs intérêts socio-économiques pour un pays comme le Maroc, ces travaux présentent également de par leur nouveauté (modèle animal et biotope) un intérêt scientifique certain.

A vrai dire, le présent travail s'est inscrit dans une approche encore plus globale qui vise à répondre à certaines interrogations sociétales concernant le contrôle de la saisonnalité de la reproduction chez le Dromadaire. Pour aborder ce problème qui relève des sciences appliquées (zootechnie), nous avons pensé qu'utiliser directement les données obtenues sur le contrôle des rythmes chez les rongeurs et mêmes les ovins risquait de nous entraîner dans une impasse scientifique. La connaissance de base des mécanismes fondamentaux en neurobiologie des rythmes chez cette espèce, est un préalable indispensable à toutes études appliquées. Comme cela a été détaillé dans le manuscrit et repris ci-dessous, notre approche s'est avérée correcte et productrice dans la mesure où des mécanismes physiologiques nouveaux et originaux ont été identifiés chez cette espèce dont le plus surprenant est de loin, la capacité du rythme de température ambiante (condition sous DD) d'entraîner l'horloge biologique (et le rythme de la mélatonine).

Dans ce qui suit nous allons discuter d'abord de la composante circadienne : en parlant des données morphologiques des SCN, de l'entraînement par le cycle lumière-obscurité, par le cycle de la température ambiante et par la suite de l'intégration du message photopériodique par l'étude des variations saisonnières de la sécrétion de la mélatonine.

I. SCN : Données morphologiques

Nos résultats montrent que le rythme journalier de la température corporelle est circadien puisqu'il persiste en conditions constantes avec une période propre différente de 24h. Ceci démontre donc l'existence d'une horloge biologique

chez le Dromadaire. Par lésions cérébrales, par greffes de tissus cérébraux et par approches électrophysiologiques il a été démontré que chez tous les Mammifères cette horloge circadienne est localisée dans les noyaux suprachiasmatiques de l'Hypothalamus (SCN) (Moore et Eichler, 1972 ; Stephan et Zucker, 1972 ; Inouye et Kawamura, 1979 ; Green et Gillette, 1982 ; Groos et Hendricks, 1982 ; Lehman *et al.*, 1987). Nous nous sommes donc attaché à la description de cette structure chez le Dromadaire et ce dans l'ensemble de son environnement hypothalamique. Nos résultats montrent que, par rapport aux autres Mammifères, les SCN chez le Dromadaire présentent plusieurs particularités : 1) Ils sont très long avec une extension rostrale et post chiasmatique 2) Une présence massive de neurones à la tyrosine hydroxylase formant deux populations est notée 3) la détection d'ocytocine dans les parvoneurones de ces noyaux suggère pour ce neuropeptide a un rôle modulateur des neurones pacemakers.

Le SCN, chez le Dromadaire est très long et se divise en trois parties : le SCN rostral, nu et rétrochiasmatique. Le SCN nu, caractérisé par sa localisation à la base du 3V et dorsalement au chiasma optique, est homologue au noyau suprachiasmatique des rongeurs et de plusieurs Mammifères (Spiegel et Zweig, 1917, cités par Suburo et Pellegrino de Iraldi en 1969 ; Bleier *et al.*, 1979 ; Van Den Pol, 1980). Le SCN rostral est en position extra-hypothalamique sous forme, d'un, puis de deux tubercules, sous l'*organum vasculosum de la lamina terminalis* (OVLT) et le récessus supra-optique (SoR). Le SCN rétrochiasmatique, lui, s'étend largement en arrière du chiasma optique. Plusieurs neuropeptides ont été identifiés dans les neurones des SCN du Dromadaire, notamment ceux qui semblent jouer un rôle important dans le fonctionnement du pacemaker circadien et qui régulent l'activité de l'horloge par la lumière notamment l'AVP et le VIP. Ces neurones présentent de grandes similitudes avec ceux retrouvés chez les autres espèces de Mammifères (Vandesande *et al.*, 1975 ; Vandesande et Dierickx, 1975 ; Tillet *et al.*, 1989 ; Kikusui *et al.*, 1997 ; Card *et al.*, 1981 ; Stopa *et al.*, 1984 ; Cassone *et al.*, 1988 ; Tessonnaud *et al.*, 1994). Les neurones à VIP sont connus pour leurs afférences rétiniennes directes (Moore, 1973 ; Cassone *et al.*, 1988 ; Ibata *et al.*, 1989 ; Abrahamson et Moore, 2001), et leur aptitude à intégrer et à transmettre le signal lumineux et l'information photopériodique vers les neurones à AVP (lieu du pacemaker) régulant ainsi l'activité de l'horloge par la lumière (Jacomy *et al.*, 1999).

Ce qui caractérise et différencie les SCN du Dromadaire c'est la présence de neurones oxytocinergiques et surtout d'un très grand nombre de neurones contenant de la TH :

Les neurones à OT sont localisés rostralement, en position ventrale, ensuite ils deviennent externes en position latérale. Ils appartiennent au système parvocellulaire connu pour son rôle dans la neuromodulation centrale (Epelbaum, 1995). Ceci suggère un rôle de l'ocytocine des SCN, dans la modulation centrale, en particulier dans le fonctionnement de l'horloge. Un tel rôle rappelle celui du VIP (Jacomy et *al.*, 1999).

Les neurones à TH, en très grand nombre dans les SCN du Dromadaire, est une observation nouvelle. Ces neurones se repartissent en deux populations : des magnoneurones ventraux et des parvoneurones occupant le corps du noyau. Les magnoneurones à TH projettent vers la population à VIP de ce même noyau. Ce genre de projections pourraient intervenir dans la régulation de l'activité de modulation des rythmes circadiens et qui est jouée par le VIP (Battaglia et *al.*, 1995). Par ailleurs, Les magnoneurones à TH du SCN du Dromadaire projettent également vers la 2^{ème} population à TH, formée par des parvoneurones occupant le corps du noyau. Toutefois, la présence de neurone à TH n'est pas exclusive aux SCN du Dromadaire. Chez le Hamster Syrien, de tels neurones ont été décrits dans la partie ventrale des SCN et envoient également des fibres vers le corps du noyau (Novak et Nunez, 1998). Aujourd'hui nous ne pouvons pas dire si chez le Dromadaire, ces neurones sont des neurones catécholaminergiques ou des neurones non-monoaminergique (sécrétant des traces amines). Un phénotypage précis de ces neurones est une perspective précise de ce travail. De même, Il sera aussi intéressant de compléter ce travail par une étude des projections rétiniennes sur les SCN. (Phénotypage des neurones cibles) et à partir de là entreprendre une étude sur les variations saisonnières du contenu neuropeptidergique des SCN et de l'hypothalamus dans son ensemble chez le Dromadaire.

Les SCN du Dromadaire contiennent, les phénotypes cellulaires, (à savoir les neurones à VIP et VP) connus chez les autres Mammifères pour être impliqués dans la réception, l'intégration du message lumineux et la distribution (intra-noyau) du message circadien. Ils contiennent des neurones à OT et d'autres à TH. Aujourd'hui leur rôle est totalement inconnu mais le déterminer sera une priorité pour comprendre le fonctionnement circadien chez cette espèce.

Dans les SCN du Dromadaire de nombreuses afférences nerveuses, notamment comme chez les autres Mammifères à NPY, 5HT et à Met-enk ont été identifiées. Les fibres NPYergiques en provenance de l'IGL (Card et Moore, 1989 ; Morin et *al.*, 1992 ; Jacob et *al.*, 1999 ; Menet et *al.*, 2001) sont en contact directe avec les neurones à VIP (Ibata et *al.*, 1988 ; François-Bellan et Bosler, 1992) et sont impliquées dans les mécanismes de synchronisation non photique (Challet et *al.*, 1996, 1997 ;

Juhl et *al.*, 2007). Toutefois, si cette voie d'entraînement par l'IGL est bien démontrée chez les rongeurs (Moore et *al.*, 1984 ; Ueda et *al.*, 1986 ; Sabatino et *al.*, 1987 ; Lakhdar-Ghazal et *al.*, 1995b ; Abrahamson et Moore, 2001) elle reste à préciser chez les autres espèces de mammifère. Chez les primates, si un complexe de neurones à NPY (le noyau prégeniculé), équivalent à l'IGL des rongeurs, a été démontré, aucune efférente vers les SCN n'a été trouvée (Moore, 1989 ; Chevassus-au-Louis et Cooper, 1998). Nous avons montré que ce plexus de fibres existe dans les SCN du Dromadaire. Déterminer l'origine de ces fibres est indispensable avant d'aborder leur rôle exact dans les processus de synchronisation. Des études combinant l'immunohistochimie et le traçage neuronal, devraient nous permettre cette détermination.

Des fibres 5-HTergiques sont retrouvées massivement dans les SCN du Dromadaire comme dans ceux des autres Mammifères. Ces afférences 5-HTergiques sont connues chez de nombreux rongeurs, pour être importantes dans la transmission et l'intégration des stimuli non-photique. Bien caractérisée chez le Hamster Syrien, ce contrôle sérotoninergiques de l'horloge se fait par une projection directe des noyaux du raphé médian vers le SCN et d'autre part par une voie indirecte à partir d'une projection des noyaux du raphé dorsal vers l'IGL (Azmitia et Segal, 1978 ; Meyer-Bernstein et Morin, 1996 ; Hay-Schmidt et *al.*, 2003 ; Vrang et *al.*, 2003) qui lui-même projette sur les SCN (fibres NPYergiques).

Les SCN du Dromadaire sont aussi caractérisés par une grande densité de fibres à Met-enk. Toutefois, ceci n'est pas exclusif à cette espèce. Une telle observation a été également faite chez le Mouton (Tillet et *al.*, 1989 ; Tessonnaud et *al.*, 1994) la Souris (Abrahamson et Moore, 2001), et le Hamster doré (Morin et *al.*, 1992). Chez ce dernier, ces fibres proviennent des neurones situés dans l'IGL (Morin et Blanchard, 1995). Ces neurones à Met-enk, sont les seuls dans l'IGL à être activés par la lumière et à recevoir une innervation rétinienne (Juhl et *al.*, 2007). Ils seraient impliqués de la transmission de l'entraînement photique de l'horloge. Un tel entraînement par l'IGL a été démontré par plusieurs études lésionnelles (Harrington et Rusak, 1986 ; Pickard et *al.*, 1987; Edelstein et Amir, 1999).

En conclusion générale, les SCN du Dromadaire sont caractérisés par une richesse des afférences nerveuses. Ceci est important dans la mesure où le Dromadaire dans son biotope est soumis à de très nombreux signaux synchroniseurs extérieurs. Toutefois, nos connaissances actuelles sont encore trop parcellaires pour aller plus loin dans nos hypothèses. L'identification des structures dans le cerveau du Dromadaire qui se projettent effectivement sur les SCN est donc une action prioritaire d'autant plus que dans ce travail nous avons

expérimentalement démontré qu'à côté de la lumière, le rythme de température ambiante est un excellent synchroniseur.

II. Entraînement par le cycle lumière obscurité

1. Le rythme de mélatonine

Après sa synthèse, la mélatonine, n'est pas stockée dans la glande pinéale, elle est immédiatement libérée dans la circulation générale et très rapidement métabolisée au niveau du foie par une 6-hydroxylation. Comme sa durée de vie est très courte (environ 20 minutes), le rythme du taux de MEL circulante reflète précisément le rythme de sa synthèse dans la pinéale. Et comme le rythme de sa synthèse est généré par le SCN (lui-même synchronisé à 24 heures par le cycle jour/nuit) il représente un signal hormonal efférent de l'horloge qui définit la « nuit biologique » (Pévet, 2007). De ce simple fait, la MEL est une hormone clef pour traduire l'information photopériodique et elle est d'une grande importance pour les analyses du système circadien notamment dans notre étude qui vise à vérifier l'entraînement de l'horloge par les facteurs de l'environnement.

Les concentrations plasmatiques de la mélatonine ont été étudiées dans différents essais de cette étude et les résultats démontrent que ces concentrations augmentent fortement et rapidement après le coucher du soleil pour atteindre des niveaux élevés dans les 30 min qui suivent. Par ailleurs, l'application d'un créneau de lumière au milieu de la nuit entraîne une baisse rapide des concentrations plasmatiques de la mélatonine pour atteindre les niveaux de base observés durant le jour (à la limite de la détection de 10pg/ml) et le retour à l'obscurité engendre une ré-augmentation rapide et immédiate de ces concentrations. Ces résultats démontrent que le Dromadaire semble avoir les mêmes réponses que chez les autres ongulés étudiés (Ravault et Chesneau, 1996 ; Vivien-Roels et *al.*, 1999). Cette réponse rapide à la lumière suggère que la sécrétion de la mélatonine dépend d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène *Aa-nat* au lieu d'une régulation transcriptionnelle, comme celle observée chez les rongeurs (Roseboom et Klein, 1995 ; Foulkes et *al.*, 1996). Cette hypothèse a été vérifiée chez le Dromadaire, et la comparaison quantitative du marquage d'hybridation de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale n'a montré aucune différence significative entre les niveaux d'ARNm du jour et de la nuit. Ces observations suggèrent que dans la glande pinéale du Dromadaire, le gène *Aa-nat* est constitutivement exprimé le long de la journée, et que sa transcription ne dépend pas de la décharge nocturne de la noradrénaline. Ce type de régulation a été rapportée dans la glande pinéale

d'autres Mammifères, comme le Mouton (Coon et *al.*, 1995 ; Johnston et *al.*, 2004), la Vache (Craft et *al.*, 1999), les Primates (Coon et *al.*, 2002) et l'Homme (Coon et *al.*, 1996 ; Ackermann et *al.*, 2006).

2. Rythme de la température corporelle

Le rythme journalier de la température corporelle chez le Dromadaire, persiste sous les conditions constantes (températures constantes, régimes de lumière et d'obscurité constante, expériences 2, 6 (phase I), 7(phase II)) avec une période proche de 24 heures. Ce résultat démontre clairement et pour la première fois, que ce rythme chez le Dromadaire est un rythme circadien dépendant de l'horloge.

La période circadienne qui est généralement calculée en obscurité totale (Piccione et *al.*, 2002, 2003b) est dans notre travail supérieure à 24 h (24,5h dans la phase II de l'expérience 2, et 24.2h dans la phase II de l'expérience 7). Chez le Dromadaire nous avons montré que le rythme journalier de la température corporelle non seulement, persiste en conditions environnementales constantes avec une période supérieure à 24 h mais que sous l'action de l'exposition à un cycle jour/nuit (Zeitgeber) le rythme de température corporelle est entraîné précisément à 24h. De plus, les résultats de l'expérience 3 et 4 démontrent que l'application d'une avance de phase de 6h sur ce cycle lumière obscurité, entraîne le rythme de la température corporelle qui se synchronise sur le nouvel horaire du cycle. Tout cela démontre que chez le Dromadaire, comme chez les autres Mammifères, le rythme de température corporelle est un rythme circadien dépendant de l'horloge. Le rythme de température corporelle est apparemment chez le Dromadaire une « sortie » de l'horloge. La question est de savoir s'il est possible de l'utiliser pour étudier les propriétés de l'horloge circadienne.

III. Entraînement non photique par le cycle de la température ambiante

Dans ce travail nous avons démontré l'existence d'un entraînement non photique de l'horloge en utilisant le cycle de la température ambiante comme zeitgeber. Cette démonstration a été faite tout d'abord en constatant dans les expériences 5, 6, 7, que le cycle de la température ambiante est capable d'affecter non seulement l'amplitude du rythme de la température corporelle mais aussi le rythme endogène lui-même. En effet, en absence de synchroniseurs photiques (régime LL ou DD), le rythme de la température corporelle est entraîné à exactement 24h par l'application d'un cycle artificielle de la température ambiante d'une période 24h et avec un pic de chaleur durant la 2^{ème} moitié du jour. L'inversion de ce cycle de la température

ambiante (12h d'avance de phase) entraîne après quelques jours une resynchronisation du rythme à ce nouveau signal extérieur. Le retour au signal précédent du cycle (retard de phase), engendre un réentraînement du rythme de la température corporelle. Le suivie en parallèle du rythme de la mélatonine dans le plasma : un autre paramètre circadien connus pour être une sortie de l'horloge, montre que l'inversion du cycle de la température ambiante (dans des conditions de DD) induit en quelques jours une avance de phase du rythme de la mélatonine (et du rythme de la température corporelle) et ce chez 6 des 7 chamelles étudiées. Nous avons donc démontré chez le Dromadaire et ce pour la première fois chez un mammifère, que le cycle de température ambiante est un véritable zeitgeber et qu'il est effectivement capable d'assurer un entraînement non photique de l'horloge circadienne. Ceci doit être directement relié au type de thermorégulation de cette espèce : en effet, le Dromadaire est un hétérotherme capable de varier sa température dans un intervalle de 8°C (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957 ; Yagil, 1985) ce qui permet probablement d'expliquer pourquoi à l'opposé des autres Mammifères, le cycle de température ambiante est un vrai zeitgeber capable d'entraîner l'horloge circadienne. Toutefois, ce résultat n'est observé qu'en l'absence du synchroniseur jour/nuit. En présence du synchroniseur jour/nuit, les résultats obtenus sont différents : Dans ces conditions, l'inversion du rythme de la température corporelle est la conséquence d'un entraînement passif induit par l'inversion du cycle de la température ambiante. En effet, celle-ci ne modifie pas le rythme de la mélatonine et donc n'entraîne pas l'horloge circadienne en présence d'un cycle jour/nuit. Ce travail démontre donc la complexité des mécanismes d'entraînement du système circadien chez le Dromadaire et les limites d'utilisation de rythme de la température corporelle seul comme une sortie d'horloge comme c'est le cas chez les rongeurs. Il y'a là une belle démonstration de l'importance de multiplier les modèles biologiques et de reconsidérer toujours les fondements de neurobiologie des rythmes pour chaque espèce.

L'effet de la température ambiante semble très important chez le Dromadaire. Le rythme de la température corporelle (amplitude et phase) chez cette espèce est le résultat de deux composantes contrôlées par le cycle de température ambiante. La première exprime la réponse de la régulation thermique et la deuxième est le résultat d'une action directe sur l'horloge. Ce phénomène qui n'a encore jamais été décrit peut être mis en rapport avec le biotope désertique de l'animal. La combinaison des deux facteurs environnementaux, appliqués en phase (pic de chaleur avec la phase de lumière et pic de fraîcheur avec l'obscurité ce qui correspond aux conditions naturelles) induit une phase stable et un maximum d'amplitude des rythmes circadiens et donc une meilleure flexibilité dans les processus d'adaptation. Il est connu que chez

le Dromadaire, la déshydratation entraîne un état de poïkilothermie et une variation de la phase et de l'amplitude (6 à 8°C en 24h) du rythme de la température corporelle dans des intervalles mortels chez les autres Mammifères. Le Dromadaire devient donc plus sensible à la température ambiante, il serait donc intéressant d'étudier le comportement de l'horloge circadienne sous des situations de déshydratation où la composante de thermorégulation et de survie générale de l'animal l'emporte.

IV. Saisonnalité de reproduction et intégration du message photopériodique

Comme nous l'avons signalé au début de ce document, le Dromadaire présente une activité sexuelle saisonnière, qui correspond dans le contexte marocain à la période allant de mi-novembre à mi-avril (80 à 90% des saillies, Sghiri et Driancourt, 1999). La gestation dure 12 à 13 mois et de ce fait, les mises bas sont regroupées entre décembre et mars (MADRPM, 1998). Les performances de cette reproduction saisonnière sont très faibles avec globalement un chameleon chaque 3-4 ans. Dans les faits, une femelle qui n'est pas pleine ou qui a avorté durant une saison doit attendre toute une saison (12 à 13 mois) pour être saillie de nouveau. De là découle l'importance d'un contrôle adéquat de cette saisonnalité, comme cela est déjà pratiqué chez les ovins et les caprins. Ce contrôle doit passer obligatoirement par l'identification de ou des facteurs de l'environnement qui contrôlent cette saisonnalité de la reproduction. En réalité ces facteurs ne sont pas encore définis. Certaines variations de l'environnement, telles que les précipitations, la température ambiante et l'humidité ont été suggérées comme étant des facteurs qui pouvaient être incriminés. Toutefois, ces hypothèses n'ont pas encore fait l'objet d'études rigoureuses. L'implication de la disponibilité alimentaire a été également suggérée mais, là aussi, nous manquons d'analyses convaincantes (Wilson, 1984 ; Cristofori et *al.*, 1986). La photopériode courte a été souvent considérée comme le facteur externe qui contrôle ce rythme saisonnier chez le Dromadaire (Musa et *al.*, 1993). Dans le présent travail, nous avons démontré que la durée de la sécrétion de la mélatonine, calculée du coucher au lever du soleil, montre une parfaite concordance avec la durée de la nuit astronomique et ce chez tous les Dromadaires et au cours des quatre saisons. Le moment à la demi-montée du pic est significativement retardé (environ 2 heures) au solstice d'été par rapport à celui d'hiver, ce qui exprime les changements de la durée de la nuit entre l'hiver et l'été. Il est actuellement bien établi expérimentalement que c'est par la variation de la durée du pic nocturne de mélatonine, que l'information photopériodique est lue par le système nerveux central et par les organes périphériques (Bartness et *al.*, 1993 ; Pévet, 2003). Cette 'Hypothèse de 'la Durée' a été construite

sur un ensemble de travaux chez les hamsters et les ovins, chez lesquels, les effets d'une photopériode courte et longue ont été testés par infusion de la mélatonine (Carter et Goldman, 1983 ; Pévet et *al.*, 2002). Le Dromadaire vivant dans le désert marocain à des latitudes de 27°50'N, 13°12'O, est donc capable par l'intermédiaire des variations de la durée de sécrétion nocturne de la mélatonine d'intégrer les changements photopériodiques dans cette région du monde. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle chez le Dromadaire, la photopériode serait aussi un facteur important pour la synchronisation de la fonction de reproduction avec les saisons. Toutefois, il serait imprudent de considérer la photopériode comme unique facteur de l'environnement responsable de l'intégration des changements saisonniers, surtout que nous avons démontré, certes sous des conditions expérimentales d'obscurité constante, que le rythme de la mélatonine est entraîné par la température ambiante. Or le message saisonnier est construit sur la base d'un message circadien et un rôle même partiel de la température ambiante ne peut être désormais écarté. Il a été démontré depuis deux décennies que la mélatonine véhicule l'information des changements photopériodiques. Il a été également suggéré que le 5-Methoxytryptophol (5-MTL) un autre composé indolique synthétisé par de la pinéale, pouvait véhiculer les informations sur les changements de la température ambiante (Vivien-Roels et Pévet, 1983). Il a été même démontré que chez les vertébrés sensibles aux variations de la température de l'environnement, notamment les poïkilothermes, un effet des variations annuelles de la température ambiante (défini par Lofts (1975) comme thermoperiodisme,) sur la saisonnalité de reproduction existe et que cet effet est plus puissant quand il peut être combiné à la photopériode (Vivien-Roels et Arendt, 1983 ; Vivien-Roels et Pévet, 1983). Chez le Dromadaire, espèce dont la composante circadienne et hormonale (mélatonine) est entraînée par la température ambiante, il est désormais indispensable d'intégrer et de prendre en considération ce facteur dans toute étude du système circadien et même saisonnier. Il serait aussi intéressant d'entreprendre par exemple quelques études relatives à ce zeitgeber, notamment son impact sur la saisonnalité de reproduction et sur les variations saisonnières des indoles de la pinéale notamment la mélatonine et le 5ML.

En conclusion, le travail présenté dans cette thèse de doctorat a permis de définir les connaissances de base sur la morphologie hypothamique et d'élaborer les principes de la réponse du système circadien à l'environnement chez le Dromadaire, un modèle animal qui n'a été jamais étudié auparavant dans ce cadre. Ce travail nous a aussi permis de souligner l'importance de l'approche comparative pour l'étude des mécanismes physiologiques impliqués dans le contrôle des rythmes biologiques. Il a permis également de souligner l'intérêt

des recherches sur des modèles animaux présentant des adaptations particulières à leurs biotopes, ce qui peut être une chance pour la communauté des biologistes dans des pays comme le Maroc.

Il ressort également de ce travail que nous devons pour l'étude des rythmes circadiens être d'une très grande rigueur expérimentale. Le rythme de la température corporelle est une sortie de l'horloge qui permet d'étudier expérimentalement les propriétés de l'horloge circadienne. Ceci a été réalisé à grande échelle pour les rongeurs de laboratoire. Nos travaux toutefois montrent que la situation est plus complexe et qu'un rythme considéré comme une sortie de l'horloge ne l'est que dans certaines conditions environnementales et pas dans d'autres. Ceci montre les limites de l'utilisation d'un seul paramètre sortie de l'horloge, pour analyser les propriétés de l'horloge. L'utilisation en parallèle de plusieurs sorties de l'horloge est une nécessité. Dans le présent travail c'est par l'étude parallèle du rythme de la mélatonine que nous avons pu valider ou infirmer les résultats obtenus avec la température corporelle.

Ce travail, malgré les nombreux résultats obtenus ne constitue qu'une ébauche pour la compréhension de la neurobiologie des rythmes chez le Dromadaire, surtout si on considère que cet animal alterne entre des états d'homéostasie et de poïkilothermie. Toutefois il démontre en terme de zootechnie vétérinaire, que la prise en compte de la température ambiante comme un facteur environnemental d'importance est nécessaire pour les études sur les espèces de rente des milieux arides et chauds.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abebe W., Getinet A.M. and Mekonnen H.M. (2002). Study on live weight, carcass weight and dressing percentage of Issa camels in Ethiopia. *Revue Méd Vét* 153 (11), 713-716.
- Abrahamson E.E. and Moore R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916(1-2), 172-191.
- Achaaban M.R., Forsling M.L., Ouhssine A. and Schroter R.C. (1992). Plasma AVP and water balance in camels subjected to dehydration and rehydration in hot dry and hot humid environments. *Proc 1st Int Camel Conf UAE*, 297-299.
- Ackermann K., Bux R., Rüb U., Korf H.W., Kauert G. and Stehle J.H. (2006). Characterization of human melatonin synthesis using autoptic pineal tissue. *Endocrinology* 147, 3235-3242.
- Adamsons K., Engel S.L., Van Dyke H.B., Schmidt-Neilsen B. and Schmidt-Neilsen K. (1956). The distribution of oxytocin and vasopressin (antidiuretic hormone) in the neurohypophysis of the camel. *Endocrinology* 58(2), 272-278.
- Aguilera G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15 (4), 321-350.
- Albers H.E., Stopa E.G., Zoeller R.T., Kauer J.S., King J.C., Fink J.S., Mobtaker H. and Wolfe H. (1990). Day-night variation in prepro vasoactive intestinal peptide/peptide histidine isoleucine mRNA within the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 7(1), 85-89.
- Albus H., Vansteensel M.J., Michel S., Block G.D. and Meijer J.H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol* 15(10), 886-893.
- Al-Faraj A. and Al-Haidary A. (2006). Measurement and simulation of camel core body temperature response to ambient temperature. *Int J Agri and Biol. Pakistan* 4, 531-534.
- Al-Haidary A. (2001). Telemetric Monitoring of Core Body Temperature of Arabian Camel Under Saudi Arabia Conditions. *Res Bult-Res Cent Coll of Agri King Saud Univ* 108, 5-14.
- Al-Haidary A. (2005). Effect of dehydration on core body temperature of young Arabian camels (*Camelus dromedaries*). *J of King Saud Univ* 1, 1-7.
- Alonso G. and Assenmacher I. (1981). Radioautographic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat. *Cell Tissue Res* 219 (3), 525-534.
- Alonso G. (1988). Effects of colchicine on the intraneuronal transport of secretory material prior to the axon: a morphofunctional study in hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. *Brain Res* 453(1-2), 191-203.
- Anderson D.E., Silveira F. and Grubb T. (1999). Effects of venipuncture and correlation of plasma, serum and saliva cortisol concentration with transportation stress in camelids. *J Camel Pract Res* 6, 249-254.
- Antoni F.A., Palkowitts M., Makara G.B., Linton E.A., Lowry P.J. and Kiss J.Z. (1983). Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamoinfundibular tract. *Neuroendocrinology* 36(6), 415-432.
- Antoni F.A. (1993). Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* 14(2), 76-122.
- Antonopoulos J., Karamanlidis A.N., Papadopoulos G.C., Michaloudi H., Dinopoulos A. and Parnavelas J.G. (1989). Neuropeptide Y-like immunoreactive neurons in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and the sheep (*Ovis aries*) brain. *J Hirnforsch* 30(3), 349-360.
- Arai R., Onteniente B., Trembleau A., Landry M. and Calas A. (1990). Hypothalamic galanin-immunoreactive neurons projecting to the posterior lobe of the rat pituitary: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 299(4), 405-420.
- Arai R. and Calas A. (1991). Ultrastructural localization of galanin immunoreactivity in the rat median eminence. *Brain Res* 562(2), 339-343.
- Araki C.T., Nakamura R.M. and Kam L.W.G. (1987). Diurnal temperature sensitivity of dairy cattle in a naturally cycling environment. *J Therm Biol* 12, 23-26.
- Aranda L., Santín L.J., Begega A., Aguirre J.A. and Arias J.L. (2006). Supramammillary and adjacent nuclei lesions impair spatial working memory and induce anxiolytic-like behavior. *Behav Brain Res* 167(1), 156-164.
- Archer Z.A., Findlay P.A., McMillen S.R., Rhind S.M. and Adam C.L. (2004). Effects of nutritional status and gonadal steroids on expression of appetite-regulatory genes in the hypothalamic arcuate nucleus of sheep. *J Endocrinol* 182(3), 409-419.
- Arendt J. (1979). Radioimmunoassayable melatonin: circulating patterns in man and sheep. *Prog Brain Res* 52, 249-258.
- Arendt J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 8, 266-320.
- Arendt J. (2005). Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms* 20(4), 291-303.
- Arpin-Bott M.P., Waltisperger E., Freund-Mercier M.J. and Stoekel M.E. (1997). Two oxytocin-binding site subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localization by in vitro and in vivo autoradiography. *J Endocrinol* 153(1), 49-59.
- Arpin-Bott M.P., Waltisperger E., Freund-Mercier M.J. and Stoekel M.E. (1999). Historadioautographic localization, pharmacology and ontogeny of V(1a) vasopressin binding sites in the rat kidney. *Nephron* 83(1), 74-84.
- Arpin-Bott M.P., Kaissling B., Waltisperger E., Rabhi M., Saussine P., Freund-Mercier M.J. and Stoekel M.E. (2002). Historadioautographic localization of oxytocin and V1a vasopressin binding sites in the kidney of developing and adult rabbit, mouse and merione and of adult human. *Exp Nephrol* 10(3), 196-208.
- Aschoff J. (1951). Die 24-stunden periodik der Maus unter konstanten umgebungs Bedingungen. *Naturwissenschaften* 38, 506-507.

- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 25, 11-27.
- Aschoff J. (1965). Circadian rhythms in Man. *Science* 148, 1427-1432.
- Aschoff J., Gerecke U. and Wever R. (1967). Desynchronization of human circadian rhythms. *Jap J Physiol* 17(4), 450-457.
- Aschoff J. (1970). Circadian rhythm of activity and of body temperature. In: *Physiological and Behavioral Temperature Regulation*. Hardy J.D., Gagge A.P, Stolwijk J. A. J., eds. (Springfield,IL: Charles C. Thomas), pp. 905-919.
- Aschoff C., Aschoff J. and von Saint Paul U. (1973). Circadian rhythms of chicken brain temperatures. *J Physiol* 230(1), 103-113.
- Aschoff J. and von Saint Paul U. (1976). Brain temperature in the unanaesthetized chicken: its circadian rhythm of responsiveness to light. *Brain Res* 101(1), 1-9.
- Aschoff J. (1979). Circadian rhythms: Influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* 49(3), 225-249.
- Aschoff J. and Tokura H. (1986). Circadian activity rhythms in squirrel monkeys: entrainment by temperature cycles. *J Biol Rhythms* 1(2), 91-99.
- Aton S.J., Colwell C.S., Harmar A.J., Waschek J. and Herzog E.D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8(4), 476-483.
- Audinot V., Mailliet F., Lahaye-Brasseur C., Bonnaud A., Le Gall A., Amossé C., Dromaint S., Rodriguez M., Nagel N., Galizzi J.P., Malpoux B., Guillaumet G., Lesieur D., Lefoulon F., Renard P., Delagrangé P. and Boutin J.A. (2003). New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 367(6), 553-561.
- Ayo J.O., Oladese S.B., Ngam S., Fayomi A. and Afolayan S.B. (1998). Diurnal fluctuations in rectal temperature of the Red Sokoto goat during the Harmattan season. *Res Vet Sci* 66, 7-9.
- Azmitia E.C. and Segal M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179(3), 641-667.
- Baddouri K., Marchetti J., Hilali M. and Menard J. (1981). Measurement of antidiuretic hormone and plasma renin activity in desert rodents. *C R Seances Acad Sci III* 292(21), 1143-1146.
- Baddouri K., Butlen D., Imbert-Teboul M., Le Bouffant F., Marchetti J., Chabardès D. and Morel F. (1984). Plasma antidiuretic hormone levels and kidney responsiveness to vasopressin in the jerboa, *Jaculus orientalis*. *Gen Comp Endocrinol* 54 (2), 203-215.
- Badura L.L. and Goldman B.D. (1992). Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res* 598(1-2), 98-106.
- Bae H.H., Mangels R.A., Cho B.S., Dark J., Yellon S.M. and Zucker I. (1999). Ventromedial hypothalamic mediation of photoperiodic gonadal responses in male Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* (5), 391-401.
- Bai F.L., Yamano M., Shiotani Y., Emson P.C., Smith A.D., Powell J.F. and Tohyama M. (1985). An arcuate paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuro peptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331(1), 172-175.
- Balemans M.G.M. (1979). Indole metabolism in the pineal gland of the rat; some regulatory aspects. In: *The Pineal Gland of Vertebrates Including Man*. Kappers J.A., Pévet P. eds., Elsevier/ North Holland Biochemical Press. Amsterdam, New York, pp. 221-229.
- Balment R.J. and al Barazani K. (1992). Renal, cardiovascular and endocrine effects of centrally administered galanin in the anaesthetized rat. *Regul Pept* 38(1), 71-77.
- Balsalobre A. 2002. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res* 309(1), 193-199.
- Barassin S., Saboureau M., Kalsbeek A., Bothorel B., Vivien-Roels B., Malan A., Buijs R.M., Guardiola-LeMaitre B. and Pévet P. (1999). Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res* 27(4), 193-201.
- Barrett P., Conway S. and Morgan P.J. (2003). Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* 35(4), 221-230.
- Bartness T.J., Goldman B.D. and Bittman E.L. (1991). SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in Siberian hamsters. *Am J Physiol* 260(1 Pt 2), 102-112.
- Bartness T.J., Powers J.B., Hastings M.H., Bittman E.L. and Goldman B.D. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 15(4), 161-190.
- Bartness T.J. (1996). Photoperiod, sex, gonadal steroids, and housing density affect body fat in hamsters. *Physiol Behav* 60(2), 517-529.
- Basbaum A.I. and Fields H.L. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7, 309-338.
- Battaglia A.A., Beltramo M., Thibault J., Krieger M. and Calas A. (1995). A confocal approach to the morphofunctional characterization of the transient tyrosine hydroxylase system in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 696(1-2), 7-14.
- Belenky M.A., Yarom Y. and Pickard G.E. (2008). Heterogeneous expression of gamma-aminobutyric acid and gamma-aminobutyric acid-associated receptors and transporters in the rat suprachiasmatic nucleus. *Comp Neurol* 506(4), 708-732.
- Ben Goumi M., Riad F., Giry J., de la Farge F., Safwate A., Davicco M.J. and Barlet J.P. (1993). Hormonal control of water and sodium in plasma and urine of camels during dehydration and rehydration. *Gen Comp Endocrinol* 89(3), 378-386.
- Benítez-King G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res* 40 (1), 1-9.
- Ben-Jonathan N. (1985). Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev* 6(4), 564-589.
- Benstaali C., Mailloux A., Bogdan A., Auzéby A. and Touitou Y. (2001). Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle. *Life Sci* 68(24), 2645-2656.

- Berson D.M., Dunn F.A. and Takao M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295(5557), 1070-1073.
- Bhide S.A. and Puranik S.S. (2005). Galanin immunohistochemistry and electron microscopic studies in developing human fetal mammillary bodies. *J Chem Neuroanat* 29(4), 289-295.
- Biello S.M., Harrington M.E. and Mason R. (1991). Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. *Brain Res* 552(1), 47-52.
- Biello S.M., Janik D. and Mrosovsky N. (1994). Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience* 62(1), 273-279.
- Biemans B.A., Gerkema M.P. and Van der Zee E.A. (2002). Increase in somatostatin immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of aged Wistar rats. *Brain Res* 958(2), 463-467
- Bittman E.L., Crandell R.G. and Lehman M.N. (1989). Influences of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei and olfactory bulbs on melatonin responses in the golden hamster. *Biol Reprod* 40(1), 118-126.
- Bittman E.L. and Weaver D.R. (1990). The distribution of melatonin binding sites in neuroendocrine tissues of the ewe. *Biol Reprod* 43(6), 986-993.
- Bleier R., Cohn P. and Siggelkow I.R. (1979). A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. In: Morgane P.J., Panksepp J. eds. (Handbook of the Hypothalamus. New York: Marcel Deksepp Inc), pp. 137-220.
- Bligh J., Ingram D.L., Keynes R.D. and Robinson S.G. (1965). The deep Body temperature of an unrestrained Welsh mountain sheep recorded by a radiotelemetric technique during 12-month period. *J Physiol* 176, 136-144.
- Bobrzynska K.J., Vrang N. and Mrosovsky N. (1996). Persistence of nonphotic phase shifts in hamsters after serotonin depletion in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 741(1-2), 205-214.
- Boersma C.J. and Van Leeuwen F.W. (1994). Neuron-glia interaction in the release of oxytocin and vasopressin from the rat neural lobe: the role of opioids, other neuropeptides and their receptors. *Neuroscience* 62(10), 1003-1020.
- Boissin J. et Canguilhem B. (1998). Les rythmes du vivant , origine et contrôle des rythmes biologiques. Nathan, ed. (Paris, France), pp. 320.
- Bonnefond C., Walker A.P., Stutz J.A., Maywood E., Juss T.S., Herbert J. and Hastings M.H. (1989). The hypothalamus and photoperiodic control of FSH secretion by melatonin in the male Syrian hamster. *J Endocrinol* 122(1), 247-54.
- Bothorel B., Barassin S., Saboureau M., Perreau S., Vivien-Roels B., Malan A. and Pévet P. (2002). In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of the pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eu J Neurosc* 16(6), 1090-1098.
- Boutin J.A., Audinot V., Ferry G. and Delagrance P. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 26(8), 412-419.
- Brady L.S., Smith M.A., Gold P.W. and Herkenham M. (1990). Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52(5), 441-447.
- Brainard G.C., Petterborg L.J., Richardson B.A. and Reiter R.J. (1982). Pineal melatonin in syrian hamsters: circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* 35(5), 342-348.
- Bridges T.E. and James N.V. (1982). The hypothalamo-neurohypophysial system of native Australian desert rodents. The vasopressin and oxytocin contents of hypothalamus and posterior pituitary of *Notomys alexis* and *Pseudomys australis* compared with those of the laboratory rat and mouse in different states of water balance. *Aust J Exp Biol Med Sci* 60(3), 265-283.
- Broadway J., Arendt J. and Folkard S. (1987). Bright light phase shifts the human melatonin rhythm during the Antarctic winter. *Neurosci Lett* 79(1-2), 185-189.
- Brook, C.G.D. and Marshall N.J. (1998). *Endocrinologie*. De Boeck Université ed. Bruxelles, pp. 205.
- Buijs R.M. (1996). The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res* 111, 229-240.
- Buijs R.M., Wortel J., Van Heerikhuizen J.J., Feenstra M.G.P., Ter Horst G.J., Romijn H.J. and Kalsbeek A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* 11, 1535-1544.
- Buijs R.M. and Kalsbeek A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2(7), 521-526.
- Buijs R.M., van Eden C.G., Goncharuk V.D. and Kalsbeek A. (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol* 177(1), 17-26.
- Burbach J.P.H., Van Tol H.H.M., Bakkus M.H.C., Schmale H. and Ivel R. (1986). Quantification of vasopressin mRNA and oxytocin mRNA in hypothalamic nuclei by solution hybridization assays. *J Neurochem* 47, 1814-1821.
- Caba M., Silver R., González-Mariscal G., Jiménez A. and Beyer C. (1996). Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in rabbit hypothalamus during estrus, late pregnancy, and postpartum. *Brain Res* 720(1-2), 7-16.
- Cagampang F.R., Yang J., Nakayama Y., Fukuhara C. and Inouye S.T. (1994). Circadian variation of arginine-vasopressin messenger RNA in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res* 24(1-4), 179-184.
- Calas A., Landry M., Roche D. and Trembleau A. (1994). A model of phenotypic plasticity: the hypothalamo-posthypophysial neurons. *C R Seances Soc Biol Fil* 188(3), 187-206.
- Campbell S.S. and Murphy P.J. (2007). Delayed sleep phase disorder in temporal isolation. *Sleep* 30(9), 1225-1228.
- Card J.P., Brecha N., Karten H.J. and Moore R.Y. (1981). Immunocytochemical localisation of vasoactive intestinal polypeptide containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: Light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1(11), 1289-1303.

- Card J.P. and Moore R.Y. (1989). Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol* 284(1), 135-147.
- Cardinali D.P., Golombek D.A., Rosenstein R.E., Cutrera R.A. and Esquifino A.I. (1997). Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? *J Pineal Res* 23(1), 32-39.
- Carter D.S. and Goldman B.D. (1983). Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 113(4), 1261-1267.
- Casatti C.A., Elias C.F., Sita L.V., Frigo L., Furlani V.C.G., Bauer J.A. and Bittencourt J.C. (2002). Distribution of melanin-concentrating hormone neurons projecting to the medial mammillary nucleus. *Neuroscience* 115(3), 899-915.
- Cassone V.M., Speh J.C., Card J.P. and Moore R.Y. (1988). Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 3(1), 71-91.
- Castel M. and Morris J.F. (2000). Morphological heterogeneity of the GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus, the brain's circadian pacemaker. *J Anat* 196 (1), 1-13.
- Cayetanot F., Deprez J. and Aujard F. (2007). Calbindin D28K protein cells in a primate suprachiasmatic nucleus: localization, daily rhythm and age-related changes. *Eur J Neurosci* 26(7), 2025-2032.
- Chabot V., Caldani M., de Reviers M.M. and Pelletier J. (1998). Localization and quantification of melatonin receptors in the diencephalon and posterior telencephalon of the sheep brain. *J Pineal Res* 24(1), 50-57.
- Chaillou E., Tramu G. and Tillet Y. (1999). Distribution of galanin immunoreactivity in the sheep diencephalon. *J Chem Neuroanat* 17(3), 129-146.
- Chaillou E., Baumont R., Chilliard Y. and Tillet Y. (2002). Several subpopulations of neuropeptide Y-containing neurons exist in the infundibular nucleus of sheep: an immunohistochemical study of animals on different diets. *J Comp Neurol* 444(2), 129-143.
- Challet E., Pévet P. and Malan A. (1996). Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci Lett* 216(3), 214-218.
- Challet E., Jacob N., Vuillez P., Pévet P. and Malan A. (1997). Fos-like immunoreactivity in the circadian timing system of calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Res* 770(1-2), 228-236.
- Challet E. and Pévet P. (2003). Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci* 8, 246-257.
- Chan-Palay V., Záborszky L., Köhler C., Goldstein M. and Palay S.L. (1984). Distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *J Comp Neurol* 227(4), 467-496.
- Chemineau P., Beltran de Heredia I., Daveau A. and Bodin L. (1996). High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentration in the Ile-de-France ewe. *J Pineal Res* 21(1), 1-6.
- Chevassus-au-Louis N. and Cooper H.M. (1998). Is there a geniculohypothalamic tract in primates? A comparative immunohistochemical study in the circadian system of strepsirrhine and haplorhine species. *Brain Res* 805 (1-2), 213-219.
- Chronwall B.M., Chase T.N. and O'Donohue T.L. (1984). Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in rat and human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett* 52(3), 213-217.
- Ciofi P., Croix D. and Tramu G. (1987). Coexistence of hGHRF and NPY immunoreactivities in neurons of the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 45(5), 425-428.
- Claustrat B., Brun J. and Chazot G. (1990). Melatonin in humans, neuroendocrinological and pharmacological aspects. *Int J Rad Appl Instrum B* 17(7), 625-632.
- Collin J.P. (1971). Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri. In the Pineal Gland a Ciba Foundation Symposium. wolstenholme G.E.W. Knight J. eds. (Churchill Livingstone, Edinburgh), pp. 79-125.
- Collin J.P. (1979). Recent advances in pineal cytochemistry. Evidence of the production of indoleamines and proteinaceous substances by rudimentary photoreceptor cells and pinealocytes of Amniota. *Prog Brain Res* 52, 271-296.
- Coon S.L., Roseboom P.H., Baler R., Weller J.L., Namboodiri M.A., Koonin E.V. and Klein D.C. (1995). Pineal serotonin N-acetyltransferase: Expression cloning and molecular analysis. *Science* 270(5242), 1681-1683.
- Coon S.L., Mazuruk K., Bernard M., Roseboom P.H., Klein D.C. and Rodriguez I.R. (1996). The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): Structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34(1), 76-84.
- Coon S.L., Weller J.L., Korf H.W., Namboodiri M.A.A., Rollag M. and Klein D.C. (2001). cAMP regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): A new cell line (1e7) provides evidence of intracellular Aanat activation. *J Biol Chem* 275, 24097-24107.
- Coon S.L., Del Olmo E., Young W.S. and Klein D.C. (2002). Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: Focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J Clin Endocrinol Metab* 87(10), 4699-4706.
- Cossins A.R. and Bowler K. (1987). Temperature biology of animals. Chapman and Hall eds. London.
- Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M., Cerdán M.G., Diano S., Horvath T.L., Cone R.D. and Low M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836), 480-484.
- Cozzi B., Ravault J.P., Ferrandi B. and Reiter R.J. (1988). Melatonin concentration in the cerebral vascular sinuses of sheep and evidence for its episodic release. *J Pineal Res* 5(6), 535-543.
- Cozzi B., Mikkelsen J.D., Ravault J.P. and Møller M. (1992). Neuropeptide Y (NPY) and C-flanking peptide of NPY in the pineal gland of normal and ganglionectomized sheep. *J Comp Neurol* 316(2), 238-250.
- Craft C.M., Murage J., Brown B. and Zhan-Poe X. (1999). Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Brain Res Mol Brain Res* 65(1), 44-51.

- Cristofori P., Aria G., Seren E., Bono G. and Aaden A.S. (1986). Endocrinological aspects of reproduction in the female camel. *World Anim Rev* 57, 22-25.
- Csáki A., Kocsis K., Halasz B. and Kiss J. (2000). Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [³H]-aspartate autoradiography. *Neuroscience* 101(3), 637-655
- Cunningham E.T. Jr. and Sawchenko P.E. (1988). Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274 (1), 60-76.
- Cutrer R.A., Ouarour A. and Pévet P. (1994). Effects of the 5-HT_{1a} receptor agonist 8-OH-DPAT and other non-photic stimuli on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters under different constant conditions. *Neurosci Lett* 172(1-2), 27-30.
- Dardente H., Menet J.S., Poirel V.J., Streicher D., Gauer F., Vivien-Roels B., Klosen P., Pévet P., Masson-Pévet M. (2003). Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 114(2), 101-106.
- Davidson A.J., Yamazaki S. and Menaker M. (2003). SCN: ringmaster of the circadian circus or conductor of the circadian orchestra? *Novartis Found Symp* 253,110-121; discussion 121-125, 281 -284.
- De Mey J., Dierickx K. and Vandesande F. (1975). Identification of neurophysin-producing cells. III. Immunohistochemical demonstration of neurophysin I-producing neurones in the bovine infundibular nucleus. *Cell Tissue Res* 161(2), 219-224.
- De Vries M.J., Nunes Cardozo B., van der Want J., de Wolf A. and Meijer J.H. (1993). Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Res* 612(1-2), 231-237.
- Delgado J.A. and Chemineau P. (1992). Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J Reprod Fertil* 94(1), 45-55.
- Dellmann H.D. and Eurell J. (1998). Endocrine System. In Text book of veterinary histology, Dellmann H.D. and Eurell J., eds. (Baltimore, USA: Press), pp. 287-302.
- Deloof S., Croix D. and Tramu G. (1988). The role of vasoactive intestinal polypeptide in the inhibition of antral and pyloric electrical activity in rabbits. *J Auton Nerv Syst* 22(2), 167-173.
- Dixon G., Garrick T., Whiteman I., Sarris M., Sithampanathan S. and Harper C.G. (2004). Characterization of gabaergic neurons within the human medial mamillary nucleus. *Neuroscience* 127(2), 365-372.
- Drew J.E., Barrett P., Mercer J.G., Moar K.M., Canet E., Delagrang P. and Morgan P.J. (2001). Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol* 13(5), 453-458.
- Drijfhout W.J., van der Li A., de Vries J.B., Grol C.J. and Westerink B.H. (1996). Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* 202(3), 185-188.
- Dubocovich M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 306(5945), 782-784.
- Duncan M.J., Takahashi J.S. and Dubocovich M.L. (1989). Characteristics and autoradiographic localization of 2-[125I] iodomelatonin binding sites in Djungarian hamster brain. *Endocrinology* 125(2), 1011-1018.
- Duncan M.J., Cheng X. and Heller K.S. (1995). Photoperiodic exposure and time of day modulate the expression of arginine vasopressin mRNA and vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nuclei of Siberian hamsters. *Brain Res Mol Brain Res* 32(2), 181-186.
- Duncan M.J., Herron J.M. and Hill S.A. (2001). Aging selectively suppresses vasoactive intestinal peptide messenger RNA expression in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res* 87(2), 196-203.
- Earnest D.J., DiGiorgio S. and Olschowka J.A. (1993). Light induces expression of fos-related proteins within gastrin-releasing peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 627(2), 205-209.
- Ebisawa T., Karne S., Lerner M.R. and Reppert S.M. (1994). Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(13), 6133-6137.
- Edelstein K. and Amir S. (1999). The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod. *J Neurosci* 19(1), 372-380.
- Edgar D.M., Miller J.D., Prosser R.A., Dean R.R. and Dement W.C. (1993). Serotonin and the mammalian circadian system: II. Phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. *J Biol Rhythms* 8(1), 17-31.
- Egli M., Bertram R., Sellix M.T. and Freeman M.E. (2004). Rhythmic secretion of prolactin in rats: action of oxytocin coordinated by vasoactive intestinal polypeptide of suprachiasmatic nucleus origin. *Endocrinology* 145(7), 3386-3394.
- EL Allouchi M., Daoudi A., Marzak E., Stolle A. and Massen C. (2004). La technique d'abattage du dromadaire au Maroc. 45 Arbeitstagung des Arbeitsge Bietes Lebensmittel hygiene der DVG vom 28-09 Bis In Garmisch-Partenkirchen. Germany.
- El May M., El May A., Bouzakoura C. and Dubois P.M. (1987). Immunocytochemical evidence for vasopressin and oxytocin pathways in the hypothalamo-hypophyseal axis of the camel (*Camelus dromedarius*). *Gen And Comp Endocrinol* 66(2), 266-273.
- El Qandil S., Chakir J., El Moussaoui R., Oukouchoud R., Rami N., Benjelloun W.A. and Lakhdar-Ghazal N. (2005). Role of the pineal gland and melatonin in the photoperiodic control of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone in the male jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert rodent. *Brain Res Bull* 64(5), 371-380.
- Elias C.F., Lee C.E., Kelly J.F., Ahima R.S., Kuhar M., Saper C.B. and Elmquist J.K. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432(1), 1-19.
- Elkhawad A.O. (1992). Selective brain cooling in desert animals: the camel (*Camelus dromedarius*). *Comp Biochem Physiol* 101A (2), 195-201.
- Epelbaum J. (1995). Peptides neurohypophysaires : vasopressine et oxytocine In: Neuropeptides et neuromédiateurs. Reuil-Malmaison S., ed. (INSERM Paris, France), pp.229-239.

- Erhardt C., Galani R., Jeltsch H., Cassel J.C., Klosen P., Menet J.S., Pévet P. and 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(7), 1773-1788.
- Eskes G.A., Wilkinson M., Moger W.H. and Rusak B. (1984). Periventricular and suprachiasmatic lesion effects on photoperiodic responses of the hamster hypophyseal-gonadal axis. *Biol Reprod* 30(5), 1073-1081.
- Falcón J. (1984). Photosensitivity and biosynthesis of indole compounds in the cells of the receptor line of the pineal organ of the pike. *Ophthalmic Res* 16(1-2), 123-128.
- Fitzgerald L.R. and Reed J.R. (2004). Melatonin agonists for the treatment of sleep disorders and major depression. *Annu Rep Med Chem* 39, 25-37.
- Foulkes N.S., Duval G. and Sassone-Corsi P. (1996). Adaptive inducibility of CREM as transcriptional memory of circadian rhythms. *Nature* 381(6577), 83-85.
- François-Bellan A.M. and Bosler O. (1992). Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. *Brain Res* 595(1), 149-153.
- Freund-Mercier M.J., Richard P. and Miro J.L. (1975). Functional evidence in favor of the existence of 3 cell types in the paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 89(1), 149-154.
- Freund-Mercier M.J. and Richard P. (1977). Spontaneous and reflex activity of paraventricular nucleus units in cycling and lactating rats. *Brain Res* 130(3), 505-520.
- Fukuhara C., Shinohara K., Tominaga K., Otori Y. and Inouye S.T. (1993). Endogenous circadian rhythmicity of somatostatin like-immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 606(1), 28-35.
- Fuminier F., Sicard B., Boissin-Agasse L. and Boissin J. (1993). Seasonal changes in the hypothalamic vasopressinergic system of a wild Sahelian rodent, *Taterillus petteri*. *Cell Tissue Res* 271 (2), 309-316.
- Gander P.H., Connell L.J. and Graeber R.C. (1986). Masking of the circadian rhythms of heart rate and core temperature by the rest-activity cycle in man. *J Biol Rhythms* 1(2), 119-135.
- Ganguly S., Gastel J.A., Weller J.L., Schwartz C., Jaffe H., Namboodiri M.A., Coon S.L., Hickman A.B., Rollag M., Obsil T., Beauverger P., Ferry G., Boutin J.A. and Klein D.C. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24), 8083-8088.
- Ganguly S., Coon S.L. and Klein D.C. (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res* 309(1), 127-137.
- García A., Landete-Castillejos T., Zarazaga L., Garde J. and Gallego L. (2003). Seasonal changes in melatonin concentrations in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J Pineal Res* 34(3), 161-166.
- Gargaglioni L.H., Bicego K.C., Nucci T.B. and Branco L.G. (2006). Serotonergic receptors in the anteroventral preoptic region modulate the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol Neurobiol* 153(1), 1-13.
- Garidou M.L., Gauer F., Vivien-Roels B., Sicard B., Pévet P. and Simonneaux V. (2002). Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent. *Arvicanthus ansorgei*. *Eur J Neurosci* 15(10), 1632-1640.
- Garidou M.L., Diaz E., Calgari C., Pévet P. and Simonneaux V. (2003a). Transcription factors may frame Aa-nat gene expression and melatonin synthesis at night in the Syrian hamster pineal gland. *Endocrinology* 144(6), 2461-2472.
- Garidou M.L., Vivien-Roels B., Pévet P., Miguez J. and Simonneaux V. (2003b). Mechanisms regulating the marked seasonal variations in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol* 284(4), 1043-1052.
- Gauer F., Masson-Pévet M., Skene D.J., Vivien-Roels B., and Pévet P. (1993). Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 57(1), 120-126
- Gauer F., Poirel V.J., Garidou M.L., Simonneaux V. and Pévet P. (1999). Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Mol Brain Res* 71(1), 87-95.
- Gehlert D.R., Chronwall B.M., Schafer M.P. and O'Donohue T.L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* 1(1), 25-31.
- Geoghegan D. and Carter D.A. (2008). A novel site of adult doublecortin expression: neuropeptide neurons within the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *BMC Neurosci* 9, 2.
- Gerhold L.M., Horvath T.L. and Freeman M.E. (2001). Vasoactive intestinal peptide fibers innervate neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Res* 919(1), 48-56.
- Glass J.D. and Lynch G.R. (1981). Melatonin: identification of sites of antigonadal action in mouse brain. *Science* 214(4522), 821-823.
- Glass J.D. and Lynch G.R. (1982). Evidence for a brain site of melatonin action in the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Neuroendocrinology* 34(1), 1-6.
- Goldman B.D., Goldman S.L., Riccio A.P. and Terkel J. (1997). Circadian patterns of locomotor activity and body temperature in blind mole-rats, *Spalax ehrenbergi*. *J Biol Rhythms* 12(4), 348-361.
- Goldman B.D. (2001). Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16(4), 283-301.
- Gonzalo-Ruiz A., Morte L., Flecha J.M. and Sanz J.M. (1999). Neurotransmitter characteristics of neurons projecting to the supramammillary nucleus of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 200(4), 377-392.
- Gooley J.J., Lu J., Chou T.C., Scammell T.E. and Saper C.B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 4(12), 1165.
- Grahn D.A., Miller J.D., Hoang V.S. and Heller H.C. (1994). Persistence of circadian rhythmicity in hibernating ground squirrels. *Am J Physiol* 266(4 Pt 2), 1251-1258.

- Green D.J. and Gillette R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245(1), 198-200.
- Groos G. and Hendriks J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* 34(3), 283-288.
- Gross D.S. (1984). The mammalian hypophysial pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 56(2), 283-298.
- Guardiola-Lemaitre B. (2005). Melatoninergic receptor agonists and antagonists: pharmacological aspects and therapeutic perspective. *Ann Pharm Fr* 63(6), 385-400.
- Harlow H.J., Phillips J.A. and Ralph C.L. (1982). Circadian rhythms and the effects of exogenous melatonin in the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus*: a mammal lacking a distinct pineal gland. *Physiol Behav* 29(2), 307-313.
- Harmar A.J., Marston H.M., Shen S., Spratt C., West K.M., Sheward W.J., Morrison C.F., Dorin J.R., Piggins H.D., Reubi J.C., Kelly J.S., Maywood E.S. and Hastings M.H. (2002). The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* 109(4), 497-508.
- Harrington M.E. and Rusak B. (1986). Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 1(4), 309-325.
- Hartree E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48(2), 422-427.
- Hattar S., Kumar M., Park A., Tong P., Tung J., Yau K.W. and Berson D.M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497(3), 326-349.
- Hatton G.I. (1990). Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog Neurobiol* 34 (6), 437-504.
- Hatton G.I. and Yang Q.Z. (1994). Incidence of neuronal coupling in supraoptic nuclei of virgin and lactating rats: estimation by neurobiotin and lucifer yellow. *Brain Res* 650 (1), 63-69.
- Hay-Schmidt A., Vrang N., Larsen P.J. and Mikkelsen J.D. (2003). Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat* 25(4), 293-310.
- Hazlerigg D.G., Andersson H., Johnston J.D., and Lincoln G. (2004). Molecular characterization of the long-day response in the Soay sheep, a seasonal mammal. *Curr Biol* 14(4), 334-339.
- Hazlerigg D.G. and Wagner G.C. (2006). Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. *Trends Endocrinol Metab* 17(3), 83-91.
- Hedlund L., Lischko M.M., Rollag M.D. and Niswender G.D. (1977). Melatonin, daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Science* 195(4279), 686-687.
- Heer T., Pozzi A.G., Yovanovich C.A. and Paz D.A. (2009). Distribution pattern of neuropeptide Y in the brain, pituitary and olfactory system during the larval development of the toad *Rhinella arenarum* (*Amphibia: Anura*). *Anat Histol Embryol* 38(2), 89-95.
- Helliwell R.J. and Williams L.M. (1994). The development of melatonin-binding sites in the ovine fetus. *J Endocrinol* 142(3), 475-484.
- Hisano S., Daikoku S., Yanaihara N. and Shibasaki T. (1986). Intragranular colocalization of CRF and Met-Enk-8 in nerve terminals in the rat median eminence. *Brain Res* 370(2), 321-326.
- Hofman M.A., Fliers E., Goudsmit E. and Swaab D.F. (1988). Morphometric analysis of the suprachiasmatic and paraventricular nuclei in the human brain: sex differences and age-dependent changes. *J Anat* 160, 127-143.
- Hofman M.A. and Swaab D.F. (1989). The sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the human brain: a comparative morphometric study. *J Anat* 164, 55-72.
- Honma K., Honma S. and Wada T. (1987). Phase-dependent shift of free-running human circadian rhythms in response to a single bright light pulse. *Experientia* 43(11-12), 1205-1207.
- Hoorneman E.M.D. and Buijs R.M. (1982). Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Research* 243, 235-241.
- Hornung J.P., Törk I. and De Tribolet N. (1989). Morphology of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex. *Exp Brain Res* 76(1), 12-20.
- Huhman K.L. and Albers H.E. (1994). Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides* 15(8), 1475-1478.
- Hull E.M. and Dominguez J.M. (2006). Getting his act together: Roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area. *Brain Res* 1126(1), 66-75.
- Ibata Y., Watanabe K., Kinoshita H., Kubo S., Sano Y., Sin S., Hashimura E. and Imagawa K. (1979). The location of LH-RH neurons in the rat hypothalamus and their pathways to the median eminence. Experimental immunohistochemistry and radioimmunoassay. *Cell Tissue Res* 198(3), 381-395.
- Ibata Y., Takahashi Y., Okamura H., Kubo T. and Kawakami F. (1988). Fine structure of NPY-containing neurons in the lateral geniculate nucleus and their terminals in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Brain Res* 439(1-2), 230-235.
- Ibata Y., Takahashi Y., Okamura H., Kawakami F., Terubayashi H., Kubo T. and Yanaihara N. (1989). Vasoactive intestinal peptide (VIP)-like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. *Neurosci Lett* 97(1-2), 1-5.
- Ibata Y., Tanaka M., Ichitani Y., Takahashi Y. and Okamura H. (1993). Neuronal interaction between VIP and vasopressin neurones in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 4(2), 128-130.
- Igono M.O., Molokwu E.C.I. and Aliu Y.O. (1982). Body temperature response of Savannah Brown goat to the Harmattan and hot-dry season. *Int J Biometereol* 26, 225-230.
- Illnerova H., Hoffman K. and Vaněček J. (1984). Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 38, 226-231.
- Inatomi T. (1994). Expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat suprachiasmatic nucleus—immunocytochemistry and in situ

- hybridization study. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 98(8), 749-759.
- Ingram C.D., Snowball R.K. and Mihai R. (1996). Circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus slices from the vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Neuroscienc* 75(2), 635-641.
- Inouye S.T. and Kawamura H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(11), 5962-5966.
- Jacob N., Vuillez P., Lakdhar-Ghazal N. and Pévet P. (1999). Does the intergeniculate leaflet play a role in the integration of the photoperiod by the suprachiasmatic nucleus? *Brain Res* 828(1-2), 83-90.
- Jacomy H., Bulet A. and 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 (3), 859-870.
- Jaeger C.B. and Joh T.H. (1983). Transient expression of tyrosine hydroxylase in some neurons of the developing inferior colliculus of the rat. *Brain Res* 313(1), 128-132.
- Jaeger C.B., Ruggiero D.A., Albert V.R., Park D.H., Joh T.H. and Reis D.J. (1984). Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: immunocytochemical localization in neurons of the brain stem. *Neuroscience* 11(3), 691-713.
- Janik D. and Mrosovsky N. (1994). Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res* 651(1-2), 174-182.
- Jansen H.T., Gong Q., Norgren R.B. Jr. and Lehman M.N. (1994). Single- and double-label immunocytochemical study of the ovine suprachiasmatic nucleus (SCN): GABAergic and peptidergic relationships. *Brain Res Bull* 34(5), 499-506. Erratum in: *Brain Res Bull* 35(4), 393.
- Jégou S., Blasquez C., Delbende C., Tranchand Bunel D. and Vaudry H. (1993). Regulation of α -melanocyte-stimulating hormone release from hypothalamic neurons. *Ann NY Acad Sci* 680, 260-278.
- Jensen H.T., Gong Q., Norgren R.B. and Lehman M.N. (1994). Single and double label immunocytochemical study of the ovine suprachiasmatic nucleus (SCN): GABAergic and peptidergic relationships. *Brain Res* 34(5), 499-506.
- Jessen C., Dmi'el R., Choshniak I., Ezra D. and Kuhnen G. (1998). Effects of dehydration and rehydration on body temperatures in the black bedouin goat. *Pflugers Arch* 436(5), 659-666.
- Jilg A., Moek J., Weaver D.R., Korf H.W., Stehle J.H. and von Gall C. (2005). Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur J Neurosci* 22(11), 2845-2854.
- Jobst E.E. and Allen C.N. (2002). Calbindin neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus do not exhibit a circadian variation in spontaneous firing rate. *Eur J Neurosci* 16(12), 2469-2474.
- Johnson R.F., Smale L., Moore R.Y. and Morin L.P. (1988). Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(14), 5301-5304.
- Johnston J.D., Cagampang F.R., Stirling J.A., Carr A.J., White M.R., Davis J.R. and Loudon A.S. (2003). Evidence for an endogenous per1- and ICER-independent seasonal timer in the hamster pituitary gland. *FASEB J* 17(8), 810-815.
- Johnston J.D., Bashforth R., Diack A., Andersson H., Lincoln G.A. and Hazlerigg D.G. (2004). Rhythmic melatonin secretion does not correlate with the expression of arylalkylamine N-acetyltransferase, inducible cyclic amp early repressor, period1 or cryptochrome1 mRNA in the sheep pineal. *Neuroscience* 124(4), 789-795.
- Johnston J.D., Ebling F.J. and Hazlerigg D.G. (2005). Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Eur J Neurosci* 21(11), 2967-2974.
- Johnston J.D., Tournier B.B., Andersson H, Masson-Pévet M, Lincoln GA, Hazlerigg DG. (2006). Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology* 147(2), 959-965.
- Juhl F., Hannibal J. and Fahrenkrug J. (2007). Photic induction of c-Fos in enkephalin neurons of the rat intergeniculate leaflet innervated by retinal PACAP fibres. *Cell Tissue Res* 329(3), 491-502.
- Kalsbeek A. and Buijs R.M. (1992). Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. *Prog Brain Res* 92, 321-333.
- Kalsbeek A., Teclemariam-mesbah R. and Pévet P. (1993). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesorictus auratus*). *J Comp Neurol* 332(3), 293-314.
- Kalsbeek A., Buijs R.M., Engelmann M., Wotjak C.T. and Landgraf R. (1995). In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 682(1-2), 75-82.
- Kalsbeek A., Cutrera R.A., Van Heerikhuize J.J., Van Der Vliet J. and Buijs R.M. (1999). GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience* 91(2)453-461.
- Kalsbeek A., Garidou M.L., Palm I.F., Van Der Vliet J., Simonneaux V., Pévet P. and Buijs R.M. (2000). Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 12 (9), 3146-3154.
- Kalsbeek A. and Buijs R.M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* 309(1), 109-118.
- Kalsbeek A., Palm I.F. and Buijs R.M. (2002). Central vasopressin systems and steroid hormones. *Prog Brain Res* 139, 57-73.
- Kappers J.A. (1960). The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 52, 163-215.
- Kappers J.A. (1969). The mammalian pineal organ. *J Neurovisc Relat* 31 (Suppl 9), 140-184.
- Karasawa N., Hayashi M., Yamada K., Nagatsu I., Iwasa M., Takeuchi T., Uematsu M., Watanabe K. and Onozuka M. (2007). Tyrosine hydroxylase (TH)- and aromatic-L-amino acid decarboxylase (AADC)-immunoreactive neurons of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) brain: an immunohistochemical analysis. *Acta Histochem Cytochem* 40(3), 83-92.
- Kawamoto K., Nagano M., Kanda F., Chihara K., Shigeyoshi Y. and Okamura H. (2003). Two types of

- VIP neuronal components in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 74(6), 852-857.
- Kelly G. (2006). Body temperature variability (Part 1): a review of the history of body temperature and its variability due to site selection, biological rhythms, fitness, and aging. *Altern Med Rev* 11(4), 278-293.
- Kennaway D.J., Frith R.G., Phillipou G., Matthews C.D. and Seamark R.F. (1977). A specific radioimmunoassay for melatonin in biological tissue and fluids and its validation by gas chromatography-mass spectrometry. *Endocrinology* 101(1), 119-127.
- Kennett J.E., Poletini M.O. and Freeman M.E. (2008). Vasoactive intestinal polypeptide modulates the estradiol-induced prolactin surge by entraining oxytocin neuronal activity. *Brain Res* F1196, 65-73.
- Kerkérian L. and Pelletier G. (1986). Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y-containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* 369(1-2), 388-390.
- Kikusui T., Takeuchi Y. and Mori Y. (1997). Immunohistochemical localization of corticotrophin-releasing factor, [Arginine8] -vasopressin and oxytocin neurons in the goat hypothalamus. *J Vet Med Sci* 59 (8), 621-628.
- King T.S. and Steinlechner S. (1985). Pineal indolalkylamine synthesis and metabolism: kinetic considerations. *Pineal Res Rev* 3, 69-113.
- Kitahama K., Luppi P.H., Berod A., Goldstein M. and Jouvet M. (1987). Localization of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the cat hypothalamus, with special reference to fluorescence histochemistry. *J Comp Neurol* 262(4), 578-593.
- Kitahama K., Ikemoto K., Jouvet A., Nagatsu I., Sakamoto N. and Pearson J. (1998). Aromatic L-amino acid decarboxylase- and tyrosine hydroxylase-immunohistochemistry in the adult human hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 16(1), 43-55.
- Ko C.H. and Takahashi J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 15(2), 271-277.
- Kollias S.S., Ball W.S. and Prenger E.C. (1995). Review of the embryologic development of the pituitary gland and report of a case of hypophyseal duplication detected by MRI. *Neuroradiology* 37(1), 3-12.
- Komori K., Fujii T. and Nagatsu I. (1991). Do some tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the human ventrolateral arcuate nucleus and globus pallidus produce only L-dopa? *Neurosci Lett* 133(2), 203-206.
- Kondo K., Murase T., Otake K., Ito M. and Oiso Y. (1991). Centrally administered galanin inhibits osmotically stimulated arginine vasopressin release in conscious rats. *Neurosci Lett* 128(2), 245-248.
- Korf H.W. and Møller M. (1984). The innervation of the mammalian pineal gland with special references to central pinealopetal projections. In: *Pineal Research Reviews*. Reiter R.J. ed, vol.2 (Alan R. Liss: New York, USA), pp. 41-86.
- Korf H.W., Schomerus C. and Stehle J.H. (1998). The pineal organ, its hormone melatonin, and the photoneuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 146, 1-100.
- Kriebel J. (1974). Changes in internal phase relationships during isolation In: *Chronobiology* Scheving. L.E.; Halberg. F. and Pauly. J. E. eds. (Tokyo, Igaku Shoin), pp. 451-459.
- Krieger D.T. and Hauser H. (1978). Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(3), 1577-1581
- Kuwabara N., Seki K. and Aoki K. (1986). Circadian, sleep and brain temperature rhythms in cats under sustained daily light-dark cycles and constant darkness. *Physiol Behav* 38(2), 283-289.
- Kvetnanský R., Palkovits M., Mitro A., Torda T. and Mikulaj L. (1977). Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinology* 23(5), 257-267.
- Lacas-Gervais S., Maurel D., Hubert F., Allevard A.M., Doukary A., Maggi V., Siaud P., Gharib C., Sicard B., Calas A. and Hardin-Pouzet H. (2003). Vasopressin and galanin expression in the hypothalamus of two African rodents, *Taterillus gracilis* and *Steatomys caurinus*, subjected to water-restriction. *Gen Comp Endocrinol* 133(1), 132-145.
- Lakhdar-Ghazal N., Kalsbeek A. and Pévet P. (1992). Sexual differences and seasonal variations in vasoactive intestinal peptide immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus in the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Neurosci Letters* 144(1-2), 29-33.
- Lakhdar-Ghazal N., Dubois-Dauphin M., Hermes M.L., Buijs R.M., Bengelloun W.A. and Pévet P. (1995a). Vasopressin in the brain of a desert hibernator, the jerboa (*Jaculus orientalis*): presence of sexual dimorphism and seasonal variation. *J Comp Neurol* 358(4), 499-517.
- Lakhdar-Ghazal N., Oukouchoud R. and Pévet P. (1995 b). Seasonal variation in NPY immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the jerboa (*Jaculus orientalis*), a desert hibernator. *Neurosci Lett* 193(1), 49-52.
- Landry M., Trembleau A., Arai R. and Calas A. (1991). Evidence for a colocalization of oxytocin mRNA and galanin in magnocellular hypothalamic neurons: a study combining in situ hybridization and immunohistochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* 10(1), 91-95.
- Landry M., Roche D. and Calas A. (1995). Short-term effects of centrally administered galanin on the hyperosmotically stimulated expression of vasopressin in the rat hypothalamus. An in situ hybridization and immunohistochemistry study. *Neuroendocrinology* 61(4), 393-404.
- Landry M., Aman K. and Hökfelt T. (1998). Galanin-R1 receptor in anterior and mid-hypothalamus: distribution and regulation. *J Comp Neurol* 399(3), 321-340.
- Lantos T.A., Görcs T.J. and Palkovits M. (1995). Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premamillary region of the hypothalamus in rats. *Brain Res Brain Res Rev* 20(2), 209-249.
- Larsen P.J. and Mikkelsen J.D. (1993). The suprachiasmatic nucleus of the mink (*Mustela vison*): apparent absence of vasopressin-immunoreactive neurons. *Cell Tissue Res* 273(2), 239-247.
- Larsen P.J., Vrang N., Møller M., Jessop D.S., Lightman S.L., Chowdrey H.S. and Mikkelsen J.D. (1994). The diurnal expression of genes encoding vasopressin and vasoactive intestinal peptide within the rat suprachiasmatic nucleus is influenced by circulating glucocorticoids. *Brain Res Mol Brain Res* 27(2), 342-346.

- Larsen P.J., Enquist L.W. and Card J.P. (1998). Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur J Neurosci* 10(1),128-145.
- Le Minh N., Damiola F., Tronche F., Schütz G. and Schibler U. (2001). Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J* 20(24), 7128-7136.
- Leger L., Charnay Y., Danger J.M., Vaudry H., Pelletier G., Dubois P.M. and Jouvet M. (1987). Mapping of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the feline hypothalamus and hypophysis. *J Comp Neurol* 255(2), 283-292.
- Lehman M.N., Bittman E.L. and Newman S.W. (1984). Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in neuroendocrine responses to daylength in the golden hamster. *Brain Res* 308(1), 25-32.
- Lehman M.N., Silver R., Gladstone W.R., Kahn R.M., Gibson M. and Bittman E.L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci* 7(6), 1626-1638.
- Leibowitz S.F. (1998). Differential functions of hypothalamic galanin cell groups in the regulation of eating and body weight. *Ann N Y Acad Sci* 863, 206-220.
- Lerner A.B., Takahashi Y., Lee T.H. and Mori W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, 2587.
- Leroux C. (1960). In: [Aspects of thermal regulation of desert animals; personal observations of the dromedary] publié en français: Aspects de la régulation thermique des animaux du désert. Observations personnelles chez le dromadaire. Impri GENRE : Morteau (Doubs) : 37-75.
- LeSauter J., Stevens P., Jansen H., Lehman M.N. and Silver R. (1999). Calbindin expression in the hamster SCN is influenced by circadian genotype and by photic conditions. *Neuroreport* 10(15), 3159-3163.
- Leshin L.S., Kraeling R.R. and Kiser T.E. (1995). Immunocytochemical localization of the catecholamine-synthesizing enzymes, tyrosine hydroxylase and dopamine-beta-hydroxylase, in the hypothalamus of cattle. *J Chem Neuroanat* 9(3), 175-194.
- Lewis D., Freeman D.A., Dark J., Wynne-Edwards K.E. and Zucker I. (2002). Photoperiodic control of oestrous cycles in Syrian hamsters: mediation by the mediobasal hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 14(4):294-299. Erratum in: *J Neuroendocrinol* 14(7), 605.
- Li C., Peilin C. and Smith M.S. (1999). Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and Gonadotropin-Releasing Hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 140 (11), 5382-5390.
- Li C., Chen P. and Smith M.S. (2000). Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain Res* 854 (1-2), 122-129
- Lignereux Y. (1986). Atlas stériotaxique de l'encéphale de la vache frisonne (*Bos taurus* L.). Thèse de doctorat de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, pp.243.
- Lincoln G.A. (1992). Administration of melatonin into the mediobasal hypothalamus as a continuous or intermittent signal affects the secretion of follicle stimulating hormone and prolactin in the ram. *J Pineal Res* 12(3), 135-144.
- Lincoln G.A. and Maeda K.I. (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J Endocrinol* 132(2), 201-215.
- Lincoln G.A. (1994). Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. *J Endocrinol* 142(2), 267-276.
- Lincoln G.A. and Clarke I.J. (1994). Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 6(3), 251-260.
- Lincoln G., Messenger S., Andersson H., and 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(21), 13890-13895.
- Lincoln G.A., Johnston J.D., Andersson H., Wagner G., and Hazlerigg D.G. (2005). Photorefractoriness in mammals: dissociating a seasonal timer from the circadian-based photoperiod response. *Endocrinology* 146(9), 3782-3790.
- Lindvall O., Bjorklund A. and Skagerberg G. (1984). Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306 (1-2), 19-30.
- Lofts B. (1975). Animal Photoperiodism. The Institute of Biology's studies In: *Biology* N°25. Arnold F. ed., pp. 1-64.
- Long M.A., Jutras M.J., Connors B.W. and Burwell R.D. (2005). Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci* 8(1), 61-66.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1), 265-275.
- Lowry C.A., Plant A., Shanks N., Ingram C.D. and Lightman S.L. (2003). Anatomical and functional evidence for a stress-responsive, monoamine-accumulating area in the dorsomedial hypothalamus of adult rat brain. *Horm Behav* 43(1), 254-262.
- MADRPM : Ministère de l'Agriculture du Développement Rural et des Pêches Maritimes (1998). Note de synthèse sur l'élevage du dromadaire au Maroc.
- Mahoney M.M., Nunez A.A. and Smale L. (2000) Calbindin and Fos within the suprachiasmatic nucleus and the adjacent hypothalamus of *Arvicantis niloticus* and *Rattus norvegicus*. *Neuroscience* 99(3), 565-575.
- Mahoney M.M., Ramanathan C. and Smale L. (2007). Tyrosine hydroxylase positive neurons and their contacts with vasoactive intestinal polypeptide-containing fibers in the hypothalamus of the diurnal murid rodent, *Arvicantis niloticus*. *J Chem Neuroanat* 33(3), 131-139.

- Mailliet F., Audinot V., Malpaux B., Bonnaud A., Delagrangé P., Migaud M., Barrett P., Viaud-Massuard M.C., Lesieur D., Lefoulon F., Renard P. and Boutin J.A. (2004). Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol* 67(4), 667-677.
- Mailliet F., Ferry G., Vella F., Berger S., Cogé F., Chomar P., Mallet C., Guénin S.P., Guillaumet G., Viaud-Massuard M.C., Yous S., Delagrangé P. and Boutin J.A. (2005). Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH: quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol* 71(1-2), 74-88.
- Malek Z.S., Pévet P. and Raison S. (2004). Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience* 125(3), 749-758.
- Malek Z.S., Dardente H., Pévet P. and Raison S. (2005). Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur J Neurosci* 22(4), 895-901.
- Malmo R.B. and Malmo H.P. (1983). Experiments on the neuropsychology of thirst. *Int J Psychophysiol* 1(1), 25-48.
- Malpaux B., Robinson J.E., Brown M.B. and Karsch F.J. (1987). Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biol Reprod* 36(5), 1333-1341.
- Malpaux B., Daveau A., Maurice F., Gayrard V., and Thiéry J.C. (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 48(4), 752-760
- Malpaux B., Daveau A., Maurice F., Locatelli A. and Thiéry J.C. (1994). Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J Reprod Fertil* 101(3), 625-632.
- Malpaux B., Skinner D.C., and Maurice F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J Neuroendocrinol* 7(3), 199-206.
- Malpaux B., Viguie C. et Chemineau P. (1996). Contrôle photopériodique de la reproduction, *INRA productions animales* 9, 9-23.
- Malpaux B., Daveau A., Maurice-Mandon F., Duarte G. and Chemineau P. (1998). Evidence that melatonin acts in the pre-mammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139(4), 1508-1516.
- Malpaux B., Tricoire H., Mailliet F., Daveau A., Migaud M., Skinner D.C., Pelletier J. and Chemineau P. (2002). Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod Suppl* 59, 167-179.
- Marotte H. and Timbal J. (1981). Circadian rhythm of temperature in man. Comparative study with two experiment protocols. *Chronobiologia* 8(2), 87-100.
- Masson-Pévet M., George D., Kalsbeek A., Saboureaux M., Lakhdar-Ghazal N. and Pévet P. (1994). An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res* 278(1), 97-106.
- Matsushima S., Sakai Y. and Hira Y. (1999). Peptidergic peripheral nervous systems in the mammalian pineal gland. *Microsc Res Tech* 46(4-5), 265-280.
- Maywood E.S. and Hastings M.H. (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 136(1), 144-153.
- Maywood E.S., Bittman E.L. and Hastings M.H. (1996). Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* 54(2), 470-477.
- Maywood E.S., Reddy A.B., Wong G.K., O'Neill J.S., O'Brien J.A., McMahon D.G., Hahm A.J., Okamura H. and Hastings M.H. (2006). Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol* 16(6), 599-605.
- McCord C.P. and Allen F.P. (1917). Evidences associating pineal gland function of alterations in pigmentation. *J Exptl Zool* 23, 207.
- McShane T.M., Wise P.M. and Jennes L. (1994). Neuropeptide-Y neurons projecting to the medial septum-diagonal band do not have access to fenestrated capillaries in the rat brain. *Mol Cell Neurosci* 5(5), 459-465.
- Medina L., Martí E., Artero C., Fasolo A. and Puelles L. (1992). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol* 319(3), 387-405.
- Meijer J.H. (1991). Integration of visual information by the suprachiasmatic nucleus. In *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*, Klein D.C. Moore R.Y., Reppert S.M. (Dir.). Oxford University Press, pp: 107-119.
- Meister B., Ceccatelli S., Hokfelt T., Anden N.E., Anden M. and Theodorsson E. (1989). Neurotransmitters neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76(2), 343-368.
- Meister B., Cortés R., Villar M.J., Schalling M. and Hökfelt T. (1990). Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260(2), 279-297.
- Melander T., Hökfelt T. and Rökaeus A. (1986). Distribution of galaninlike immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 248(4), 475-517.
- Mendoza J., Graff C., Dardente H., Pévet P. and Challet E. (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25(6), 1514-1522.
- Mendoza J., Clesse D., Pévet P. and Challet E. (2008). Serotonergic potentiation of dark pulse-induced phase-shifting effects at midday in hamsters. *J Neurochem* 106(3), 1404-1414.

- Menet J., Vuillez P., Jacob N. and Pévet P. (2001). Intergeniculate leaflets lesion delays but does not prevent the integration of photoperiodic change by the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* 906(1-2), 176-179.
- Menet J.S., Vuillez P. and Pévet P. (2003). Calbindin expression in the hamster suprachiasmatic nucleus depends on day-length. *Neuroscience* 122(3), 591-598
- Mensah-Brown E.P. and Garey L.J. (2006). The superior colliculus of the camel: a neuronal-specific nuclear protein (NeuN) and neuropeptide study. *J Anat* 208(2), 239-250.
- Messenger S., Ross A.W., Barrett P. and Morgan P.J. (1999). Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(17), 9938-9943.
- Messenger S., Hazlerigg D.G., Mercer J.G., and Morgan P.J. (2000). Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci* 12(8), 2865- 2870.
- Messenger S., Garabette M.L., Hastings M.H., and Hazlerigg D.G. (2001). Tissue-specific abolition of Per1 expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport* 12(3), 579-582.
- Meyer-Bernstein E.L. and Morin L.P. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci* 16(6), 2097-2111.
- Mick G., Najimi M., Girard M. and Chayvialle J.A. (1992). Evidence for a substance P containing subpopulation in the primate suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 573(2), 311-317.
- Mikkelsen J.D. and Møller M. (1988). Vasoactive intestinal peptide in the hypothalamohypophysial system of the Mongolian gerbil. *J Comp Neurol* 273(1), 87-98.
- Mikkelsen J.D., Larsen P.J., O'Hare M.M. and Wiegand S.J. (1991). Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience* 40(1), 55-66.
- Mikkelsen J.D. and Larsen P.J. (1993). Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry* 100(1), 3-16.
- Mikkelsen J.D. and Møller M. (1999). Neuropeptide Y in the mammalian pineal gland. *Microscopy research and technique* 46(4-5), 239-256.
- Møller M. (1999). Introduction to mammalian pineal innervation. *Microsc Res Tech* 46(4-5), 235-238.
- Møller M. and Baeres F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res* 309(1), 139-150.
- Moore R.Y. and Eichler V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42(1), 201-206.
- Moore R.Y. and Lenn N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol* 146(1), 1-14.
- Moore R.Y. (1973). Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. *Brain Res* 49(2), 403-409.
- Moore R.Y. (1983). Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc* 42(11), 2783-2789.
- Moore R.Y., Gustafson E.L. and Card J.P. (1984). Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against avian pancreatic polypeptide, molluscan cardioexcitatory peptide and neuropeptide Y. *Cell Tissue Res* 236(1), 41-46.
- Moore R.Y. (1989). The geniculohypothalamic tract in monkey and man. *Brain Res* 486(1), 190-194.
- Moore R.Y. and Speh J.C. (1993). GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150(1), 112-116.
- Moore R.Y. and Leak R.K. (2001). Suprachiasmatic nucleus. Takahashi J.S., Turek F.W. and Moore R.Y. eds. (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers), pp.141-179.
- Moore R.Y., Speh J.C. and Leak R.K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization *Cell Tissue Res* 309(1), 89-98.
- Morgan P.J. and Williams L.M. (1996). The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev Reprod* 1(3), 153-161.
- Morgan P.J., Webster C.A., Mercer J.G., Ross A.W., Hazlerigg D.G., MacLean A. and Barrett P. (1996). The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 137(9), 4018-4026.
- Morin L.P., Blanchard J. and Moore R.Y. (1992). Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci* 8(3), 219-230.
- Morin L.P. (1994). The circadian visual system. *Brain Res Brain Res Rev* 19(1), 102-127.
- Morin L.P. and Blanchard J. (1995). Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis Neurosci* 12(1), 57-67.
- Morrison S.F., Nakamura K. and Madden C.J. (2008). Central Control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol* 93(7), 773-797.
- Murphy B.A., Elliott J.A., Sessions D.R., Vick M.M., Kennedy E.L. and Fitzgerald B.P. (2007). Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *J Circadian Rhythms* 5, 5.
- Murray E.J., Williams H.L. and Lubin A. (1958). Body temperature and psychological ratings during sleep deprivation. *J Exp Psychol* 56(3), 271-273.
- Musa B., Siema H., Merkt H., Hago B.E.D., Cooper M.J., Allen W.R. and Jochle W. (1993). Manipulation of reproductive functions in male and female camels. *Anim Reprod Sci* 33, 289-306.
- Nakada H. and Nakai Y. (1985). Electron microscopic examination of the catecholaminergic innervation of neurophysin- or vasopressin- containing neurons in the rat hypothalamus. *Brain Res* 361(1-2), 24-57.
- Namoodiri M.A., Sugden D., Klein D.C., Grady R. Jr. and Mefford I.N. (1985). Rapid nocturnal increase in ovine pineal N-acetyltransferase activity and

- melatonin synthesis: Effects of cycloheximide. *J Neurochem* 45(3), 832- 835.
- Nishiwaki T., Okamura H., Kanemasa K., Inatomi T., Ibata Y., Fukuhara C. and Inouye S.T. (1995). Differences of somatostatin mRNA in the rat suprachiasmatic nucleus under light-dark and constant dark conditions: an analysis by in situ hybridization. *Neurosci Lett* 197(3), 231-234.
- Nomina Anatomica Veterinaria* (2005). Fifth edition: préparé by the International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature (I.C.V.G.A.N.) and authorized by The General Assembly of the World Association of Veterinary Anatomists (W.A.V.A), Knoxville, TN (USA) 2003. Published by the Editorial Committee: Hannover, Columbia, Gent, Sapporo: 122-152.
- Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J.M., Lefoulon F., Fauchere J.L., Delagrangre P., Canet E., Boutin J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 275(40), 31311-31317.
- Novak C.M. and Nunez A.A. (1998). Tyrosine hydroxylase- and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-containing cells in the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Chem Neuroanat* 14 (2), 87-94.
- Nuesslein-Hildesheim B., O'Brien J.A., Ebling F.J., Maywood E.S., and Hastings M.H. (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(8), 2856-2864.
- Nurnberger F., Lee T.F., Jourdan M.L. and Wang L.C. (1991). Seasonal changes in methionine-enkephalin immunoreactivity in the brain of a hibernator, *Spermophilus columbianus*. *Brain Res* 547(1), 115-121.
- Obata-Tsuto H.L., Okamura H., Tsuto T., Terubayashi H., Fukui K., Yanaihara N. and Ibata Y. (1983). Distribution of the VIP-like immunoreactive neurons in the cat central nervous system. *Brain Res Bull* 10(5), 653-60.
- Okamura H., Murakami S., Fukui K., Uda K., Kawamoto K., Kawashima S., Yanaihara N., Ibata Y. (1986). Vasoactive intestinal peptide- and peptide histidine isoleucine amide-like immunoreactivity colocalize with vasopressin-like immunoreactivity in the canine hypothalamo-neurohypophysial neuronal system. *Neurosci Lett* 69(3), 227-232.
- Okamura H. and Ibata Y. (1994). GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neurosci Lett* 181(1-2), 165-168.
- Orloff J. and Handler J. (1967). The role of adenosine 3',5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone. *Am J Med* 42(5), 757-768.
- Oshima I. and Ebihara S. (1988). The measurement and analysis of circadian locomotor activity and body temperature rhythms by a computer-based system. *Physiol Behav* 43(1), 115-119.
- Ouassat M. (1983). Le cervelet du dromadaire. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II : Rabat, Maroc, p. 82.
- Oukouchoud R., Vivien-Roels B., Pévet P. and Lakhdar-Ghazal N. (2003). Testosterone-dependent and -independent mechanisms involved in the photoperiodic control of neuropeptide levels in the brain of the jerboa (*Jaculus orientalis*). *Brain Res* 967(1-2), 63-72.
- Pálková M., Sigmund L. and Erkert H.G. (1999). Effect of ambient temperature on the circadian activity rhythm in common marmosets, *Callithrix j. jacchus* (primates). *Chronobiol Int* 16(2), 149-161.
- Panayotacopoulou M.T., Malidelis Y.I., Fliers E., Bouras C., Ravid R. and Swaab D.F. (2002). Increased expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in paraventricular and supraoptic neurons in illnesses with prolonged osmotic or nonosmotic stimulation of vasopressin release. *Neuroendocrinology* 76(4), 254-266
- Pang S.F., Tang F. and Tang P.L. (1984). Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J Exp Zool* 229(1), 41- 47.
- Paxinos G. and Watson C. (1982). In: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press ed. New York.
- Pego-Reigosa R., Covenas R., Tranu G. and Pesini P. (2000). Distribution of met-enkephalin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J Chem Neuroanat* 19(4), 243-258.
- Penny R. (1985). Episodic secretion of melatonin in pre- and postpubertal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 60(4), 751-756.
- Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Pévet P. and Buijs R.M. (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci* 19(2), 318-324.
- Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Van Der Vliet J., Pévet P. and Buijs R.M. (2005). In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience* 130(3), 797-803.
- Pévet P. (1982). The anatomy of the pineal gland of mammals. In: The pineal Gland. Relkin R. ed. (Elsevier North Holland, New York, New York: Elsevier/North Holland), pp. 1-75.
- Pévet P. (1988). The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev* 28(2B), 443-458.
- Pévet P. (2002). The melatonin. *Dialogues in clinical Neurosciences* 4, 57-72.
- Pévet P., Bothorel B., Slotten H. and Saboureau M. (2002). The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* 309(1), 183-191.
- Pévet P. (2003). Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol* 15(4), 422-426
- Pévet P. (2005). Mélatonine, une hormone au coeur des rythmes biologiques. *Lettre du Pharmacologue* 19, 145-150.
- Pévet P. (2007). Le système circadien : anatomie et physiologie. *European Psychiatry* 22, 19-27.
- Piccione G., Caola G. and Refinetti R. (2002). The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biological Rhythm Research* 33(1), 113-119.
- Piccione G., Caola G. and Refinetti R. (2003a). Daily and estrous rhythmicity of body temperature in domestic cattle. *BMC Physiology* 3, 7.

- Piccione G., Caola G. and Refinetti R. (2003b). Circadian rhythms of body temperature and liver function in fed and food-deprived goats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 134(3), 563-572.
- Pickard G.E., Kahn R. and Silver R. (1984). Splitting of the circadian rhythm of body temperature in the golden hamster. *Physiol Behav* 32(5), 763-766.
- Pickard G.E., Ralph M.R., Menaker M. (1987). The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J Biol Rhythms* 2(1), 35-56.
- Pirnik Z. and Kiss A. (2005). Fos expression variances in mouse hypothalamus upon physical and osmotic stimuli: co-staining with vasopressin, oxytocin, and tyrosine hydroxylase. *Brain Res Bull* 65(5), 423-431.
- Pitrosky B., Kirsch R., Vivien-Roels B., Georg-Bentz I., Canguilhem B. and Pévet P. (1995). The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* 7(11), 889-895.
- Pittendrigh C.S. and 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.
- Pittman Q.J., Blume H.W. and Renaud L.P. (1981). Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res* 215 (1-2), 15-28.
- Poindron P., Lévy F. and Keller M. (2007). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Dev Psychobiol* 49(1), 54-70.
- Privat K., Ravault J.P., Chesneau D., Fevre-Montange M. (1999). Day/night variation of tryptophan hydroxylase and serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in the ovine pineal gland and retina. *J Pineal Res* 26(4), 193-203.
- Rabhi M., Ugrumov M.V., Goncharevskaya O.A., Bengelloun W., Calas A. and Natochin Y.V. (1996). Development of the hypothalamic vasopressin system and nephrons in *Meriones shawi* during ontogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 193(3), 281-296.
- Rabhi M., Stoeckel M.E., Calas A. and Freund-Mercier M.J. (1999). Autoradiographic localisation of oxytocin and vasopressin binding sites in the central nervous system of the merione (*Meriones shawi*). *Brain Res Bull* 48(2), 147-163.
- Rajaratnam S.M. and Redman J.R. (1998). Entrainment of activity rhythms to temperature cycles in diurnal palm squirrels. *Physiol Behav* 63(2), 271-277.
- Raji A. and Nordmann J.J. (1994). Synthesis, turnover, and release of peptides from the neurohypophysis of the Jerboa *jaculus orientalis*. *Gen Comp Endocrinol* 93(3), 345-356.
- Randall W., Johnson R.F., Randall S. and Cunningham J.T. (1985). Circadian rhythms in food intake and activity in domestic cats. *Behav Neurosci* 99(6), 1162-1175.
- Rankin S.L., Partlow G.D., McCurdy R.D., Giles E.D. and Fisher K.R. (2003). Postnatal neurogenesis in the vasopressin and oxytocin-containing nucleus of the pig hypothalamus. *Brain Res* 971(2), 189-196.
- Ravault J.P. and Chesneau D. (1996). Melatonin secretion in rams maintained in constant darkness depends on the timing of a single 1-hour light pulse given the previous night. *J Pineal Res* 21(4), 218-224.
- Refinetti R. and Menaker M. (1992). The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* 51(3), 613-637.
- Refinetti R. (1993). Laboratory instrumentation and computing: comparison of six methods for the determination of the period of circadian rhythms. *Physiol Behav* 54(5), 869-875.
- Refinetti R. (1999). Relationship between the daily rhythms of locomotor activity and body temperature in eight mammalian species. *Am J Phys* 277(5 Pt 2), R1493-1500.
- Reiter R.J. (1986). Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *J Neural Transm Suppl* 21, 35-54.
- Reiter R.J., Tan D.X., Mayo J.C., Sainz R.M., Leon J. and Czarnecki Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implication in humans. *Acta Biochim Pol* 50(4), 1129-1146.
- Rensing L. and Ruoff P. (2002). Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int* 19(5), 807-864.
- Reppert S.M., Perlow M.J., Tamarkin L. and Klein D.C. (1979). A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104(2), 295-301.
- Reppert S.M., Weaver D.R. and Ebisawa T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13(5), 1177-1185.
- Reppert S.M., Godson C., Mahle C.D., Weaver D.R., Slangenaupt S.A. and Gusella J.F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(19), 8734-8738.
- Reppert S.M. and Weaver D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63, 647-676.
- Reppert S.M. and Weaver D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901), 935-941.
- Reuss S., Hurlbut E.C., Speh J.C. and Moore R.Y. (1989). Immunohistochemical evidence for the presence of neuropeptides in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of ground squirrels. *Anat Rec* 225(4), 341-346.
- Reuss S., Hurlbut E.C., Speh J.C. and Moore R.Y. (1990). Neuropeptide Y localization in telencephalic and diencephalic structures of the ground squirrel brain. *Am J Anat* 188(2), 163-174.
- Reuss S. and Bürger K. (1994). Substance P-like immunoreactivity in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of *Phodopus sungorus*: relation to daytime, photoperiod, sex and age. *Brain Res* 638(1-2), 189-195.
- Revel F.G., Saboureau M., Masson-Pévet M., Pévet P., Mikkelsen J.D. and Simonneaux V. (2006a). Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16(17), 1730-1735.

- Revel F.G., Saboureau M., Masson-Pévet M., Pévet P., Mikkelsen J.D. and Simonneaux V. (2006b). KiSS-1: a likely candidate for the photoperiodic control of reproduction in seasonal breeders. *Chronobiol Int* 23(1-2), 277-287.
- Revel F.G., Ansel L., Klosen P., Saboureau M., Pévet P., Mikkelsen J.D. and Simonneaux V. (2007). Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* 8(1), 57-65.
- Rhodes C.H., Morrell J.I. and Pfaff D.W. (1981). Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: Distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin and vasopressin. *J Comp Neurol* 198(1), 45-64
- Rhodin J.A.G. (1974). In: *Histology. A Text and Atlas*. (New York, Oxford University Press), pp. 352-358.
- Rice D.L. (1982). The ditritus nitrogen problem: new observations and perspectives from organic geochemistry. *Marine Ecology Progress Series* (8) 153-162.
- Richard P.H., Moos F. and Freund-Mercier M.J. (1991). Central effects of oxytocin. *Physiological* 71(2), 331-359.
- Riche D. Christolomme A., Bert J. and Naquet R. (1968). In: *Atlas Stéréotaxique Du Cerveau de Babouin (Papio papio)*. Centre National De La Recherche Scientifique, ed. (Paris, France), pp. 207.
- Robak A., Bogus-Nowakowska K. and Szleyn S. (1998). The morphology and cell structure of some nuclei in tuberal region of bison bonasus. *Folia Morphol (Warsz)* 57(4), 309-314.
- Rocha A.A., Guerra-Sá R., Silveira N.A., Anselmo-Francid J.A. and Franci C.R. (2006). Neuropeptide Y in the medial basal hypothalamus and medial preoptic area during the induction of LH surge may be controlled by locus coeruleus. *Neuropeptides* 40(1), 57-63.
- Romijn H.J., Sluiter A.A., Pool C.W., Wortel J. and Buijs R.M. (1997). Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 9(12), 2613-2623.
- Romijn H.J., Sluiter A.A., Wortel J., van Uum J.F. and Buijs R.M. (1998). Immunocytochemical evidence for a diurnal rhythm of neurons showing colocalization of VIP with GRP in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol* 391(3), 397-405.
- Romijn H.J., Van Uum J.F., Emmering J., Goncharuk V. and Buijs R.M. (1999). Colocalization of VIP with AVP in neurons of the human paraventricular, supraoptic, suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 832 (1-2), 47-53.
- Roseboom P.H. and Klein D.C. (1995). Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 47(3), 439- 449.
- Roseboom P.H., Coon S.L., Baler R., McCune S.K., Weller J.L. and Klein D.C. (1996). Melatonin synthesis: Analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137(7), 3033-3045.
- Roseboom P.H., Namboodiri M.A., Zimonjic D.B., Popescu N.C., Rodriguez I.R., Gastel J.A. and Klein D.C. (1998). Natural melatonin "knockdown" in C57BL/6J mice: Rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* 63(1), 189-197.
- Ross A.W., Webster C.A., Mercer J.G., Moar K.M., Ebling F.J., Schuhler S. Barrett P. and Morgan P.J. (2004). Photoperiodic regulation of hypothalamic retinoid signaling: association of retinoid X receptor gamma with body weight. *Endocrinology* 145(1), 13-20.
- Ruggiero D.A., Baker H., Joh T.H. and Reis D.J. (1984). Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region of mouse. *J Comp Neurol* 223(4), 556-582.
- Rusak B. and Morin L.P. (1976). Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. *Biol Reprod* 15(3), 366-374.
- Saad W.A., Luiz A.C., Camargo L.A., Menani J.V., Renzi A. and Silveira J.E. (1993). Central angiotensin converting enzyme-blockade and thirst. *Braz J Med Biol Res* 26(9), 999-1007.
- Sabatino F.D., Murnane J.M., Hoffman R.A. and McDonald J.K. (1987). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the hypothalamus of the adult golden hamster. *J Comp Neurol* 257(1), 93-104.
- Sack R.L., Lewy A.J., Erb D.L., Vollmer W.M. and Singer C.M. (1986). Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 3(4), 379-388.
- Sahu A., Kalra S.P., Crowley W.R. and Kalra P.S. (1988). Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. *Brain Res* 457(2), 376-378.
- Satinoff E., Liran J. and Clapman R. (1982). Aberrations of circadian body temperature rhythms in rats with medial preoptic lesions. *Am J Physiol* 242(3), 352-357.
- Sawchenko P.E., Swanson L.W., Steinbusch H.W. and Verhofstad A.A. (1983). The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 277(2), 355-360.
- Sawchenko P.E., Swanson L.W. and Vale W.W. (1984). Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(6), 1883-1887.
- Schmidt-Nielsen K., Schmidt-Nielsen B., Jarnum S.A. and Houpt T.R. (1957). Body temperature of the camel and it's relation to water economy. *Am J Physiol* 188 (1), 103-112.
- Schmidt-Nielsen K. (1964). *Desert Animals: Physiological Problems of Heat and Water*. (Oxford, Clarendon), pp. 1-277.
- Schomerus C., Korf H.W., Laedtke E., Weller J.L. and Klein D.C. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMPdependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: An example from the pineal gland. *J Neurochem* 75(5), 2123-2132.
- Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D.Jr., Seeley R.J. and Baskin D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778), 661-671.
- Scott C.J. and Clarke I.J. (1993). Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for

- gamma-amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology* 133(6), 2904-2912.
- Sghiri A. and Driancourt M.A. (1999). Seasonal effects on fertility and ovarian follicular growth and maturation in camels (*Camelus dromedarius*). *Anim Reprod Sci* 55(3-4), 223-237.
- Shalash M.R. (1965). Some reproductive aspects in the female camel world. *Rev Anim Prd* 4, 103-108.
- Shen C.L. (1987). Distribution of neuropeptide Y immunoreactivity in the forebrain of the rat. *Proc Natl Sci Coun Repub China B*. 11(2), 115-127.
- Sherman T.G., Civelli O., Douglass J., Herbert E., Burke S. and Watson S.J. (1986). Hypothalamic dynorphin and vasopressin mRNA expression in normal and Brattleboro rats. *Fed Proc* 45 (9) 2323-2327.
- Shimura T., Yamamoto T. and Shimokochi M. (1994). The medial preoptic area is involved in both sexual arousal and performance in male rats: re-evaluation of neuron activity in freely moving animals. *Brain Res* 640(1-2), 215-222.
- Shinohara K., Tominaga K., Isobe Y. and Inouye S.T. (1993). Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J Neurosci* 13(2), 793-800.
- Shiotani Y., Yamano M., Shiosaka S., Emson P.C., Hillyard C.J., Girgis S. and MacIntyre I. (1986). Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett* 70(2), 187-192.
- Silver R., Romero M.T., Besmer H.R., Leak R., Nunez J.M. and LeSauter J. (1996). Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced Fos. *Neuroreport* 7(6), 1224-1228.
- Simerly R.B. and Swanson L.W. (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 270(2), 209-242.
- Simonneaux V., Ouichou A., Burbach J.P. and Pévet P. (1990). Vasopressin and oxytocin modulation of melatonin secretion from rat pineal glands. *Peptides* 11(6), 1075-1079.
- Simonneaux V., Ouichou A. and Pévet P. (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates melatonin synthesis from rat pineal gland. *Brain Res* 603(1), 148-152.
- Simonneaux V. (1995). Neuropeptides of the mammalian pineal gland. *Neuroendocrinol Lett* 17(2), 113-130.
- Simonneaux V. and Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55(2), 325-395.
- Sims K.B., Hoffman D.L., Said S.I. and Zimmerman E.A. (1980). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* 186(1), 165-183.
- Sinitskaya N., Salingre A., Klosen P., Revel F.G., Pévet P. and Simonneaux V. (2006). Differential expression of activator protein-1 proteins in the pineal gland of Syrian hamster and rat may explain species diversity in arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression. *Endocrinology* 147(11), 5052-5060.
- Skofitsch G. and Jacobowitz D.M. (1985). Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6(3), 509-546.
- Skofitsch G., Jacobowitz D.M., Amann R. and Lembeck F. (1989). Galanin and Vasopressin Coexist in the Rat Hypothalamo-Neurohypophyseal System. *Neuroendocrinology* 49(4), 419-427.
- Skrzypczak W. F. (1998). Epiphysis, melatonin and biological rhythm (szyszynka, melatonina a rytmy biologiczne). *Medycyna Weterynaryjna* 54(9), 586-589.
- Slimane-taleb S., Bererhi A. and Zidane C. (1969). Morphological aspects of supra optical and para ventricular nuclei of hypothalamus of the camel (*Camelus dromedarius*). *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord* 59 (4), 165-170.
- Sliwowska J.H., Billings H.J., Goodman R.L., Coolen L.M. and Lehman M.N. (2004). The premammillary hypothalamic area of the ewe: anatomical characterization of a melatonin target area mediating seasonal reproduction. *Biol Reprod* 70(6), 1768-1775.
- Smith Y., Parent A., Kerkérian L. and Pelletier G. (1985). Distribution of neuropeptide Y immunoreactivity in the basal forebrain and upper brainstem of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Comp Neurol* 236(1), 71-89.
- Smith M. and Carter D.A. (1996). In situ hybridization analysis of vasopressin mRNA expression in the mouse hypothalamus: diurnal variation in the suprachiasmatic nucleus. *J Chem Neuroanat* 12(2), 105-120.
- Sofroniew M.V. and Weindl A. (1980). Identification of parvocellular vasopressin and neurophysin neurons in the suprachiasmatic nucleus of a variety of mammals including primates. *J Comp Neurol* 193(3), 659-675.
- Sofroniew M.V. and Glasmann W. (1981). Golgi-like immunoperoxidase staining of hypothalamic magnocellular neurons that contain vasopressin, oxytocin or neurophysin in the rat. *Neuroscience* 6 (4), 619-643.
- Sofroniew M.V., Weindl A., Schrell U. and Wetzstein R. (1981). Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain. *Acta Histochem* 24, 79-95.
- Sofrontew M.V. (1985). Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins In Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 4: GABA and Neuropeptides in the CNS, Part I, Björklund A., Hökfelt T., eds. (Elsevier, Amsterdam), pp: 93-165
- Sokolove P.G. and Bushell W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Bio* 172(1), 131-60.
- Song C.K. and Bartness T.J. (1996). The effects of anterior hypothalamic lesions on short-day responses in Siberian hamsters given timed melatonin infusions. *J Biol Rhythms* 11(1), 14-26.

- Spiegel E. A. and Zweig H. (1917). Zur Cytoarchitektonik des Tuber Cinereum. *Arb neurol Inst Wien Univ* 22, 278.
- Srividya R., Mallick H.N. and Kumar V.M. (2007). The medial septum acts through the medial preoptic area for thermoregulation and works with it for sleep regulation. *Indian J Physiol Pharmacol* 51(3), 261-273.
- Stankov B. and Kanchev L.N. (1989). Influence of acute stress on the pineal activity during day- and nighttime. *Acta Physiol Pol* 40(1), 116-125.
- Stehle J.H., von Gall C., Schomerus C. and Korf H.W. (2001). Of rodents and ungulates and melatonin: Creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 16(4), 312-325.
- Stehle J.H., von Gall C. and Korf H.W. (2002). Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res* 309(1), 173-182.
- Stellar E. (1954). The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61(1), 5-22.
- Stephan F.K. and Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69(6), 1583-1586.
- Stirland J.A., Johnston J.D., Cagampang F.R., Morgan P.J., Castro M.G., White M.R., Davis J.R., and Loudon A.S. (2001). Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by a pars tuberalis-derived factor. *J Neuroendocrinol* 13(2), 147-157.
- Stoeckel M.E., Hindelang-Gertner C., and Porte A. (1979). Embryonic development and secretory differentiation in the pars tuberalis of the mouse hypophysis. *Cell Tissue Res* 198(3), 465-476.
- Stoeckel M.E., Hindelang C., Klein M.J., Poissonnier M. and Felix J.M. (1994). Expression of the alpha-subunit of glycoprotein hormones in the pars tuberalis-specific glandular cells in rat, mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Res* 278(3), 617-624.
- Stopa E.G., King J.C., Lydic R. and Schoene W.C. (1984). Human brain contains vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide neuronal subpopulations in the suprachiasmatic region. *Brain Res* 297(1), 159-163.
- Strother W.N., Norman A.B. and Lehman M.N. (1998). D1-dopamine receptor binding and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in the fetal and neonatal hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res* 106 (1-2), 137-144.
- Suburo A.M. and Pellegrino de Iraldi A. (1969). An ultrastructural study of the rat's suprachiasmatic nucleus. *J Anat* 105(3), 439-446.
- Sudhakar L.S., Nagpal S.K. and Dhingra L.D. (1987). Histomorphology of the pineal gland of camel (*Camelus dromedarius*). *Haryana Veterinarian* 26, 27-31.
- Sun Z.S., Albrecht U., Zhuchenko O., Bailey J., Eichele G., and Lee C.C. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 90(6), 1003-1011.
- Swansen L.W. and Kuypers H.G. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194, 555-570.
- Takahashi A., Kishi E., Ishimaru H., Ikarashi Y. and Maruyama Y. (2001). Role of preoptic and anterior hypothalamic cholinergic input on water intake and body temperature. *Brain Res* 889 (1-2), 191-199.
- Tanaka M., Okamura H., Matsuda T., Shigeyoshi Y., Hisa Y., Chihara K. and Ibata Y. (1996). Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: a double labeling in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 215(2), 119-122.
- Tanaka M., Hayashi S., Tamada Y., Ikeda T., Hisa Y., Takamatsu T. and Ibata Y. (1997). Direct retinal projections to GRP neurons in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* 8(9-10), 2187-2191.
- Tast A., Halli O., Ahlstrom S., Andersson H., Love R.J. and Peltoniemi O.A. (2001). Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt. *J Pineal Res* 30(1), 43-49.
- Teclemariam-Mesbah R., Kalsbeek A., Pévet P. and Buijs R.M. (1997). Direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection from the suprachiasmatic nucleus to spinal projecting hypothalamic paraventricular neurons. *Brain Res* 14, 748(1-2), 71-76.
- Teclemariam-Mesbah R., Ter Horst G.J., Postema F., Wortel J. and Buijs R.M. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus pineal pathway. *J Comp Neurol* 406(2), 171-182.
- Telleria-Diaz A., Grinevich V.V. and Jirikowski J.F. (2001). Colocalization of vasopressin and oxytocin in hypothalamic magnocellular neurons in water-deprived rats. *Neuropeptides* 35 (3-4), 162-167.
- Tessonnaud A., Cooper H.M., Caldani M., Locatelli A. and Viguier-Martinez MC. (1994). The suprachiasmatic nucleus in the sheep: retinal projections and cytoarchitectural organization. *Cell and Tissue Res* 278(1), 65-84.
- Theodosis D.T. (1985). Oxytocin-immunoreactive terminals synapse on oxytocin neurones in the supraoptic nucleus. *Nature* 313 (6004), 682-684.
- Thierry Roger. (1985). Anatomie Comparée des animaux de Laboratoire: système nerveux et organes des sens: glandes endocrines. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon, France.
- Thind K.K., Boggan J.E. and Goldsmith P.C. (1993). Neuropeptide Y system of the female monkey hypothalamus: retrograde tracing and immunostaining. *Neuroendocrinology* 57(2), 289-298.
- Tillet Y. and Thibault J. (1989). Catecholamine-containing neurons in the sheep brainstem and diencephalon: immunohistochemical study with tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine-beta-hydroxylase (DBH) antibodies. *J Comp Neurol* 290(1), 69-104.
- Tillet Y., Caldani M. and Tramu G. (1989). Immunohistochemical characterization of the sheep suprachiasmatic nucleus. *J Chem Neuroanat* 2(4), 215-226.
- Tillet Y., Thibault J. and Krieger M. (1994). Aromatic L-amino acid decarboxylase immunohistochemistry in the suprachiasmatic nucleus of the sheep. Comparison with tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res* 648(2), 319-323.

- Tokura H. and Aschoff J. (1983). Effects of temperature on the circadian rhythm of pig-tailed macaques *Macaca nemestrina*. *Am J Physiol* 245(6), 800-804.
- Tomaszewska-Zaremba D. and Przekop F. (2006). The role of GABA(A) and GABA(B) receptors in the control of GnRH release in anestrus ewes. *Reprod Biol* 6 Suppl 2, 3-12.
- Toni R., Mosca S., Ruggeri F., Valmori A., Orlandi G., Lechan R.M. and Vezzadini P. (1995). Effect of hypothyroidism on vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in forebrain-neurohypophysial nuclei of the rat brain. *Brain Res* 682 (1-2), 101-115.
- Tramu G. and Leonardelli J. (1979). Immunohistochemical localization of enkephalins in median eminence and adenohypophysis. *Brain Res* 168(3), 457-471.
- Turek F.W. and Van Reeth O. (1996). Circadian Rhythms. In *Handbook of physiology*. M.J. Fregly and C.M. Blatteis Eds. (Oxford University Press, Oxford), pp. 1329-1360.
- Turjanski A.G., Estrin D.A., Rosenstein R.E., McCormick J.E., Martin S.R., Pastore A., Biekofsky R.R. and Martorana V. (2004). NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin. *Protein Sci* 13(11), 2925-2938.
- Turkelson C.M., Thomas C.R., Arimura A., Chang D., Chang J.K. and Shimizu M. (1982). In vitro potentiation of the activity of synthetic ovine corticotropin-releasing factor by arginine vasopressin. *Peptides* 3(2), 111-113.
- Ueda S., Kawata M. and Sano Y. (1983). Identification of serotonin- and vasopressin immunoreactivities in the suprachiasmatic nucleus of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 234(2), 237-248.
- Ueda S., Kawata M. and Sano Y. (1986). Identification of neuropeptide Y immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and the lateral geniculate nucleus of some mammals. *Neurosci Lett* 68(1), 7-10.
- Vacher C.M., Frétier P., Créminon C., Seif I., De Maeyer E., Calas A. and Hardin-Pouzet H. (2003). Monoaminergic control of vasopressin and VIP expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res* 71(6), 791-801.
- Vakkuri O., Lämsä E., Rahkamaa E., Ruotsalainen H. and Leppäluoto J. (1984). Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and ¹H NMR spectroscopy. *Anal Biochem* 142(2), 284-289.
- Valassi E., Scacchi M. and Cavagnini F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18(2), 158-168.
- Vale W., Vaughan J., Smith M., Yamamoto G., Rivier J. and Rivier C. (1983). Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropic cells. *Endocrinology* 113(3), 1121-1131.
- Van Den Pol A.N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191(4), 661-702.
- Van den Pol A.N., Herbst R.S. and Powell J.F. (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 13(4), 1117-1156.
- Van Eerdenburg F.J., Poot P., Molenaar G.J., van Leeuwen F.W. and Swaab D.F. (1990). A vasopressin and oxytocin containing nucleus in the pig hypothalamus that shows neuronal changes during puberty. *J Comp Neurol* 301(1), 138-146.
- Van Eerdenburg F.J.C.M., Swaab D.F. and Van Leeuwen F.W. (1992). Distribution of vasopressin and oxytocin cells and fibres in the hypothalamus of the domestic pig (*Sus scrofa*). *J Comp Neurol* 318(2), 138-146.
- Van Eerdenburg F.J. and Swaab D.F. (1994). Postnatal development and sexual differentiation of pig hypothalamic nuclei. *Psychoneuroendocrinology* 19(5-7), 471-484.
- Van Leeuwen F.W., de Raay C., Swaab D.F. and Fisser B. (1979). The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone in the rat neurohypophysis. *Cell Tissue Res* 202(2), 189-201.
- Vandesande F. and Dierickx K. (1975). Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res* 164 (2), 153-162.
- Vandesande F., Dierickx K. and DeMey J. (1975). Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res* 156 (3), 377-380.
- Vaněček J., Pavlík A. and Illnerová H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435(1-2), 359-362.
- Vivien-Roels B. and Arendt J. (1983). How does the indoleamine production of the pineal gland respond to variations of the environment in a non-mammalian vertebrate, *Testudo hermanni Gmelin*? *Psychoneuroendocrinology* 8(3), 327-332.
- Vivien-Roels B. and Pévet P. (1983). The pineal gland and the synchronization of reproductive cycles with variations of the environmental climatic conditions, with special reference to temperature. *Pineal Res Rev* 1, 91-143.
- Vivien-Roels B., and Pévet, P. (1993). Melatonin: Presence and formation in invertebrates. *Experientia* 49, 642-647.
- Vivien-Roels B., Pitrosky B., Zitouni M., Maln A., Canguilhem B., Bonn D. and Pévet P. (1997). Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 106(1), 85-94.
- Vivien-Roels B., Pévet P., Zarazaga L., Malpoux B. and Chemineau P. (1999). Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-MT) in ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. *J Pineal Res* 27(4), 230-236.
- Vollrath L. (1981). The pineal organ. In Oksche A., Vollrath L. eds *Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Von Gall C., Weaver D.R., Moek J., Jilg A., Stehle J.H. and Korf H.W. (2005). Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci* 1040, 508-511.
- Vrang N., Larsen P.J., Møller M. and Mikkelsen J.D. (1995). Topographical organization of the Rat Suprachiasmatic-Paraventricular Projection. *Journal of comparative neurology* 353(4), 585-603.

- Vrang N., Mikkelsen J.D. and Larsen P.J. (1997). Direct link from the suprachiasmatic nucleus to hypothalamic neurons projecting to the spinal cord: a combined tracing study using cholera toxin subunit B and Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *Brain Res Bull* 44(6), 671-680.
- Vrang N., Mrosovsky N. and Mikkelsen J.D. (2003). Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res Bull* 59(4), 267-288.
- Vyas S., Ravault J.P., Faye B. and Chemineau P. (1997). The nycthemeral rhythm of melatonin secretion in camel (*Camelus dromedarius*). *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 50, 250-260.
- Wamsley J.K., Young W.S. 3rd and Kuhar M.J. (1980). Anatomical localization of enkephalin immunoreactive sites in rat forebrain. *Adv Biochem Psychopharmacol* 22, 257-270.
- Warren E.J., Allen C.N., Brown R.L. and Robinson D.W. (2003). Intrinsic light responses of retinal ganglion cells projecting to the circadian system. *Eur J Neurosci* 17(9), 1727-1735.
- Watanabe K., Yamaoka S., and Vaněček J. (1998). Melatonin inhibits spontaneous and VIP-induced vasopressin release from suprachiasmatic neurons. *Brain Res* 801(1-2), 216-219. Erratum in: *Brain Res* 806(1), 126.
- Weaver D.R., Rivkees S.A. and Reppert S.M. (1989). Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J Neurosci* 9(7), 2581-2590.
- Weaver D.R. and Reppert S.M. (1996). The Mel1a melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8(1), 109-112.
- Weaver D.R., Liu C., and Reppert S.M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10(11), 1478-1487.
- Wever R. (1980). Phase shifts of human circadian rhythms due to shifts of artificial zeitgebers. *Chronobiologia* 7(3), 303-327.
- Wickland C. and Turek F.W. (1994). Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Res* 660(2), 293-300.
- Williams L.M. (1989). Melatonin-binding sites in the rat brain and pituitary mapped by in vitro autoradiography. *J Mol Endocrinol* 3(1), 71-75.
- Williams G., Bing C., Cai X.J., Harrold J.A., King P.J. and Liu X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: Different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74(4-5), 683-701.
- Wilson R.T. (1984). *The Camel*. Longman Group Ltd, (London, New York), pp. 223.
- Winget C.M., Card D.H. and Hetherington N.W. (1968). Circadian oscillations of deep-body temperature and heart rate in a primate (*Cebus albifrons*). *Aerosp Med* 39(4), 350-353.
- Yagil R. (1985). The desert camel. Comparative physiological adaptation. In: *Comparative animal nutrition*, Vol. 5, (Basel, Switzerland, Karger), pp.164.
- Yagita K., Okamura H. and Iбата Y. (1994). Rehydration process from salt-loading: recovery of vasopressin and its coexisting galanin, dynorphin and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the supraoptic and paraventricular nuclei. *Brain Res* 667(1), 13-23.
- Yamase K., Takahashi S., Nomura K., Haruta K. and Kawashima S. (1991). Circadian changes in arginine vasopressin level in the suprachiasmatic nuclei in the rat. *Neurosci Lett* 130(2), 255-258.
- Yang J., Cagampang F.R., Nakayama Y. and Inouye S.I. (1993). Vasoactive intestinal polypeptide precursor mRNA exhibits diurnal variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res* 20(3), 259-262.
- Zhang E.T., Mikkelsen J.D. and Møller M. (1991). Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res* 265(1), 63-71.
- Zine Filali R. (1991). Température corporelle du dromadaire: effet de la privation d'eau d'abreuvement. *Maghr vet* 5(24), 37-40.
- Zoeller R.T., Broyles B., Earley J., Anderson E.R. and Albers H.E. (1992). Cellular levels of messenger ribonucleic acids encoding vasoactive intestinal peptide and gastrin-releasing peptide in neurons of the suprachiasmatic nucleus exhibit distinct 24-hour rhythms. *J Neuroendocrinol* 4(1), 119-124.

ANNEXE

J. Pineal Res. 2005; 39:121–128

Doi:10.1111/j.1600-079X.2005.00224.x

Copyright © Blackwell Munksgaard, 2005
Journal of Pineal Research

Seasonal variations in the nycthemeral rhythm of plasma melatonin in the camel (*Camelus dromedarius*)

Abstract: Seasonal changes in the pattern of plasma melatonin were investigated in two groups of camels (*Camelus dromedarius*): 11 adult and six young camels. Animals were subjected to the outdoor conditions of a desert environment. Blood samples were taken at regular intervals of about 3 hr (added to particular samples at 1 hr before then 30 min and 1 hr after sunset, and 1 hr before and 1 hr after sunrise) for 24 hr at both solstices and equinoxes of the year. The plasma melatonin levels steeply increased soon after sunset and remained elevated throughout all the night. Then, melatonin concentrations progressively declined shortly before sunrise and returned to daytime basal levels 1 hr later. There was no seasonal variation in the amplitude or in the offset of the melatonin peak or in the daytime basal levels. The onset of the nocturnal peak was delayed by 2 hr in June at the summer solstice ($P < 0.05$), which can be related to the changes in night length between the two solstices. A significant effect of age was observed in all seasons. Melatonin levels were higher in the young camel group (fall equinox: $P < 0.001$; spring equinox: $P < 0.01$; winter solstice: $P < 0.01$; summer solstice: $P < 0.05$). The pattern of melatonin secretion in the camel showed a significant seasonal variation parallel to the photoperiodic changes of the year. The observed decline of melatonin levels during an extra-light pulse in the middle of the night indicates the light control of melatonin synthesis. It is not yet known if, in this low latitude desert region, the seasonal breeding period of the camel is cued by the photoperiod. The data obtained, however, clearly demonstrate that the camel has the capacity to follow and to integrate photoperiodic changes through melatonin changes.

**K. El Allail^{1,2}, M. R. Achaaban¹,
B. Vivien-Roels², B. Bothorel²,
N. S. Tligui³ and P. Pévet²**

¹Département d'Anatomie Comparée, Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco; ²Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes, UMR7518 CNRS/UJF, IFR37, Strasbourg, France; ³Département d'Histologie et d'Anatomie Pathologique, IAV Hassan II, Rabat, Morocco

Key words: camel, light pulse, melatonin, photoperiod

Address reprint requests to Paul Pévet, Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes, UMR7518 CNRS/UJF, IFR37, 5, rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg cedex, France.
E-mail: pev@neurochem.u-strasbg.fr

Received December 3, 2004;
accepted February 8, 2005.

Introduction

Many animal species, living in arid and semi-arid regions, present various adaptive strategies in order to cope with this specific and drastic environment. The camel (*Camelus dromedarius*), which is considered as the most adapted large mammal to the desert regions [1, 2], shows important seasonal changes in functions such as reproduction [3, 4]. In Morocco, for example, the breeding season occurs from November to April when 80–90% of the matings are observed (gestation time 12/13 months) [5], this corresponds with the rainfall season in the country. The environmental factors as well as the neuroendocrine mechanisms underlying seasonality in camel breeding are not known. In particular, the exact role of better food availability, change in temperature subsequent to rainfall or photoperiod as external cues is not defined. However, the accurate timing of mating period starting at mid-October [5], suggests an initiation by the decreasing day length [6].

Photoperiod is known to be, in temperate regions, the environmental cue that controls the seasonal reproductive activity in mammalian species. Day length measurement involves the suprachiasmatic nuclei [7], the major circadian

clock in mammals. Photoperiod information is transmitted from the suprachiasmatic nucleus to the pineal *via* a multisynaptic pathway that includes the paraventricular nuclei of the hypothalamus, the intermediolateral cell column of the spinal cord and the superior cervical ganglia [8, 9]. Norepinephrine release during night-time [10] induces melatonin synthesis [11, 12]. High levels of melatonin are thus observed during the night and low levels during the day [13, 14] and the duration of the nocturnal melatonin peak is proportional to the length of the night [15–18]. Experimentally, it has been shown that the organism is informed about photoperiodic changes *via* variations in the duration of the melatonin nocturnal peak [19, 20].

If photoperiod is also an important cue in desert zones, changes in duration of the melatonin nocturnal peak should be present in desert mammals. Little information is available on the pattern of melatonin secretion in camels. There is some evidence of the existence of a 24-hr nycthemeral rhythm and the peak occurs, as in other mammalian species, during the night [21].

The present work was thus conducted to evaluate the seasonal aspect of this rhythm and to investigate whether there are any periodic variations of its parameters in the

camel (*C. dromedarius*). An eventual age-related effect was also investigated.

Material and methods

The present study was carried out at the Laayoun camel research station in the south of Morocco under a desert environment (latitude of 27°50'N) during fall and spring equinoxes, and the winter and summer solstices (from September 2002 to June 2003). The annual photoperiodic variation, at this location, is limited to 03:26 hr. The animals were subjected to the outdoor conditions of light and temperature throughout the study.

Animals

Experiments were conducted on two groups of camels. The first group or adult group ($n = 11$) included nine adult nonpregnant females and two adult males, aged between 8 and 12 yr, weighing 301 ± 4 kg in September, 298 ± 5 kg in December, 302 ± 4 kg in March and 304 ± 4 kg in June. The second group include six sexually inactive young camels, 2–3 yr old, weighing 233 ± 5 kg in September, 246 ± 5 kg in December, 258 ± 5 kg in March and 266 ± 5 kg in June. The body weight was estimated using a pondered equation: weights (kg) = [(HR + TR + GH) × 50], where HR is hump round, TR is thorax round, GH is garrotte height; all of these parameters being expressed in meters.

Before the onset of the study, animals were given doramectine regularly to protect against external and internal parasites and they were vaccinated against poxvirus. Except during the sampling period, the animals were maintained outside in the surrounding pastures during the day and returned to the station by the evening where they were kept in a large enclosed yard (about 800 m²) and received additional food (alfalfa hay, wheat straw, barley, dry beetroot pulp and composed mixture). Water was given once a day to avoid any possibility of dehydration. No major seasonal differences in food intake from the pasture were present during the time of the experiment. Indeed, because of drought during these consecutive years, the pastures were poor during all the seasons and therefore most of the food was obtained in the station.

Experimental design

In both groups, the pattern of melatonin secretion was studied using blood samples of the same animals, following an accurate calendar based on the four cardinal points of the seasonal photoperiodic changes (light/dark cycle): the fall and spring equinoxes and the winter and summer solstices (Table 1).

Seasonal patterns of melatonin secretion

Blood samples were collected about every 3 hr during a 24-hr period. The first sample was taken 1 hr before sunset followed by samples 30 min and 1 hr after sunset and then every 3 hr until dawn. The last dark sample was taken 1 hr before sunrise and the first light sample 1 hr after sunrise

Table 1. Times of sunset and sunrise in the four investigated seasons in Morocco

Seasons	Date	Sunset (hr)	Sunrise (hr)
Spring equinox	21–22 March	19:00	07:00
Fall equinox	22–23 September	18:44	06:44
Summer solstice	21–22 June	19:45	06:02
Winter solstice	22–23 December	17:59	07:42

and then at 3 hr intervals. The rhythm stability was tested by analyzing the patterns of melatonin secretion in two females during three consecutive nights, one at the beginning and the other at the end of the whole study. The accurate timing of dawn and dusk, sunrise and sunset at the place of the experiment, was kindly obtained from the regional Direction of Meteorology of Rabat.

Effect of a light pulse during the night

To determine the response of the pineal gland to a light pulse (300 lux) during the dark, five females were exposed to 1 hr 45 min of extra-light in the middle of the night during December (23:45–01:30 hr). Blood samples were first taken every 15 min for 1 hr in the dark phase (prior to light pulse), then at the same intervals during the light exposure and finally for 1 hr at the same intervals after returning to darkness.

Blood sampling

In both studies, blood samples were taken alternatively from both right and left jugular veins of camels kept in a sternal sitting position. The camels, especially the young, were sampled by taking care to avoid a long stress and the darkness samples were taken under a weak moonlight. Samples were collected into heparinized vacutainer tubes and were immediately centrifuged at 1760g for 30 min. Then plasma was collected and stored at -20°C for subsequent melatonin assay.

Melatonin assay

Circulating melatonin levels were determined by radioimmunoassay. Melatonin was extracted by using dichloromethane [22]. Duplicate aliquots containing each 100 µL of extracted blood plasma were assayed by adding 100 µL of a specific rabbit antiserum (R19540, INRA, Nouzilly, France) and 300 µL of labeled [¹²⁵I]-2-iodomelatonin. The mixture solution was incubated overnight. Then 800 µL of an anti-rabbit γ-globulin were added and tubes were kept refrigerated in ice for 1 hr. Tubes were then centrifuged and the supernatant discarded. The pellet was counted using a γ-ray counter. The assay was validated by comparing parallelism between serial dilutions of night plasma samples and the standard curve (Fig. 1). The inter- and intra-assay coefficients of variation were 4.4 and 5.5% for 5 pg/mL, 5.9 and 7.2% for 50 pg/mL and 9.9 and 5.2% for 200 pg/mL respectively. The detection limit of the assay was 1 pg per tube (10 pg/mL plasma). For samples under the limit of detection this values were arbitrarily assessed.

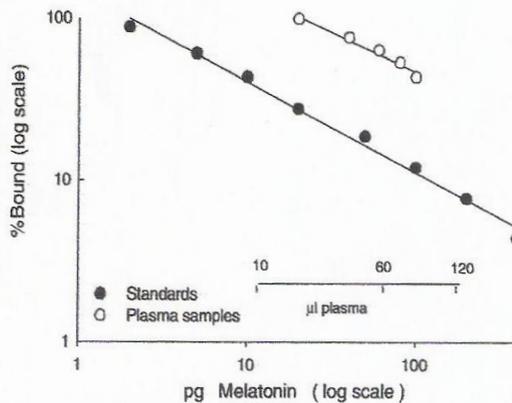


Fig. 1. Parallel inhibition curves obtained with varying quantities of melatonin and serial dilutions of plasma samples.

Statistical analysis

The data of melatonin secretion pattern for each season were treated using a nonlinear regression analysis. The

curve representing the secretion profile was fitted to the curve generated by the following equation [23-25]:

$$f = y_0 + \frac{y_{amp}}{\{1 + \exp[\text{slope1}(\text{phi1} - x)]\} \{1 + \exp[\text{slope2}(x - \text{phi2})]\}}$$

where *f* is the concentration at the *n*th data point, *x* is the time of this *n*th data point, *y*₀ is the basal level measured during daytime, *y*_{amp} is the amplitude of the nocturnal peak, 'phi1' and 'phi2' are the inflection points and represent the time points at which 50% of the maximal increase and 50% of the decline were reached respectively. 'Slope1' and 'slope2' are the slopes of the onset and of the decline of the peak.

The duration of the secretion peak was calculated as the difference between phi1 and phi2. The standard error (S.E.) was given for all regression parameters. For data of each animal and then for the mean of entire animals an unpaired Student's test taking into account the S.E. of the regression was used to reveal any seasonal differences for the regression parameters. An ANOVA combined to the test of Tukey was applied on raw data (all collected data) to investigate the effects of age and of the daytime. For all calendar points, the differences in melatonin concentrations

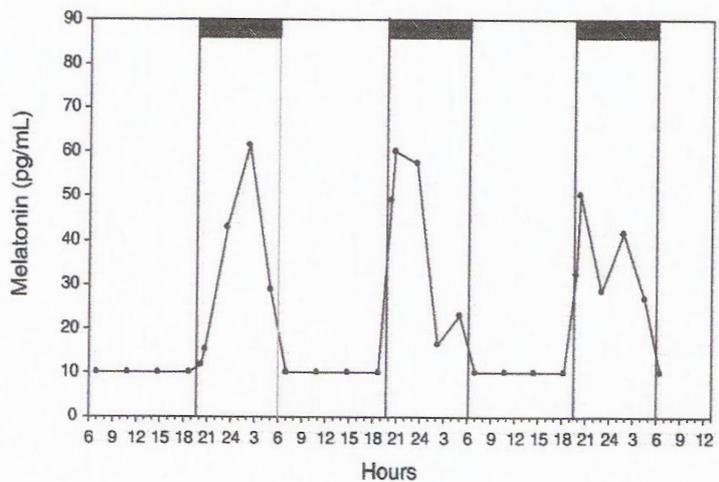
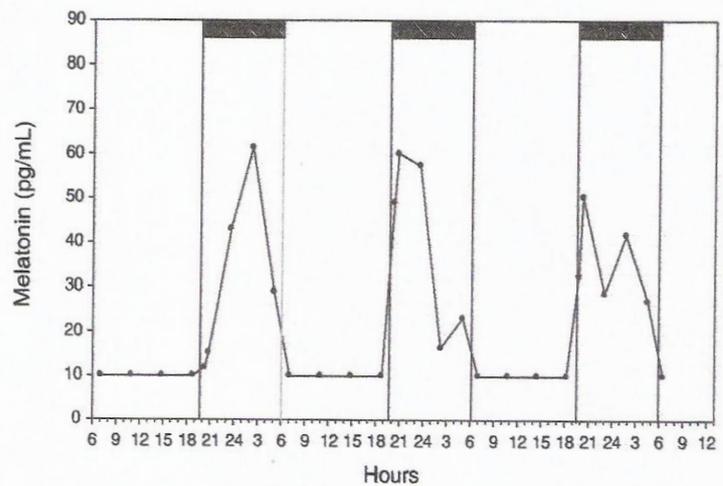


Fig. 2. Melatonin secretion profiles in two female camels over three consecutive nights. The shaded bars indicate the night periods.

between young and adult camels were compared point by point.

Results

The melatonin secretion profile was studied in two females over three consecutive nights (Fig. 2). The results show the presence of large intra-individual variations in the amplitude of the melatonin peaks, affecting the general aspect of the curve from one night to another; however, the duration of the peaks was similar from night to night.

The mean (\pm S.E.M.) profiles of plasma melatonin concentrations are shown during both winter and summer solstices in Figs 3 and 4, for adult and young camels respectively. The plasma melatonin levels were low during the daytime for both young and adult camels. They were around the limit of detection of 10 pg/mL. One half hour after sunset, a marked increase in plasma melatonin concentrations was already observed. Melatonin secretion

steeply increases as soon as dark falls to reach a maximal peak around midnight whatever the photoperiod. Then, 3 hr before sunrise, melatonin concentrations start to decrease gradually to reach again the basal daytime levels 1 hr after sunrise. The same pattern was observed for all individual melatonin secretion curves. However, the nocturnal plasma melatonin concentrations displayed a quite large interval of variation in the peak amplitude, extending from 20 to 200 pg/mL. Large individual variations were also observed in the melatonin secretion profile showing irregular biphasic peaks in some camels. However, the analysis of individual data of melatonin secretion reveals two different profiles showing either small or large peak amplitude.

The results of regression analyses, applied on individual curves of all camels and on the mean curve, did not reveal any seasonal variation in the regression parameter y_0 which represents the daily basal level of melatonin secretion. In all animals, y_0 was under the limit of detection (10 pg/mL)

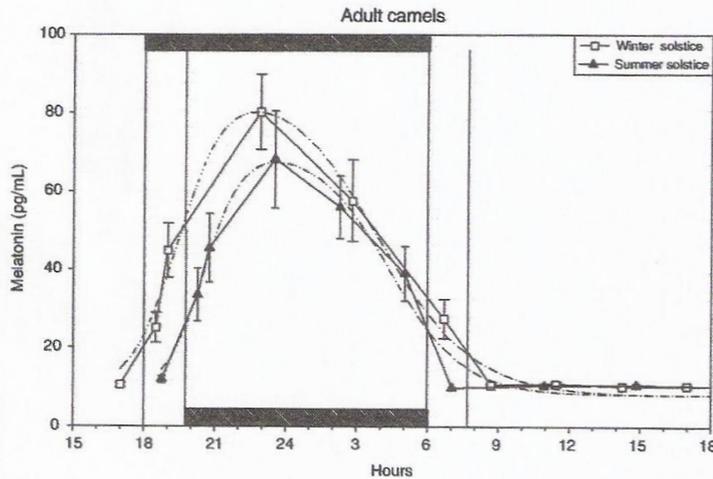


Fig. 3. Seasonal variations in the rhythm of melatonin secretion in adult camels during the two solstices. The shaded bars indicate the night periods. Values are expressed as mean \pm S.E.M.

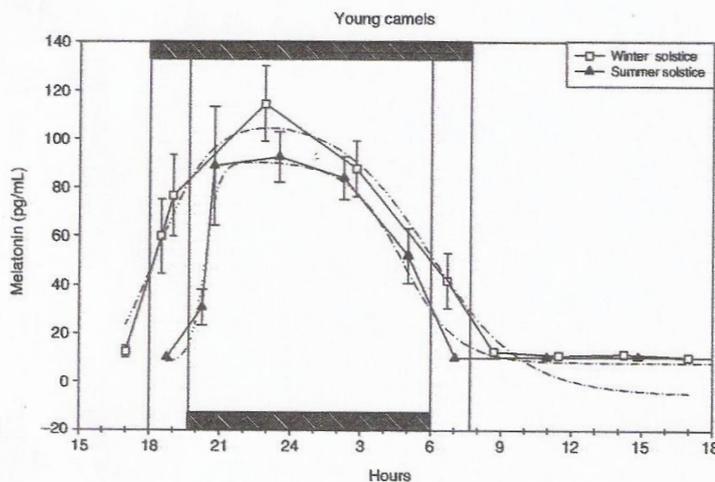


Fig. 4. Seasonal variations in the rhythm of melatonin secretion in young camels during the two solstices. The shaded bars indicate the night periods. Values are expressed as mean \pm S.E.M.

Table 2. Mean values \pm S.E.M. of individual phi1 and phi2 estimated with the nonlinear regressions applied for each animal in winter and summer solstices

	Adult (n = 11)		Young (n = 6)	
	Winter	Summer	Winter	Summer
Phi1	19.16 \pm 0.15	21.42 \pm 0.56	18.60 \pm 0.35	20.98 \pm 0.28
Phi2	28.54 \pm 0.75	27.60 \pm 0.56	29.07 \pm 0.63	27.25 \pm 1.31

during all seasons. No significant seasonal variations in the amplitude (y_{amp}) of the melatonin peak was observed, although higher amplitudes were recorded during the winter solstice in both young and adult camels. The mean values of the individual phi1 and phi2 estimates are shown in Table 2. No significant difference in the decline (phi2) of melatonin release was statistically revealed between the two solstices in any animal. However, the onset of melatonin secretion (phi1) was significantly delayed of approximately 2 hr during the summer solstice as compared with the winter solstice ($P < 0.05$). These differences in the onset between June and December were related to the maximal photoperiodic difference recorded during the year, which corresponds to 03:26 hr.

The plasma melatonin concentrations in five female camels exposed to 1.45 hr of extra-light given at midnight are shown in Fig. 5. Plasma melatonin levels declined after only 15 min of light exposure and reached the daytime basal levels within 30 min. Immediately after returning to the dark, melatonin concentrations began to increase.

Fig. 6 represents the melatonin secretion profiles of young and adult camels during the four seasons. The two-way ANOVA revealed a significant effect of time for all the seasons (fall equinox: $F_{9,150} = 25.14$, $P < 0.001$; spring equinox: $F_{9,150} = 21.98$, $P < 0.001$; winter solstice: $F_{9,150} = 17.65$, $P < 0.001$; summer solstice: $F_{9,150} = 18.30$, $P < 0.001$) due to the rhythmic secretion of the melatonin. The analysis also revealed an effect of age for all seasons melatonin levels were higher in the young camels (fall equinox: $F_{1,150} = 29.04$, $P < 0.001$; spring equinox: $F_{1,150} = 8.49$, $P < 0.01$; winter solstice: $F_{1,150} = 6.97$,

$P < 0.01$; summer solstice: $F_{1,150} = 4.72$, $P < 0.05$). An interaction of both factors was also observed during fall ($F_{9,150} = 5.65$, $P < 0.001$) and spring ($F_{9,150} = 2.33$, $P < 0.05$) equinoxes.

The Tukey test showed that the peak was significantly ($P < 0.05$) higher in the young group than in the adult in the related night samples of both equinoxes, particularly during the fall (September).

Discussion

The environmental factors triggering seasonality of reproduction in the dromedary camel are experimentally still not established. Some variable environmental factors such as rainfall, ambient temperature and humidity have been suggested as possibly important, but there has been no experimental confirmation. Some authors, with stronger arguments, favor instead, food availability and nutrition [2, 26]. Furthermore, decreasing day length was often considered as an important environmental factor [6] but experimental evidence is still lacking. Considering the pattern of melatonin secretion under natural environmental conditions during different seasons in the same animals, the present work demonstrates that camels are able to integrate photoperiodic changes, similarly to other mammals.

The amplitude of the nocturnal melatonin peak showed large inter-individual variations from about 20–200 pg/mL in the camels we studied. These levels are similar to those reported in three female camels in south of France [21] and close to those reported in the wild red deer [27], in goats [28] and in man [29] varying from 50 to 100 pg/mL. However in sheep, melatonin peak levels are much higher ranging from 100 to 600 pg/mL [30, 31], while in other domestic species such as pig, melatonin concentrations are much lower ranging from 10 to 30 pg/mL [18].

Plasma melatonin increases steeply after sunset to reach high levels within 30 min. When a light pulse is applied during the night, plasma melatonin concentrations decline rapidly to basal levels and, as soon as the light is off, they rise to high levels. Camels seem to respond similarly as ungulates [32] for which the rise in plasma melatonin occurs

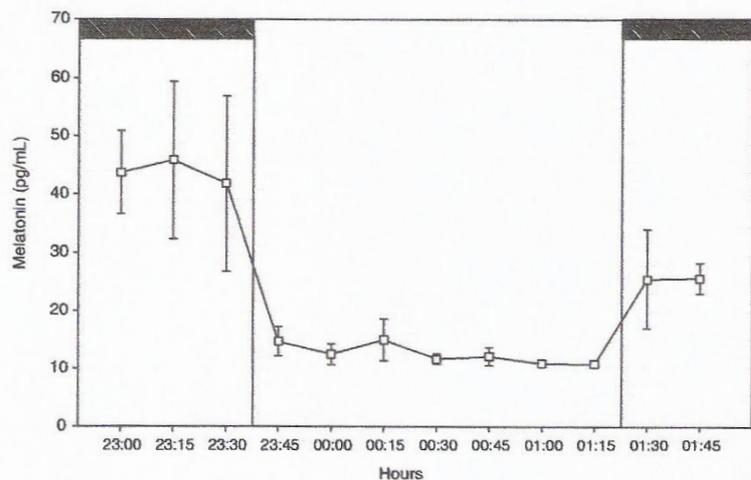


Fig. 5. Plasma melatonin concentrations in five female camels exposed to 1 hr 45 min of light during the night. The shaded bars indicate the night period. Values are expressed as mean \pm S.E.M.

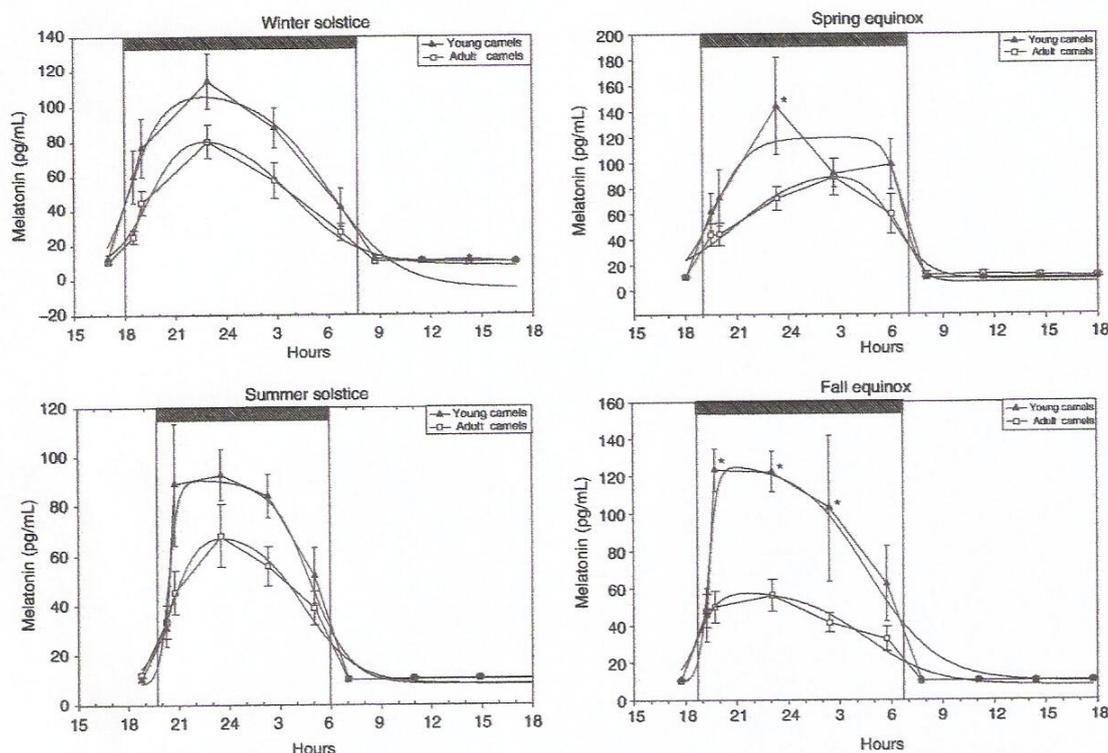


Fig. 6. Comparison, at spring and fall equinoxes and at winter and summer solstices, of plasma melatonin secretion rhythms between adult camel group ($n = 11$) and young group ($n = 6$). The shaded bars indicate the night periods. Values are expressed as mean \pm S.E.M.

rapidly after dark onset and is markedly affected by a light-pulse as already described [31]. This rapid response suggests that regulation of melatonin synthesis may depend on a post-translational regulation of N-acetyltransferase gene expression instead of a transcriptional regulation as the case for rodents [33, 34] for which melatonin synthesis is delayed. Experiments are in progress to test this hypothesis.

In all camels, the trend of the duration of melatonin secretion from sunrise to sunset shows a perfect concordance with the duration of the night during the four seasons. Thus, there is a close relation between melatonin secretion and the photoperiod. In this sense, the camel behaves like most other mammals.

The recorded large variations in plasma melatonin concentrations have been already described by Vyas et al. [21] in three camels in south of France. Such inter-individual variability in the night melatonin pattern was also observed in man [35], in sheep [30], in European wild boar and domestic gilt [18] and in the Iberian red deer [27]. These differences could be induced by a stress caused by blood sampling [36] particularly in a wild species or in domestic animals living wild. However, the repeated venipuncture was reported to induce no stress in camelids including alpacas and lammas when examining the response of serum cortisol [37].

Considering the daily pattern of melatonin secretion over the three nights in two females (Fig. 2) the profile differs from one night to another. The secretion seems not to be a robust individual marker of the circadian clock activity in

the camel as demonstrated in sheep [38] or in rodents [24] with a high reproducibility. However, even if an episodic secretion of melatonin was suggested in many species including sheep [30, 39], pig [18] and human [40], there are few experimental data of its existence. In our study, the time interval of blood sampling (3–4 hr) was not sufficiently frequent to show such an episodic secretion of melatonin in camels. This may also explain the differences in trends over the three night profiles.

It is well established that the duration of melatonin peak secretion is the main parameter that conveys the photoperiodic information to central nervous system and peripheral organs [19]. This 'duration hypothesis' is issued from many experiments in sheep and hamster based on duplicating short or long photoperiodic effects by infusing melatonin into pinealectomized animals [41–44]. In the camel, changes in the duration of melatonin secretion were also observed especially between the two solstices. The moment of the onset of the peak was significantly delayed by about 2 hr in summer solstice compared with that in winter, which expresses changes of night duration. The time of the decline of the peak was statistically the same during the four seasons despite the changes of the time of sunset. In this experiment, only the evening rise in melatonin synthesis varies with seasons. This contrasts with reports in the Syrian hamster [45] or in the *Arvicantis* [46] for which the evening rise in melatonin synthesis occurred at the same time irrespective of the photoperiod. This suggests that, depending on the species, the photoperiodic message could

be integrated independently of the evening component coupled to dusk or the morning component coupled to dawn [47]. Moreover, the large intra-individual variations could have masked a possible effect of seasonal changes in the amplitude of melatonin peak. Nevertheless, melatonin levels tended to be higher during winter solstice compared with summer as already reported in the Syrian hamster [45] and Arctic human residents [48].

The comparison of the pattern of melatonin secretion during the four seasons in young and adult camels reveals that melatonin levels were higher in young camels than in adults. These differences were more obvious at the two equinoxes, especially the fall. This age-related decline in melatonin concentration has also been reported in several species including man [49–51], resulting very probably from an age-dependent decrease in pineal melatonin synthesis.

In conclusion, in the camel living in the Moroccan desert at 27°50'N latitude, the pattern of melatonin secretion exhibits a clear seasonal variation in the duration of the peak depending on photoperiodic changes. The camel is, thus, able to integrate the low photoperiodic variations within this part of the world which lends credibility to the hypothesis that camels may use photoperiodic cues to synchronize their breeding season. However, further investigations are required to examine this hypothesis.

Acknowledgments

This work was supported by scientific exchange program between Morocco and France (PRAD n° 10/03). The authors thank Dr J. Malik, all staff of 'DPA' of Laayoune and the 'direction d'élevage' of Agricultural ministry for their kind help, Prof. J.P. Ravault for kindly providing the melatonin antibody and B. Tournier for his help in the statistical data analysis.

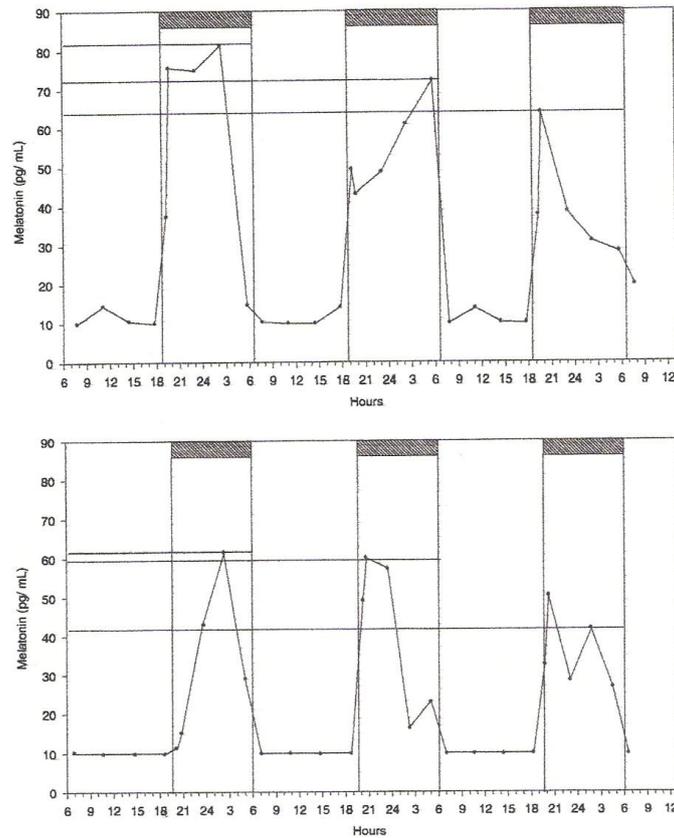
References

- SCHMIDT-NIELSEN K, SCHMIDT-NIELSEN B, JARNUM SA et al. Body temperature of the camel and its relation to water economy. *Am J Physiol* 1957; **188**:103–112.
- WILSON RT. The Camel. Longman Group Ltd, London, New York, 1984; pp. 223.
- SHALASH MR. Some reproductive aspects in the female camel. *World Rev Anim Prod* 1965; **4**:103–108.
- AL EKNAH MM. Reproduction in Old World camels. *Anim Reprod Sci* 2000; **60–61**:583–592.
- SGHIRI A, DRIANCOURT MA. Seasonal effects on fertility and ovarian follicular growth and maturation in camels (*Camelus dromedarius*). *Anim Reprod Sci* 1999; **55**:223–237.
- MUSA BE, SIEMA H, MERKT H et al. Manipulation of reproductive functions in male and female camels. *Anim Reprod Sci* 1993; **33**:289–306.
- TOURNIER BB, MENET JS, DARDENTE H et al. Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 2003; **118**:317–322.
- LARSEN PJ, ENQUIST LW, CARD JP. Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur J Neurosci* 1998; **10**:128–145.
- TECLEMARIAM-MESBAH R, TER HORST GJ, POSTEMA F et al. Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol* 1999; **406**:171–182.
- DRIJFHOUT WJ, VAN DER LIJ A, DE VRIES JB et al. Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenergic release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* 1996; **202**:185–188.
- KING TS, STEINLECHNER S. Pineal indolalkylamine synthesis and metabolism: kinetic considerations. *Pineal Res Rev* 1985; **3**:69–113.
- STEHLE JH, VON GALL C, SCHOMERUS C et al. Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms* 2001; **16**:312–325.
- ARENDET J. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1986; **8**:266–320.
- REITER RJ. Normal patterns of melatonin levels in the pineal gland and body fluids of humans and experimental animals. *J Neural Transm Suppl* 1986; **21**:35–54.
- ILLNEROVA H, HOFFMAN K, VANECEK J. Adjustment of pineal melatonin and N-acetyltransferase rhythms to change from long to short photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Neuroendocrinology* 1984; **38**:226–231.
- PÉVET P, VIVIEN-ROELS B, MASSON-PÉVET M. Annual changes in the daily pattern of melatonin synthesis and release. In: Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation. Fraschini F, Reiter RJ, eds. Plenum press, New York, 1991; pp. 147–158.
- REITER RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; **49**:654–664.
- TAST A, HALLI O, AHLSTROM S et al. Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt. *J Pineal Res* 2001; **30**:43–49.
- BARTNESS TJ, POWERS JB, HASTINGS MH et al. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 1993; **15**:161–190.
- GOLDMAN BD. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 2001; **16**:283–301.
- VYAS S, RAVAVULT JP, FAYE B et al. The nycthemeral rhythm of melatonin secretion in camel (*Camelus dromedarius*). *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* 1997; **50**:250–260.
- BROWN GM, SEGGE J, GROTA LJ. Serum melatonin response to melatonin administration in the Syrian hamster. *Neuroendocrinology* 1985; **41**:31–35.
- VIVIEN-ROELS B, PITROSKY B, ZITOUNI M et al. Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 1997; **106**:85–94.
- BARASSIN S, SABOUREAU M, KALSBECK A et al. Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res* 1999; **27**:193–201.
- BOTHOREL B, BARASSIN S, SABOUREAU M et al. In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of the pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eu J Neurosci* 2002; **16**:1090–1098.
- CRISTOFORI P, ARIA G, SEREN E et al. Endocrinological aspects of reproduction in the female camel. *World Anim Rev* 1986; **57**:22–25.
- GARCIA A, LANDETE-CASTILLEJOS T, ZARAZAGA L et al. Seasonal changes in melatonin concentrations in female Iberian

- red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J Pineal Res* 2003; **34**:161–166.
28. DELGADILLO JA, CHEMINEAU P. Abolition of the seasonal release of luteinizing hormone and testosterone in Alpine male goats (*Capra hircus*) by short photoperiodic cycles. *J Reprod Fertil* 1992; **94**:45–55.
 29. BROADWAY J, ARENDT J, FOLKARD S. Bright light phase shifts the human melatonin rhythm during the Antarctic winter. *Neurosci Lett* 1987; **79**:185–189.
 30. MALPAUX B, ROBINSON JE, BROWN MB et al. Reproductive refractoriness of the ewe to inductive photoperiod is not caused by inappropriate secretion of melatonin. *Biol Reprod* 1987; **36**:1333–1341.
 31. VIVIEN-ROELS B, PEVET P, ZARAZAGA L et al. Daily and light-at-night induced variations of circulating 5-methoxytryptophol (5-ML) in ewes with respectively high and low nocturnal melatonin secretion. *J Pineal Res* 1999; **27**:230–236.
 32. RAVAUULT JP, CHESNEAU D. Melatonin secretion in rams maintained in constant darkness depends on the timing of a single 1-hour light pulse given the previous night. *J Pineal Res* 1996; **21**:218–224.
 33. ROSEBOOM PH, KLEIN DC. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol* 1995; **47**:439–449.
 34. FOULKES NS, DUVAL G, SASSONE-CORSI P. Adaptive inducibility of CREM as transcriptional memory of circadian rhythms. *Nature* 1996; **381**:83–85.
 35. CLAUSTRAT B, BRUN J, CHAZOT G. Melatonin in humans, neuroendocrinological and pharmacological aspects. *Int J Rad Appl Instrum B* 1990; **17**:625–632.
 36. STANKOV B, KANCHEV LN. Influence of acute stress on the pineal activity during day- and nighttime. *Acta Physiol Pol* 1989; **40**:116–125.
 37. ANDERSON DE, SILVEIRA F, GRUBB T. Effects of venipuncture and correlation of plasma, serum and saliva cortisol concentration with transportation stress in camelids. *J Camel Pract Res* 1999; **6**:249–254.
 38. CHEMINEAU P, DE BELTRAN HEREDIA I, DAVEAU A et al. High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentration in the Ile-de-France ewe. *J Pineal Res* 1996; **21**:1–6.
 39. COZZI B, RAVAUULT JP, FERRANDI B et al. Melatonin concentrations in the sinus rectus of the sheep and evidence for its episodic release. *J Pineal Res* 1988; **5**:535–546.
 40. PENNY R. Episodic secretion of melatonin in pre- and post-pubertal girls and boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; **60**:751–756.
 41. CARTER DS, GOLDMAN BD. Antigonadal effects of timed melatonin infusion in pinealectomized male Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): duration is the critical parameter. *Endocrinology* 1983; **113**:1261–1267.
 42. KARSCH FJ, BITTMAN EL, FOSTER DL et al. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Rec Prog Horm Res* 1984; **40**:185–232.
 43. PITROSKY B, MASSON-PEVET M, KIRSCH R et al. Effects of different doses and durations of melatonin infusions on plasma melatonin concentrations in pinealectomized Syrian hamsters: consequences at the level of sexual activity. *J Pineal Res* 1991; **11**:149–155.
 44. PÉVET P, BOTHOREL B, SLOTTEN H et al. The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res* 2002; **309**:183–191.
 45. BRAINARD GC, PETERBORGH LJ, RICHARDSON BA et al. Pineal melatonin in syrian hamsters: circadian and seasonal rhythms in animals maintained under laboratory and natural conditions. *Neuroendocrinology* 1982; **35**:342–348.
 46. GARIDOU-BOOF ML, SICARD B, BOTHOREL B et al. Environmental control and adrenergic regulation of pineal activity in the diurnal tropical rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *J Pineal Res* 2005; **38**:189–197.
 47. ILLNEROVA H, VANECEK J. Two-oscillator structure of the pacemaker controlling the circadian rhythm of *N*-acetyltransferase in the rat pineal gland. *J Comp Physiol* 1992; **145**:539–641.
 48. STOKKAN K, REITER RJ. Melatonin rhythm in Arctic urban residents. *J Pineal Res* 1994; **16**:33–36.
 49. PANG SF, TANG F, TANG PL. Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal *N*-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J Exp Zool* 1984; **229**:41–47.
 50. HOFFMANN K, ILLNEROVA H, VANECEK J. Comparison of pineal melatonin rhythms in young adult and old Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) under long and short photoperiods. *Neurosci Lett* 1985; **56**:39–43.
 51. SACK RL, LEWY AJ, ERB DL et al. Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 1986; **3**:379–388.

Erratum

In the paper by El Allali et al. [1], there was an error in the reproduction of Fig. 2. The following figure should replace Fig. 2 in the manuscript.



Reference

1. EL ALLALI K, ACHAABAN MR, VIVIEN-ROELS B, BOTHOREL B, TLIGUI NS, PÉVET P. Seasonal variations in the nycthemeral rhythm of plasma melatonin in the camel (*Camelus dromedarius*). *J Pineal Res* 2005; 39:121–128.

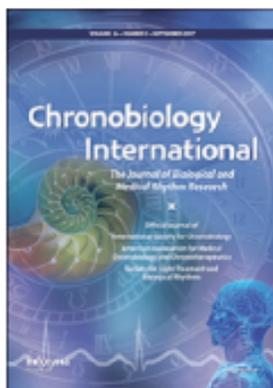
This article was downloaded by: [BIUS Jussieu/Paris 6]

On: 17 September 2008

Access details: Access Details: [subscription number 770172261]

Publisher Informa Healthcare

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Chronobiology International

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpplfile~content=1713597233>

Daily Aa-nat Gene Expression in the Camel (*Camelus dromedarius*) Pineal Gland

Khalid El Ailali ^a, Natalia Sinitskaya ^b, Béatrice Bothorel ^b, Rachid Achaaben ^a, Paul Pévet ^b, Valérie Simonneaux ^b

^a Unité d'Anatomie Comparée, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco ^b Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

Online Publication Date: 01 September 2008

To cite this Article El Ailali, Khalid, Sinitskaya, Natalia, Bothorel, Béatrice, Achaaben, Rachid, Pévet, Paul and Simonneaux, Valérie(2008)Daily Aa-nat Gene Expression in the Camel (*Camelus dromedarius*) Pineal Gland,Chronobiology International,25:5,800 – 807

To link to this Article: DOI: 10.1080/07420520802384085

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07420520802384085>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

SHORT COMMUNICATION

DAILY AA-NAT GENE EXPRESSION IN THE CAMEL (*CAMELUS DROMEDARIUS*) PINEAL GLAND

Khalid El Allali,^{1,2} Natalia Sinitskaya,² Béatrice Bothorel,²
Rachid Achaaban,¹ Paul Pévet,² and Valérie Simonneaux²

¹Unité d'Anatomie Comparée, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco

²Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

Arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AA-NAT) is the rhythm-generating enzyme for the synthesis of pineal melatonin. Molecular investigations have revealed two biological models for the activation of AA-NAT. In rodent species, *Aa-nat* gene transcription is turned off during the daytime and markedly activated at night. In primates, sheep, and cows, the *Aa-nat* gene is constitutively transcribed with no visible daily variations. This inter-species difference in *Aa-nat* gene regulation leads to different daily profiles in melatonin synthesis and release. Thus, the nighttime onset of the rise in circulating melatonin is delayed and slow in rodents, whereas it is fast and sharp in sheep. In the camel (*Camelus dromedarius*), we have observed that circulating melatonin rises immediately after sunset, suggesting AA-NAT activity is regulated at the post-transcriptional level. In agreement with this hypothesis, we report herein the amount of *Aa-nat* mRNA in the camel pineal gland is high, during both the day and night with no daily variations, while melatonin concentration in the same pineal tissue is five times higher during the night than daytime. (Author correspondence: simonneaux@neurochem.u-strasbg.fr)

Keywords AA-NAT, Pineal, Melatonin, Camel

INTRODUCTION

Arylalkylamine *N*-acetyltransferase (AA-NAT) is the rate-limiting and rhythm-generating enzyme for melatonin synthesis, a pineal hormone pivotal for the synchronization of numerous biological functions with the

Submitted February 22, 2008, Returned for revision March 11, 2008, Accepted March 27, 2008
Address correspondence to Valérie Simonneaux, Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR 7168 CNRS/ULP, 5 rue Blaise pascal, Strasbourg 67084, France. E-mail: simonneaux@neurochem.u-strasbg.fr

daily and annual variations of environmental factors (Simonneaux & Ribelayga, 2003). In mammals, the nocturnal increase in melatonin synthesis depends on the nocturnal release of norepinephrine (NE) controlled by the biological clock located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. NE binds to adrenergic receptors to increase both cAMP and Ca^{2+} , leading to a large activation of cAMP-dependent (PKA) protein kinase. This step is crucial for the activation of AA-NAT. Strikingly, mechanisms involved in AA-NAT activation display marked species variation (Klein et al., 1997). In the rat, as in other rodents, nocturnal enzyme activation by NE depends on a marked increase in *Aa-nat* gene transcription followed by protein synthesis and activation (Garidou et al., 2002, 2003a, 2003b; Gauer et al., 1999; Roseboom et al., 1996, 1998). In sheep, as well as in cows, primates, and humans, AA-NAT mRNA and protein are constitutively synthesized; during the day, AA-NAT is proteolyzed, while during the night PKA inhibits proteasomal activity to save and activate AA-NAT (Coon et al., 1995, 1996, 2001, 2002; Craft et al., 1999; Ganguly et al., 2001; Schomerus et al., 2000). The consequence of such species differences in AA-NAT activation is a different pattern in the rise of circulating melatonin onset at night, being delayed and slow in rodents but rapid and sharp in sheep and primates.

We recently analyzed the daily profile of plasma melatonin in camels (*Camelus dromedarius*) and found that melatonin increased steeply after sunset to reach high levels within 30 min (El Allali et al., 2005). The daily pattern of circulating melatonin in camels, therefore, appears similar to that of sheep and primates, and suggests that AA-NAT activation is controlled at the post-transcriptional level. In order to test this hypothesis, the level of *Aa-nat* mRNA was examined in the pineal of camels sampled during day and night time.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Tissue Sampling

The present study was conducted on camels (*Camelus dromedarius*) at the Eddakhla camel slaughterhouse in the south of Morocco under a desert environment (latitude of 23°43' N, 15°57' W). The animals were subjected to the outdoor conditions of light and temperature until slaughtering in the spring equinox (12 h light: 12 h dark). The experimental protocol conformed to international ethical standards (Touitou et al., 2006).

The pineal glands and a piece of cortex were sampled immediately after the slaughtering of the camels during the day (from 07:30 to 13:30 h; n = 2 males and n = 2 females 3 to 5 yrs of age) or during the night in total darkness (01:00 to 04:00 h; n = 8 males and n = 1 female 3

to 4 yrs of age). Tissue were rapidly frozen and stored at -80°C until processing. Each pineal was divided in two parts: one for *Aa-nat* mRNA analysis by in situ hybridization and one for melatonin analysis by radioimmunoassay and protein measurement.

In situ Hybridization

Radioactive in situ hybridization was performed on frozen camel pineal slices (six slices/pineal) as previously described (Sinitskaya et al., 2006). Sections ($20\ \mu\text{M}$) of camel pineal or cortex tissue were cut at -16°C in a cryostat and thaw-mounted onto gelatin-coated slides. Sections were first fixed, acetylated, and dehydrated, then hybridized overnight at 37°C in a humid chamber with a mixture of three ^{35}S -ATP end-labeled oligoprobes ($[^{35}\text{S}]$ deoxy-ATP (1250 Ci/mmol, Perkin Elmer, Zaventrum, Belgium) using terminal transferase (Roche, Meylan, France). The radiolabelled oligoprobe cocktail was added at a specific activity of 10^7 cpm/ml to the hybridization medium. The sequences of the oligonucleotides were designed from rat *Aa-nat* sequence (NM_012818: oligo 1: 251–300, oligo 2: 491–537, oligo 3: 774–823) in order to span the gene coding sequence and override putative heterogeneity between the camel and rat sequence. This technique was previously used in studies of the Syrian hamster pineal with good results (Sinitskaya et al., 2006). After hybridization, sections were washed, dehydrated, and exposed to a Kodak BioMax MR Film (Sigma-Aldrich, Lyon, France) for five days along with ^{14}C -radioactive standards to allow standardization of densitometric measurements across films. X-ray films were scanned on an Epson 4990 transmittance scanner (Levallois-Perret, France), and the background was removed. Calibrated optical density measurements of mRNA levels were performed using ImageJ (National Institutes of Health). The specific labeling was determined as the difference between pineal and cortex labeling. Day and night rat pineal glands were used as an internal control for *Aa-nat* hybridization and gave the expected dramatic increase (data not shown) in *Aa-nat* mRNA level at night (Garidou et al., 2002; Roseboom et al., 1996).

Melatonin Radioimmunoassay in the Camel Pineal Tissue

A part of the second half of each camel pineal was sonicated in $500\ \mu\text{L}$ tricine buffer. Two times $100\ \mu\text{L}$ were taken for duplicate melatonin assay, as reported previously (Garidou et al., 2002). Melatonin concentration is expressed in ng per mg of protein measured by the method of Lowry et al. (1951).

RESULTS AND DISCUSSION

The hybridization signal was detected both in the camel (see Figure 1A) and rat (not shown) pineal gland using the mixture of *Aa-nat*

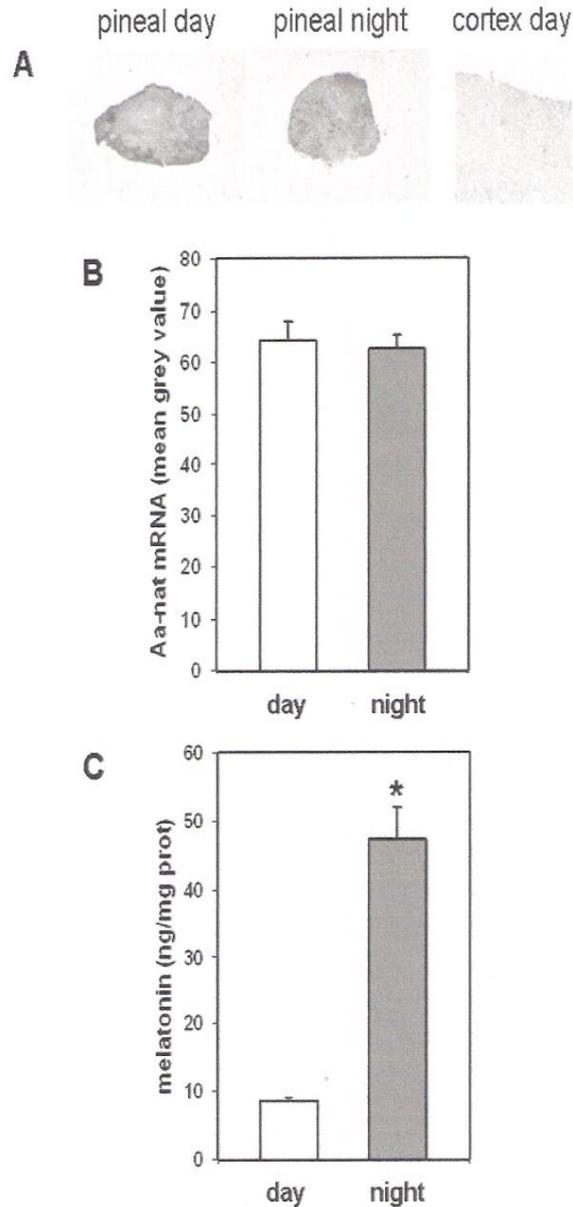


FIGURE 1 Day/night variation in *Aa-nat* mRNA and melatonin content in the camel pineal gland. The pineal gland of the camel was sampled during either the day ($n = 4$) or night ($n = 9$), frozen, and divided into two parts. One-half was sliced and processed for in situ hybridization for *Aa-nat* (A, B), and the other half was homogenized in Tricine buffer for melatonin and protein assay (C). A: Example of tissue sections from day or night camel pineal and camel cortex hybridized with radioactive *Aa-nat* antisense oligoprobe. B: Quantification value of *Aa-nat* hybridization signal in the pineal of the camel sampled during the day ($n = 4$) or night ($n = 9$). C: Melatonin concentration in the pineal of the camel sampled during the day ($n = 4$) or night ($n = 9$). * $p < 0.05$ as compared to daytime values by Student t-test.

oligonucleotides. The hybridization appeared specific, as the labeling in the camel (Figure 1A) and rat (not shown) cortex was much lighter than that in the pineal tissue. Although the hybridization on camel pineal tissue was done using heterologous oligoprobes, it is unlikely that the signal obtained reflects hybridization to mRNAs different to *Aa-nat*. Indeed, there is a high homology between *Aa-nat* sequences among mammalian species, and the oligoprobe sequences were chosen within the highest conserved region of cloned *Aa-nat* genes. The special distribution correspond to that which is expected for *Aa-nat*.

Aa-nat mRNA was homogenously distributed throughout the camel pineal tissue of all animals tested, indicating that this tissue is rather homogenous and contains a high density of pinealocytes. This is consistent with the histology of the pineal gland of this (Sudhakar et al., 1987) and other species (Moller & Baeres, 2002).

Quantitative analysis of the *Aa-nat* hybridization signal in the camel pineal gland showed no significant difference between the day and night time (see Figure 1B). The absence of day/night variation in *Aa-nat* mRNA levels was not related to any deficiency of the study protocol, as, in agreement with a previous study showing a marked daily rhythm in circulating melatonin in the camel (El Allali et al., 2005), we found the pineal concentration of melatonin was increased by about five-fold from day to night (see Figure 1C).

This observation suggests that in the camel pineal gland, *Aa-nat* is constitutively expressed throughout the day, and its transcription is, therefore, not acutely regulated by the nocturnal surge of norepinephrine. A similar regulation has been reported in the pineal gland of other species, like sheep (Coon et al., 1995; Johnston et al., 2004), primates (Coon et al., 2002), cows (Craft et al., 1999), and humans (Ackermann et al., 2006; Coon et al., 1996). The mechanisms of AA-NAT activation have been well studied in bovine pinealocytes (Schomerus et al., 2000). Briefly, it was demonstrated that *Aa-nat* transcripts are translated into AA-NAT protein during both the day and night; during the day, however, AA-NAT protein is immediately degraded by proteolysis, whereas during the night the proteolytic activity is inhibited by noradrenergic-driven activation of PKA. The consequence of such a post-traductional regulation of AA-NAT activity is the rapid and sharp rise of circulating melatonin soon after night onset (Hedlund et al., 1977; Namboodiri et al., 1985; Reppert et al. 1979). In rodents, in contrast, *Aa-nat* is not expressed during the day, and the noradrenergic activation of PKA induces a large transcriptional activation of *Aa-nat* mostly via phosphorylation of CREB into p-CREB as well as inhibition of the neo-synthesized AA-NAT proteolysis (Garidou et al., 2002, 2003a, 2003b; Gastel et al., 1998; Roseboom et al., 1995, 1996). In rodents, therefore, the nocturnal rise of circulating melatonin is slower and delayed after night onset (Axelrod et al., 1974;

Garidou et al., 2002, 2003a, 2003b). The functional significance of such differences in the regulatory mechanisms of melatonin synthesis between rodents and ungulates/primates is so far unknown (Stehle et al., 2001).

The high and constant level of pineal *Aa-nat* mRNA observed during the day and night indicates that the mechanisms involved in melatonin synthesis in the camel are similar to those described in the sheep. This conclusion is in agreement with our previous observation of a rapid and sharp increase in plasma melatonin concentration in the camel soon after night onset (El Allali et al., 2005). In conclusion, this study shows that in the camel, as in other ungulates, the daily regulation of AA-NAT activity involves post-transcriptional mechanisms leading to a square-shaped nocturnal peak of melatonin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by scientific exchange programs between Morocco and France (PRAD n_05/07; GDRI CNRS-CNRST) and PROFERD, the program to research and development of the Moroccan agricultural Ministry. The authors thank the veterinary staff of civil and military group of Eddakhla, Mr. Mohcine Hadaoui, Dr. Lahcen Boukbir, Dr. Hakim Chaaibi, and Dr. Mourad El Allouchi, for their kind and precious help, as well as Prof. J.P. Ravault for kindly providing the melatonin antibody.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Ackermann K, Bux R, Rüb U, Korf HW, Kauert G, Stehle JH. (2006). Characterization of human melatonin synthesis using autaptic pineal tissue. *Endocrinology* 147:3235–3242.
- Axelrod J. (1974). The pineal gland: A neurochemical transducer. *Science* 184:1341–1348.
- 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.
- Coon SL, Mazuruk K, Bernard M, Roseboom PH, Klein DC, Rodriguez IR. (1996). The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): Structure, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34:76–84.
- Coon SL, Weller JL, Korf H-W, Namboodiri MAA, Rollag M, Klein DC. (2001). cAMP regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87): A new cell line (1e7) provides evidence of intracellular Aanat activation. *J. Biol. Chem.* 275:24097–24107.
- Coon SL, Del Olmo E, Young WS, Klein DC. (2002). Melatonin synthesis enzymes in *Macaca mulatta*: Focus on arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:4699–4706.

- Craft CM, Murage J, Brown B, Zhan-Poe X. (1999). Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 65:44–51.
- El Allali K, Achaaban MR, Vivien-Roels B, Bothorel B, Tligui NS, Pévet P. (2005). Seasonal variations in the nycthemeral rhythm of plasma melatonin in the camel (*Camelus dromedarius*). *J. Pineal Res.* 39: 121–128.
- Ganguly S, Gastel JA, Weller JL, Schwartz C, Jaffe H, Namboodiri MA, Coon SL, Hickman AB, Rollag M, Obsil T, Beauverger P, Ferry G, Boutin JA, Klein DC. (2001). Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *PNAS* 98:8083–8088.
- Garidou ML, Gauer F, Vivien-Roels B, Sicard B, Pévet P, Simonneaux V. (2002). Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent. *Arvicanthis ansorgei*. *Eur. J. Neurosci.* 15:1632–1640.
- Garidou ML, Diaz E, Calgari C, Pévet P, Simonneaux V. (2003a). Transcription factors may frame Aanat gene expression and melatonin synthesis at night in the Syrian hamster pineal gland. *Endocrinology* 144:2461–2472.
- Garidou ML, Vivien-Roels B, Pévet P, Miguez J, Simonneaux V. (2003b). Mechanisms regulating the marked seasonal variations in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am. J. Physiol.* 284:R1043–R1052.
- Gastel JA, Roseboom PH, Rinaldi PA, Weller JL, Klein DC. (1998). Melatonin production: Proteasomal proteolysis in serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science* 279:1358–1560.
- Gauer F, Poirel VJ, Garidou ML, Simonneaux V, Pévet P. (1999). Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Mol. Brain Res.* 71:87–95.
- Hedlund L, Lischko MM, Rollag MD, Niswender GD. (1977). Melatonin, daily cycle in plasma and cerebrospinal fluid of calves. *Science* 195:686–687.
- Johnston JD, Bashforth R, Diack A, Andersson H, Lincoln GA, Hazlerigg DG. (2004). Rhythmic melatonin secretion does not correlate with the expression of arylalkylamine N-acetyltransferase, inducible cyclic amp early repressor, period1 or cryptochromel mRNA in the sheep pineal. *Neuroscience* 124:789–795.
- Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Bégay V, Falcón 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.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- Moller M, Baeres FM. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 309:139–150.
- Namboodiri MA, Sugden D, Klein DC, Grady R Jr, Mefford IN. (1985). Rapid nocturnal increase in ovine pineal N-acetyltransferase activity and melatonin synthesis: Effects of cycloheximide. *J. Neurochem.* 45:832–835.
- Reppert SM, Perlow MJ, Tamarkin L, Klein DC. (1979). A diurnal melatonin rhythm in primate cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 104:295–301.
- 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.
- Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. (1996). Melatonin synthesis: Analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* 137:3033–3045.
- Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, Popescu NC, Rodriguez IR, Gastel JA, Klein DC. (1998). Natural melatonin “knockdown” in C57BL/6J mice: Rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 63:189–197.
- Schomerus C, Korf HW, Laedtke E, Weller JL, Klein DC. (2000). Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: An example from the pineal gland. *J. Neurochem.* 75:2123–2132.
- Simonneaux V, Ribelayga C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55:325–395.

- Sinitskaya N, Salingre A, Klosen P, Revel FG, Pévet P, Simonneaux V. (2006). Differential expression of activator protein-1 proteins in the pineal gland of Syrian hamster and rat may explain species diversity in arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression. *Endocrinology* 147:5052–5060.
- Stehle JH, von Gall C, Schomerus C, Korf HW. (2001). Of rodents and ungulates and melatonin: Creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J. Biol. Rhythms* 16: 312–325.
- Sudhakar LS, Nagpal SK, Dhingra LD. (1987). Histomorphology of the pineal gland of camel (*Camelus dromedarius*). *Haryana Veterinarian*. 26:27–31.
- Touitou Y, Smolensky MH, Portaluppi F. (2006). Ethics, standards and procedures in human and animal research in chronobiology. *Chronobiol. Int.* 23:1083–1096.

RESUME

La plupart des Mammifères doivent s'adapter à leurs biotopes pour survivre. Dans les zones arides et désertiques, le Dromadaire (*Camelus dromedarius*) est exposé à des variations extrêmes de température, à un climat sec et chaud tout le long de l'année, à une rareté de la disponibilité alimentaire des parcours et surtout à un manque des points d'abreuvement. Dans un tel biotope, à côté de la photopériode qui marque chaque saison, nous avons supposé que d'autres facteurs peuvent entraîner l'horloge biologique et permettre ainsi aux animaux d'adapter par anticipation, leurs fonctions biologiques.

Dans un premier temps, nous avons vérifié si chez le Dromadaire vivant dans les zones désertiques du Sud Marocain, où la photopériode varie peu (03h26 min/an), des variations saisonnières du rythme des concentrations plasmatiques de mélatonine étaient observées. Nous avons démontré que le profil de la sécrétion de cette hormone présente des variations saisonnières parallèles aux changements annuels de la photopériode. Cet animal est donc capable de mesurer et d'intégrer l'information photopériodique, même si celle-ci varie peu au cours de l'année.

Nous avons remarqué que les concentrations plasmatiques en mélatonine présentent des réponses rapides à la lumière dans le sens d'une forte diminution et que leur augmentation se fait rapidement dans les 30min après le coucher du soleil. Cette montée rapide est probablement le résultat d'un état constitutif de la synthèse de l'AA-NAT, dont la régulation et l'activation seraient induites par un mécanisme post-transcriptionnel comme chez d'autres espèces dont le Mouton. Afin de tester cette hypothèse les niveaux des ARNm du gène *Aa-nat* ont été comparés dans des glandes pinéales prélevées pendant le jour et pendant la nuit. Le résultat démontre que le niveau d'ARNm de l'AA-NAT du jour est égale à celui de la nuit et ce malgré les concentrations différentes de la mélatonine (6 fois plus élevées la nuit). Ceci démontre que dans la glande pinéale du Dromadaire, comme chez beaucoup de ruminants, l'expression des ARNm de l'AA-NAT est constitutive et que la libération nocturne de la noradrénaline induit la synthèse de la mélatonine en agissant à un stade post transcriptionnel de la régulation l'enzyme.

Dans un troisième temps, nous avons voulu étudier chez cette espèce, les phénotypes neurochimiques des neurones des noyaux suprachiasmatiques (SCN), lieu de l'horloge biologique. Nous avons également analysé les différentes innervations, qui pourraient véhiculer les messages d'entraînements photique et non photique. Durant ce travail nous avons pu réaliser un référentiel anatomique ainsi qu'une cartographie de l'hypothalamus du Dromadaire. Comparés aux autres Mammifères, les SCN présentent plusieurs caractéristiques : 1) ils sont très longs avec une extension rostrale et post chiasmatique. 2) une présence massive de neurones à tyrosine hydroxylase formant deux populations 3) la détection d'ocytocine dans les parvoneurones de ces noyaux indique un rôle modulateur des neurones pacemakers 4) plusieurs types d'innervation qui pourraient témoigner de la présence de voies d'entraînement photique et non photique de l'horloge, existent massivement (NPY, 5-HT, Met-enk...). La distribution de la vasopressine et de l'ocytocine dans les magnoneurones de l'hypothalamus, montre que le système hypothalamo-neurohypophysaire est large et comprend en plus des noyaux supra-optiques et paraventriculaires, les noyaux : dorsomédians, ventromédians, arqué, le noyau magnocellulaire de l'hypothalamus latéral et surtout le noyau tubéral qui semble jouer un rôle particulier chez cette espèce.

Finalement, nous avons examiné la possibilité d'un entraînement non photique de l'horloge par le cycle de la température ambiante. La température ambiante en effet est un facteur environnemental cyclique particulièrement important pour cette espèce. Pour cette étude nous avons choisi, le rythme de la température corporelle comme marqueur des activités de l'horloge. Après avoir démontré le contrôle de ce paramètre par une horloge circadienne et sa dépendance de la photopériode, nous avons pu établir que le rythme de la température corporelle (donc l'horloge) pouvait être influencé par le cycle de la température ambiante. En étudiant l'effet du cycle de la température ambiante sur le rythme de la mélatonine, nous avons pu montrer qu'il s'agissait bien d'un entraînement de l'horloge par le cycle de température ambiante. Chez le Dromadaire, le cycle de la température ambiante est donc un véritable zeitgeber. Toutefois, nous avons aussi montré, dans certaines conditions expérimentales précises, que le rythme de température corporelle suivait passivement le cycle de la température ambiante. Cette dernière observation nous a permis de poser les limites dans l'utilisation de certains paramètres (e.g ; température corporelle) pour étudier les propriétés de l'horloge circadienne.

Il est maintenant évident, en terme de zootechnie vétérinaire, qu'à côté de la photopériode, la prise en compte de la température ambiante comme un facteur environnemental, est nécessaire chez cette espèce pour aborder les questions relatives à la régulation des rythmes saisonniers (e.g ; reproduction).

Mots clés : Dromadaire, Mélatonine, AA-NAT, Horloge biologique, noyaux suprachiasmatiques, hypothalamus, rythme de la température corporelle, cycle de la température ambiante, entraînement photique et non photique.