

THÈSE
Présentée à

L'Université de Strasbourg
Faculté des Sciences de la Vie

En vue de l'obtention du titre de Docteur d'Université
Neurosciences

Par

Laurent NEXON

Régulation photopériodique du fonctionnement
journalier des neurones sérotoninergiques du raphé
dorsal et médian chez le hamster doré

Soutenance le 20 octobre 2009 devant la commission d'examen :

Dr. Olivier Bosler
Dr. Bruno Claustrat
Pr. Marie-José Freund-Mercier
Dr. Michelle Fèvre-Montange
Dr. Sylvie Raison
Dr. Paul Pévet

Rapporteur externe
Rapporteur externe
Rapporteur interne
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Time is running out for us
But you just move the hands upon the clock

Thom Yorke,
The Clock, *in* The Eraser

Remerciements

Au Dr. Mireille Masson-Pévet, pour m'avoir permis de faire partie du Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes et d'y effectuer un DEA brillant, puis de poursuivre l'œuvre avec le présent travail de thèse.

Au Dr. Paul Pévet, mon directeur de thèse. Beaucoup a été dit sur son enthousiasme communicatif. J'avoue être maintes fois sorti de son bureau avec l'envie incompréhensible de travailler. J'aimerais lui exprimer pour cela ma sincère admiration.

Au Dr. Sylvie Raison, qui ne sera bientôt plus ma chef. Je crois que je ne réalise pas encore ce que je te dois, combien tu as su tirer de moi le meilleur. L'addition va être salée.

À l'ensemble des membres du jury, Pr. Marie-José Freund-Mercier, Dr. Michelle Fèvre-Montange, Dr. Olivier Bosler, Pr. Bruno Claustrat, pour m'avoir accordé l'honneur de juger le présent travail de thèse.

À tous les copains et les amis du labo, merci. On ira boire un coup.

Sommaire

Introduction	1
I. L'horloge circadienne	7
1. Construction endogène de la rythmicité circadienne.....	9
a) Gènes horloge principaux.....	9
Clock et Bmal1	9
Per et Cry	10
b) Oscillations	11
c) Gènes horloges secondaires	12
2. Synchronisation de l'horloge circadienne : photique et non photique	14
a) Afférences principales des SCN	14
b) Donneurs de temps et synchronisation	16
Synchronisation photique.....	16
Synchronisation non photique.....	18
3. Sorties de l'horloge circadienne	21
a) Gènes contrôlés par l'horloge (CCG).....	21
b) Activité électrique des SCN.....	22
4. L'horloge circadienne s'adapte à la photopériode.....	25
a) Modulation photopériodique de l'expression des gènes horloge	25
b) Ajustement photopériodique des rythmes de sortie de l'horloge.....	26
c) Synchronisation photique et non photique en PL et en PC.....	30
Photique	30
Non photique.....	33
En résumé	35
II. La sérotonine dans le système circadien.....	36
1. Neuroanatomie.....	36
a) Voies sérotoninergiques raphé → SCN.....	37
b) Synthèse et libération de 5-HT	38
Métabolisme.....	38
Rythmicité.....	40
2. Sérotonine et synchronisation de l'horloge circadienne.....	44
a) 5-HT modulatrice de la synchronisation photique	44
b) 5-HT relais de facteurs non photiques	45
En résumé	48
III. Modulation du système 5-HT par des processus dépendant de la photopériode	49
Généralités sur la physiologie saisonnière du hamster doré.....	49
1. Mélatonine	52
a) Hormone circadienne et saisonnière.....	52
b) Mélatonine et reproduction	53
c) Système 5-HT.....	54
2. Stéroïdes sexuels.....	56
a) Contrôle photopériodique de l'axe HPG.....	56

b) Testostérone et récepteurs aux stéroïdes sexuels	58
c) Testostérone et photopériode	60
d) Action des stéroïdes sexuels sur le système sérotoninergique	62
3. Activité locomotrice	65
a) Origine de la rythmicité	65
b) Activité locomotrice et photopériode	66
c) Activité locomotrice et système 5-HT	68
4. Axe HPA et glucocorticoïdes	70
a) Sécrétion rythmique	70
b) Récepteurs	72
c) Glucocorticoïdes et système 5-HT	74
c) Glucocorticoïdes et photopériode	77
Objectifs de la thèse.....	80
Résultats	82
Chapitre I	89
Influence de la photopériode sur la synthèse journalière de sérotonine dans le raphé dorsal et médian du hamster doré	89
Chapitre II	119
Implication des glucocorticoïdes et de la testostérone dans la régulation nycthémerale et photopériodique de l'expression de tph2	119
Discussion	139
Perspectives	167
Bibliographie.....	171

Abréviations

8-OH-DPAT : 8-hydroxy-(dipropylamino)-tétraline
5-HT : 5-hydroxytryptamine, sérotonine
5-HIAA : 5-hydroxyindole acetic acid, acide 5-hydroxyindole acétique
AADC : aromatic L-amino acid decarboxylase, décarboxylase des acides aminés aromatiques
AA-NAT : arylalkylamine N-acetyltransferase
ACTH: adrenocorticotropic hormone, hormone corticotrope
ADX : adrenalectomy, surrénalectomie
ADN : acide désoxyribonucléique
ANOVA : analysis of variance, analyse de variance
AR : androgens receptor, récepteur aux androgènes
ARE : androgens response element
ARNm : acide ribonucléique messenger
AVP : arginine vasopressin, vasopressine
CRF/CRH : corticotropin releasing factor/hormone, corticotropine
CBG : corticosteroid binding globulin (transcortin), transcortine
CCG : clock-controlled-gene, gène contrôlé par l'horloge
CLC : cardiostrophin-like cytokine
CRP : courbe de réponse de phase
DD: dark-dark, obscurité constante
DHT : dihydrotestosterone, dihydrotestostérone
DMH : dorsomedian hypothalamus, hypothalamus dorsomédian
DR : dorsal raphé, raphé dorsal
DRc : DR caudal
DRm : DR médian
DRr : DR rostral
ER : estrogens receptor, récepteur aux estrogènes
ERE : estrogens response element
FSH : follicle stimulating hormone, hormone folliculo-stimulante
GABA : γ -aminobutyric acid, acide γ -aminobutyrique
GDX : gonadectomy, castration
GHT : geniculohypothalamic tract, tractus géniculohypothalamique
Glu : glutamate
GnRH : gonadotropin-releasing hormone, gonadolibérine
GR : glucocorticoids receptor, récepteur aux glucocorticoïdes
GRE : glucocorticoids response element
HPA : hypothalamus-pituitary-adrenal axis, axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HPG : hypothalamus-pituitary-gonadal axis, axe hypothalamo-hypophyso-gonadique
HIOMT : hydroxyindole-O-methyltransferase
IGL : intergeniculate leaflets of the thalamus, feuilletts intergénéculés du thalamus
Lat : subdivisions latérales du DR
LD : light/dark, cycle lumière/obscurité de 24h
LH : luteinizing hormone, hormone lutéinisante
LP / PL : long photoperiod, photopériode longue
MAO : monoamine oxidase, monoamine oxydase
MnR : median raphé, raphé médian
MnRc : MnR caudal
MnRr : MnR rostral
MR : mineralocorticoids receptor, récepteur aux minéralocorticoïdes
NMDA : récepteur glutamatergique au N-méthyl-D-aspartate
NPY : neuropeptide Y

PACAP : Pituitary Adenylate cycle-Activating Peptide
PB : phosphate buffer, tampon phosphate
PBS : phosphate buffer salin, tampon phosphate salin
PG : pineal gland, glande pinéale
PK2 : prokineticin-2
PVN : hypothalamic paraventricular nucleus, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
RHT : retinohypothalamic tract, tractus rétinohypothalamique
SAD : seasonal affective disorder, dépression saisonnière
SBP : serotonin binding protein, protéine de liaison à la sérotonine
SCN : suprachiasmatic nuclei, noyaux suprachiasmatiques
SEM : standard error of the mean, erreur standard
SERT : serotonin transporter, transporteur de sérotonine
SP / PC : short photoperiod, photopériode courte
 τ : tau (période)
TGF α : transforming growth factor α
TPH : tryptophane hydroxylase
TTX : tetrodotoxin, tétrodotoxine
VIP : vasoactive intestinal peptide, peptide intestinal vasoactif
VM : subdivision ventromediane du DR
ZT : zeitgeber time, temps zeitgeber

Introduction

La mesure du temps sur des bases astrophysiques renvoie à la notion de cycles, de variations qui se répètent dans le temps. Dans l'environnement terrestre, les cycles d'éclairement et de température sont essentiellement assujettis aux révolutions de la Terre autour du Soleil, ce qui les définit sur des périodes nyctémérale (24h) et annuelle.

Les êtres vivants, depuis toujours soumis à ces cycles, ont la faculté intrinsèque de fonctionner de manière rythmique. Du point de vue physiologique et écologique, cette faculté leur procure deux avantages : l'anticipation des variations cycliques et l'adaptation à des changements imprévisibles.

Un exemple d'anticipation souvent cité chez les Vertébrés est le pic de sécrétion des glucocorticoïdes qui survient avant l'heure du réveil, pour faire face aux dépenses énergétiques qui n'ont pas encore eu lieu. L'anticipation renvoie à la notion de rythmicité propre au biologique, de rythmicité endogène, qui soit indépendante des cycles de l'environnement. Les êtres vivants possèdent des structures **pacemaker**, capables de générer des rythmes auto-entretenus. Ceci est expérimentalement mis en évidence quand la rythmicité persiste après isolement temporel. L'organisme est alors toujours capable de continuer à fonctionner de façon rythmique.

L'adaptation à des variations brusques et imprévisibles, de même que l'anticipation, impliquent que les êtres vivants aient la capacité de se **synchroniser**, c'est-à-dire d'ajuster leur propre rythme à ceux de leur environnement. La synchronisation d'une structure pacemaker peut s'effectuer sur plusieurs paramètres, qui définissent le rythme biologique (Fig. 1) :

- la **période**, dont le symbole est τ , définie par le temps au bout duquel un processus se répète identique à lui-même
- l'**amplitude**, c'est-à-dire l'ampleur d'une oscillation, définie par la différence entre sa valeur maximale (acrophase) et sa valeur moyenne (**mesor**)
- la **phase**, qui est la position relative de l'oscillation sur une échelle de temps donnée

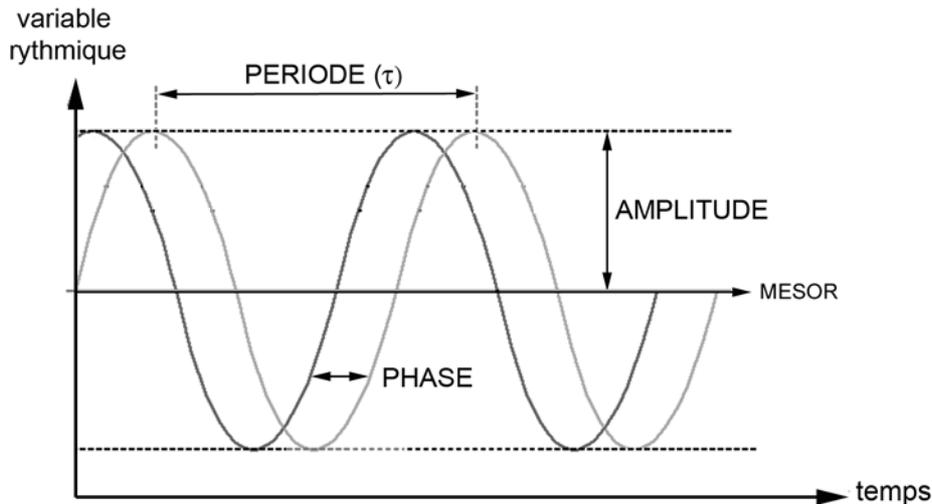


Fig. 1) Schéma illustrant les caractéristiques principales de deux rythmes sinusoïdaux (période, amplitude et mesor identiques) dont les phases sont différentes.

Afin que l'organisme entier profite de la rythmicité engendrée et synchronisée, il est nécessaire que l'information temporelle sorte des structures pacemaker et soit **distribuée** vers les structures cibles. Une structure biologique qui possède la faculté de générer des rythmes auto-entretenus, de se synchroniser et de distribuer ces rythmes au reste de l'organisme répond à la définition d'**horloge biologique**.

Il existe différentes catégories de rythmes biologiques, classifiés en trois grandes classes selon leur période :

- les rythmes ultradiens, dont la période est inférieure à 20h : ce sont par exemple les cycles du sommeil, les battements cardiaques, la fréquence respiratoire, le caractère pulsatile des sécrétions hormonales ; ces rythmes ne correspondent à aucun cycle environnemental connu
- les rythmes circadiens, littéralement d'environ 24h ; chez les mammifères, un grand nombre de paramètres physiologiques et de comportements ont un caractère circadien : le cycle veille/sommeil, la sécrétion de certaines hormones comme les glucocorticoïdes ou la LH, les comportements de prise alimentaire, d'activité locomotrice...

- les rythmes infradiens, dont la période excède 24h : les rythmes saisonniers (reproduction, changement de pelage, hibernation) et annuels (variations de l'humeur, de l'efficacité du système immunitaire) en sont une illustration

Le fait que les êtres vivants expriment une rythmicité sur différentes échelles temporelles atteste qu'ils possèdent différents moyens de mesure du temps. La grande majorité des études consacrées aux rythmes biologiques portent sur deux grands types de rythmes, le circadien et le saisonnier. Le **hamster doré** (ou hamster syrien, *Mesocricetus auratus*) a fait l'objet de nombreux travaux relatifs à chacun de ces deux grands types de rythmes. Suite à la découverte d'une **horloge circadienne** chez les mammifères, le hamster doré a servi à caractériser l'influence de nombre de facteurs synchronisateurs sur le fonctionnement de l'horloge et sur les sorties physiologiques et comportementales de celle-ci. En outre, le hamster doré est un animal sensible à l'alternance des saisons, ou plus exactement à la **photopériode**, définie comme la longueur du jour par 24h et qui varie avec une périodicité annuelle. Il a ainsi fait l'objet de nombreux travaux sur l'influence de la photopériode sur les grandes fonctions de l'organisme et sur le comportement. A la croisée du circadien et du saisonnier, le hamster doré constitue un modèle de choix pour l'étude de l'influence de la photopériode sur le fonctionnement du système circadien.

I. L'horloge circadienne

L'horloge circadienne des mammifères a été découverte au début des années 1970. C'est dans une minuscule structure hypothalamique paire, les noyaux suprachiasmatiques (SCN, Fig. 2) que le siège de l'horloge circadienne a été décrit d'abord par approche lésionnelle : suite à la destruction électrolytique bilatérale des SCN de rat, Stephan et Zucker (1972) constatent une abolition complète du caractère rythmique de l'activité locomotrice et de la prise hydrique. La même année, Moore et Eichler (1972) décrivent, toujours chez le rat, une perte du rythme de sécrétion des glucocorticoïdes avec la même approche lésionnelle. Mais c'est d'une étude de Ralph et al. (1990) chez le hamster doré qu'est venue la preuve irréfutable que les SCN sont bien le siège de l'horloge circadienne : suite à une lésion bilatérale des SCN, des hamsters dorés recevant par transplantation des SCN provenant de hamsters mutants τ (qui ont une période endogène particulièrement courte de 20h) recouvrent un rythme d'activité locomotrice avec une période voisine de celle du donneur.

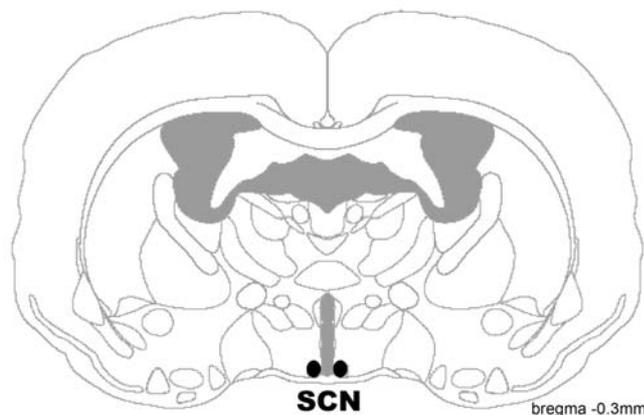


Fig. 2) Coupe frontale de cerveau de hamster doré au niveau des noyaux suprachiasmatiques (SCN).

Adapté de Morin et Wood, 2001.

Le concept d'**horloge circadienne maîtresse** s'est dès lors définitivement imposé. Les SCN sont une petite structure paire localisée au-dessus du chiasma optique, de part et d'autre du troisième ventricule (fig. 2). Chez le hamster doré, ses dimensions sont environ 300 μ m sur le plan médio-latéral, 300 μ m en dorsoventral et 300 μ m en rostrocaudal (Morin & Wood 2001).

Les SCN ont été décrits comme une structure capable de **générer** des rythmes endogènes d'une période d'environ 24h, de les adapter à l'action de facteurs **synchronisants** et de les **distribuer** à l'organisme. Depuis la fin des années 1990, les données expérimentales s'accumulent démontrant que l'horloge circadienne est capable d'adapter son fonctionnement à la photopériode. Les SCN paraissent ainsi être une horloge pour toutes les saisons (Sumova *et al.*, 1995b; Pevet *et al.*, 1996).

1. Construction endogène de la rythmicité circadienne

L'origine des oscillations circadiennes est moléculaire, elle provient de l'alternance entre activation et répression de la transcription d'une partie du génome par différentes protéines. Ces protéines autorégulées de manière rythmique sont codées par de nombreux gènes dits gènes horloge. Depuis la découverte du premier gène horloge (*Clock*) chez les mammifères (Vitaterna *et al.*, 1994), des recherches massives ont conduit à la caractérisation d'un modèle complexe permettant d'expliquer la genèse des oscillations de l'horloge. La complexification du modèle évolue encore à grande vitesse avec la caractérisation de nombreux éléments régulateurs (Ko & Takahashi, 2006). Vont être ici détaillées les bases de la construction de la rythmicité circadienne.

a) Gènes horloge principaux

Clock et Bmal1

L'activation des gènes horloge est assurée par les produits d'expression des gènes horloge *Clock* et *Bmal1*. L'invalidation de ces deux gènes chez la souris a montré leur implication dans la genèse de la rythmicité circadienne : chez les **mutants *Clock*** homozygotes, les ARNm de tous les autres gènes horloge présentent des niveaux faibles (Jin *et al.*, 1999; Kume *et al.*, 1999; Oishi *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000). Associé à cette diminution de la transcription, le rythme d'activité locomotrice des mutants *Clock* est très perturbé. En cycle lumière-obscurité de 24h (LD), le comportement locomoteur des souris reste plus ou moins rythmique, mais avec une augmentation de leur activité pendant le jour. En obscurité constante (DD pour dark-dark), les souris *Clock* mutantes deviennent arythmiques au bout de quelques semaines (Vitaterna *et al.*, 1994). L'**invalidation de *Bmal1*** est tout aussi critique : des souris mutantes homozygotes pour ce gène deviennent arythmique en DD et présentent une atténuation de la rythmicité en LD (Bunger *et al.*, 2000). Associé à cela, les taux d'ARNm des autres gènes horloges dans les SCN des mutants *Bmal1* sont quasiment nuls (Bunger *et al.*, 2000). Les gènes *Clock* et *Bmal1* sont donc indubitablement impliqués dans **l'activation de la transcription des gènes horloge, première étape de la genèse des oscillations.**

Les protéines CLOCK et BMAL1 se dimérisent grâce à leur domaine PAS (Per-ARNT-Single Minded) et se lient à l'ADN par leur domaine bHLH (basic Helix Loop Helix). Le dimère **CLOCK-BMAL1 est un facteur de transcription** capable de se fixer sur des séquences promotrices E-box (CACGTG) et de transactiver la transcription d'un certain nombre de gènes, incluant d'autres gènes horloge dont les gènes *Per* et *Cry* (Fig 3-1) (Reppert & Weaver, 2002).

Per et Cry

Trois gènes *Per* (Shearman *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1997; Zylka *et al.*, 1998) et deux gènes *Cry* (Miyamoto & Sancar, 1998) ont été décrits chez les mammifères. De nombreuses expériences d'inactivation des gènes *Per* (Zheng *et al.*, 1999; Bae *et al.*, 2001; Cermakian *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001) et des gènes *Cry* (van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999) ont été pratiquées chez la souris pour déterminer l'implication de chacun des cinq gènes horloge dans la construction du message circadien. Il en ressort que la mutation individuelle des différents *Per* et *Cry* modifie la période endogène de l'horloge sans que la rythmicité soit abolie. La seule exception est *Per2*, dont l'inactivation entraîne une perte de la rythmicité de l'activité locomotrice en DD, et ce de 2 à 18 jours après la mise en DD (Bae *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001). De manière intéressante, les double inactivations *Per1/Per2* (Zheng *et al.*, 2001) et *Cry1/Cry2* (van der Horst *et al.*, 1999) rendent les mutants immédiatement arythmiques lorsqu'ils sont placés en DD. **La présence conjuguée de *Per* et *Cry* est donc indispensable** à l'établissement de la rythmicité circadienne. De fait, c'est en formant des hétérodimères que les protéines PER et CRY vont engendrer la deuxième étape de la construction des oscillations : la répression de la transcription induite par CLOCK-BMAL1.

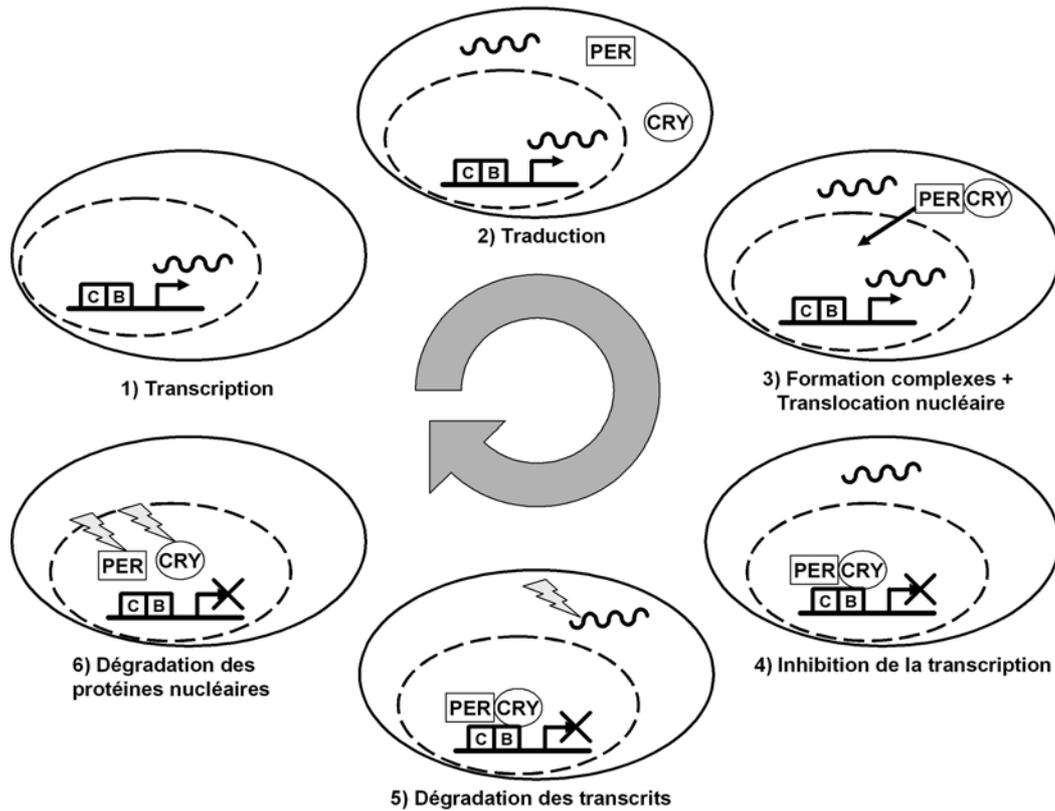


Fig. 3) Principales étapes biochimiques de la construction des oscillations circadiennes.

C : protéine CLOCK ; B : protéine BMAL1 ; PER : protéine PER ; CRY : protéine CRY.

Modifié d'après Johnston 2005

b) Oscillations

Le dimère CLOCK-BMAL1 active la transcription *Per* et *Cry* (Fig. 3-1). Après traduction des ARNm dans le cytoplasme (Fig. 3-2), les protéines PER et CRY s'accumulent et s'associent pour former des complexes protéiques hétérogènes (Fig. 3-3) permettant leur translocation dans le noyau (Reppert & Weaver, 2002). A la différence de CLOCK-BMAL1, les complexes PER-CRY ne sont pas des facteurs de transcription car ils ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN (Hirayama & Sassone-Corsi, 2005). Une fois dans le noyau (Fig. 3-4), les complexes PER-CRY interagissent avec les protéines CLOCK-BMAL1 pour inhiber l'action promotrice de la transcription de ces dernières (Lee *et al.*, 1999). De cette façon, PER et CRY inhibent indirectement leur propre transcription.

Finalement, après dégradation des ARNm (Fig. 3-5) et des protéines PER-CRY (Fig. 3-6), les dimères CLOCK-BMAL1 peuvent de nouveau induire l'expression des gènes horloge, et un nouveau cycle de transcription/répression s'établit.

En résumé l'expression de *Per* et *Cry* est induite par CLOCK-BMAL1 puis inhibée par PER-CRY, puis le processus recommence quand les protéines PER-CRY sont naturellement dégradées. Se pose alors la question de la régulation de l'expression de *Clock* et *Bmal1*.

L'expression du gène *Clock* dans les SCN est constante en LD comme en DD chez le rat, la souris et le hamster doré en photopériode longue (LP) (Tei *et al.*, 1997; Oishi *et al.*, 1998; Tournier *et al.*, 2003). Sa protéine, également, présente des niveaux constitutifs dans les SCN de souris (Maywood *et al.*, 2003; Mendoza *et al.*, 2007; Ansari *et al.*, 2009). Par contre, **l'expression de *Bmal1* est rythmique**, tant au niveau de ses ARN messagers qu'au niveau protéique (Oishi *et al.*, 2000; Shearman *et al.*, 2000; Tamaru *et al.*, 2000; Tournier *et al.*, 2003). La régulation temporelle de sa rythmicité fait intervenir d'autres types de gènes horloge, des gènes horloges secondaires.

c) Gènes horloges secondaires

L'expression rythmique de *Bmal1* est modulée par les produits d'expression d'autres gènes horloge, les gènes *Rev-erb* (α et β) et *Ror* (α et β) (Guillaumond *et al.*, 2005). L'expression de ces gènes dans les SCN est rythmique (Preitner *et al.*, 2002; Sumi *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002; Guillaumond *et al.*, 2005) soumise à l'action alternée de CLOCK-BMAL1 et PER-CRY. Le rôle de la protéine REV-ERB α a été mis en évidence chez des souris invalidées pour le gène *Rev-erb α* . Chez ces mutants, les niveaux d'ARNm-*Bmal1* sont augmentés, alors que l'expression de *Per2* et *Cry2* reste inchangée (Preitner *et al.*, 2002). De même, la protéine REV-ERB α est capable d'inhiber la transcription de *Bmal1* (Guillaumond *et al.*, 2005). **Les protéines REVERB ont donc un rôle inhibiteur sur la transcription de *Bmal1***. Au contraire, chez les souris invalidées pour le gène *Rora*, l'expression de *Bmal1* est sévèrement réduite (Steinmayr *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2004), démontrant le rôle activateur de ROR sur l'expression de *Bmal1*. Au final, il semblerait que ce soit l'action inhibitrice de REV-ERB qui imprime une rythmicité à l'expression de *Bmal1*, alors que ROR modulerait plutôt l'amplitude du rythme (Liu *et al.*, 2008).

Corrélées à ces changements d'expression de *Bmal1*, les mutants *Rev-erb* et *Ror* présentent des modifications de la période endogène de l'horloge, mais ils conservent le caractère rythmique de leur activité locomotrice en DD (Steinmayr *et al.*, 1998; Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004). Ceci illustre bien que REV-ERB et ROR, en jouant sur le rythme de *Bmal1*, sont capables de moduler dans le temps les processus de transcription/répression issus de l'action alternée de CLOCK-BMAL1 et PER-CRY. Cependant, REV-ERB et ROR ne sont pas indispensables à la genèse de la rythmicité circadienne dans les SCN (Liu *et al.*, 2008).

2. Synchronisation de l'horloge circadienne : photique et non photique

L'organisme se réajuste en permanence à différentes conditions environnementales cycliques : l'alternance des jours et des nuits, la température, la disponibilité alimentaire, la menace de prédateurs, les contraintes sociales... Les SCN ont la faculté de se régler sur la phase de tel ou tel facteur synchroniseur ou zeitgeber (donneur de temps).

On s'accorde à dire que le cycle lumière-obscurité, ou facteur photique, est le zeitgeber le plus puissant sur les SCN, les réglant à une période d'exactly 24h. Le fait que la lumière soit le plus puissant des synchroniseurs sous-entend que d'autres facteurs chronobiotiques sont capables d'agir sur les SCN. Ils sont regroupés sous le terme générique de non photique. Les messages temporels photiques et non photiques parviennent aux SCN par trois voies nerveuses principales.

a) Afférences principales des SCN

La rétine capte les informations photiques destinées aux SCN au sein d'une faible population de cellules ganglionnaires contenant le photopigment mélanopsine (Provencio *et al.*, 2002). Ces cellules envoient des projections glutamatergiques vers les SCN *via* le tractus rétino-hypothalamique (RHT). Des collatérales du RHT innervent également les feuillets intergénéculés du thalamus (IGL) et transmettent à cette structure les mêmes informations photiques (Morin *et al.*, 2003). La voie cellules à mélanopsine-SCN semble indépendante de la réponse visuelle à la lumière, qui fait intervenir les photorécepteurs de la rétine externe, les cônes et les bâtonnets, et leurs photopigments respectifs, opsines et rhodopsine. Cependant, une invalidation du gène codant pour la mélanopsine seule n'empêche pas la synchronisation par le cycle LD (Panda *et al.*, 2002), alors que des animaux n'ayant plus ni cônes, ni bâtonnets ni mélanopsine ne sont plus capables de se synchroniser à la lumière (Hattar *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2003). La présence de ces trois éléments semble donc indispensable à l'entraînement de l'horloge par la lumière.

C'est la présence de lumière qui induit la libération de glutamate par les terminaisons intra-SCN du RHT. Le neurotransmetteur transmet l'information photique *via* des récepteurs NMDA : l'application directe de NMDA provoque des décalages de phase de l'activité locomotrice similaires à ceux observés après application de créneaux de lumière (Mintz *et al.*,

1999). De plus, leur blocage diminue l'activation cellulaire généralement associée à une stimulation lumineuse (Vuillez *et al.*, 1998) et empêche les déphasages du rythme d'activité locomotrice induits par la lumière (Colwell *et al.*, 1990). Le PACAP, co-libéré avec le glutamate par les terminaisons du RHT, joue également un rôle dans la synchronisation photique, puisque la courbe de réponse de phase obtenue après injection du peptide est identique à celle induite par la lumière (Piggins *et al.*, 2001).

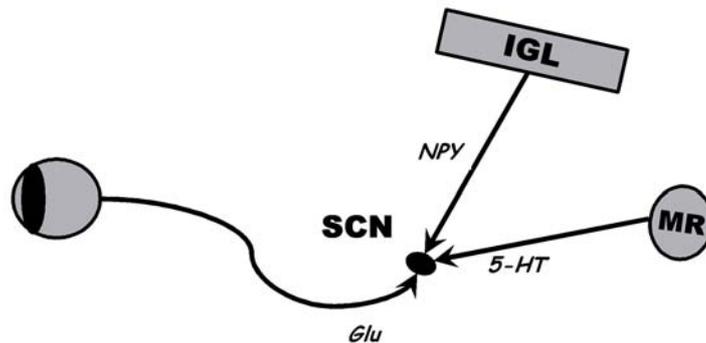


Fig. 4) Principales afférences nerveuses aux SCN. IGL : feuillets intergénéculés du thalamus ; MR : raphé médian ; Glu : glutamate ; NPY : neuropeptide Y

Les IGL thalamiques projettent sur les SCN *via* le tractus géniculo-hypothalamique (GHT) (Morin *et al.*, 1992). Le GHT libère du neuropeptide Y (NPY) et du GABA dans les SCN. Les IGL sont une structure complexe recevant des informations à la fois photiques provenant de la rétine (Morin & Blanchard, 2001) et non photiques en provenance du raphé dorsal (Meyer-Bernstein & Morin, 1996), ainsi que de nombreuses autres structures corticales, sous-corticales et hypothalamiques (Morin & Blanchard, 1998; Vrang *et al.*, 2003). Les IGL ont un rôle modulateur dans les mécanismes de synchronisation photique et non photique (Morin & Allen, 2006).

Le raphé envoie des projections sur les SCN depuis sa région mésencéphalique. Les SCN contiennent l'une des plus denses innervations sérotoninergiques du cerveau (Morin, 1999). Celle-ci provient exclusivement d'une petite population de cellules du raphé médian (MnR) (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998; Morin & Meyer-Bernstein,

1999). La 5-HT assure un rôle modulateur dans la synchronisation photique et constitue le relais de certains zeitgebers non photiques (Challet & Pevet, 2003). Le système sérotoninergique et le rôle de la 5-HT dans la synchronisation de l'horloge circadienne seront décrits en détail dans le chapitre II.

b) Donneurs de temps et synchronisation

A la fois les facteurs photiques et non photiques peuvent ajuster la période et la phase de l'horloge. Le pouvoir synchronisateur d'un zeitgeber sur 24h est généralement évalué par une courbe de réponse de phase (CRP). La CRP est construite à partir des avances et retards de phase qu'est capable d'induire un zeitgeber donné. Elle indique ainsi la période circadienne pendant laquelle l'horloge sera sensible à ce zeitgeber.

Les deux grandes catégories de facteurs synchronisateurs, photique et non photique, présentent des CRP fondamentalement différentes.

Synchronisation photique

Le rôle majeur de la lumière dans la synchronisation de l'horloge est mis en évidence par des expériences en dark-dark (DD), dans lesquelles des animaux sont maintenus dans l'obscurité permanente. Dans cet environnement sans lumière, l'animal va exprimer sa propre rythmicité circadienne. Cela peut se mesurer par une sortie comportementale de l'horloge telle que le rythme d'activité locomotrice. En DD, l'activité de l'animal sera décalée jour après jour par rapport à un référentiel de 24h, suivant une pente qui sera fonction de sa période endogène. La période endogène du hamster doré est légèrement supérieure à 24h ; son rythme d'activité locomotrice en DD est donc régulièrement retardé toutes les 24h. En l'absence de repère jour/nuit, le début de la **nuit subjective** est défini arbitrairement comme le début de l'activité locomotrice de l'animal, le début du **jour subjectif** étant fixé par convention 12h après le début de la nuit subjective.

Dans ces conditions DD, l'application d'un stimulus lumineux ponctuel va modifier la phase de l'horloge, ce qui se traduit par un décalage maintenu du profil d'activité, de l'ordre de 30min à 2h (Fig. 5). Un stimulus lumineux retarde la phase d'activité lorsqu'il est présenté en début de nuit subjective et l'avance lorsqu'il est présenté en fin de nuit subjective (Challet & Pevet, 2003).

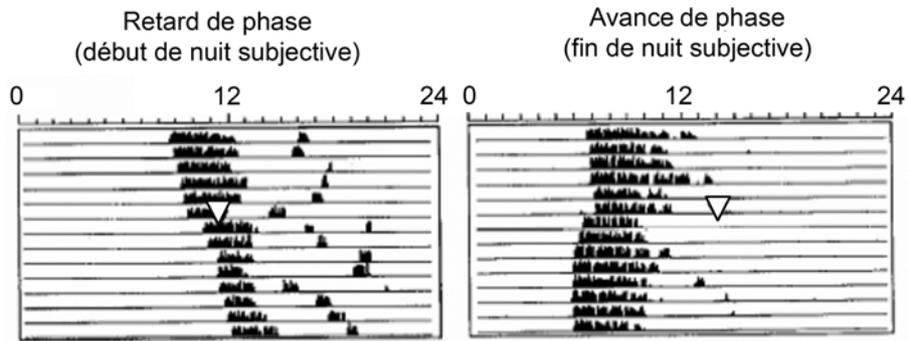


Fig. 5) Deux types de déphasage du rythme d'activité locomotrice induit par la lumière chez le hamster doré en DD. La nature et l'intensité du déphasage sont fonction du moment circadien où la lumière est appliquée (triangle blanc) : retard en début de nuit subjective, avance en fin de nuit subjective. D'après Rea *et al.* 1994

La lumière n'exerce son effet synchroniseur que pendant la nuit subjective, c'est-à-dire pendant le temps où l'animal nocturne est actif. C'est principalement en cela qu'elle diffère des stimuli non photiques (fig. 6).

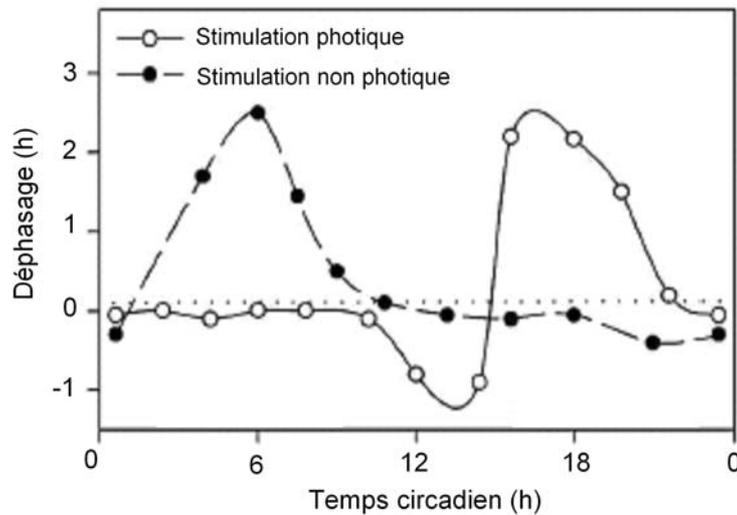


Fig. 6) Courbes de réponse de phase aux stimuli photique (flash lumineux, 1h) et non photiques (activité de roue, 3h) chez le hamster doré en DD. La nuit subjective est comprise entre les temps circadiens 12 et 24. D'après Challet & Pévet 2003.

Synchronisation non photique

Indépendamment de la lumière, les zeitgebers non photiques sont capables de changer la phase et la période de l'horloge. Ils ont ceci en commun que leur action synchronisatrice, au contraire de celle de la lumière, s'effectue essentiellement pendant le jour subjectif (Fig. 6). De nature très différente les uns des autres, les facteurs non photiques sont capables d'avancer la phase de l'horloge lorsqu'appliqués pendant le jour subjectif.

Une première classe regroupe les zeitgebers non photiques de type comportemental. Chez les rongeurs nocturnes de laboratoire, l'activation comportementale transitoire pendant la phase de repos induit des avances de phase de l'activité locomotrice.

Un protocole très utilisé consiste à introduire pendant quelques heures un animal naïf dans une cage dotée d'une **roue**, ce qui rend l'animal spontanément hyperactif. Suite à l'application de ce stimulus, la phase du rythme d'activité locomotrice générale de l'animal est avancée (Reebs & Mrosovsky, 1989; Wickland & Turek, 1991; Evans *et al.*, 2004). L'induction d'une forte activité locomotrice semble un paramètre déterminant, car des

animaux ne courant pas ou peu dans la roue ne présentent pas de déphasage significatif. L'injection de **triazolam**, une benzodiazépine, est un autre stimulus qui induit une hyperactivité chez le hamster doré. L'injection de triazolam pendant le jour subjectif induit des avances de phase significatives de l'horloge circadienne (Fig. 7) (Turek & Losee-Olson, 1986; Van Reeth & Turek, 1989; Cutrera *et al.*, 1994; Schuhler *et al.*, 1998).

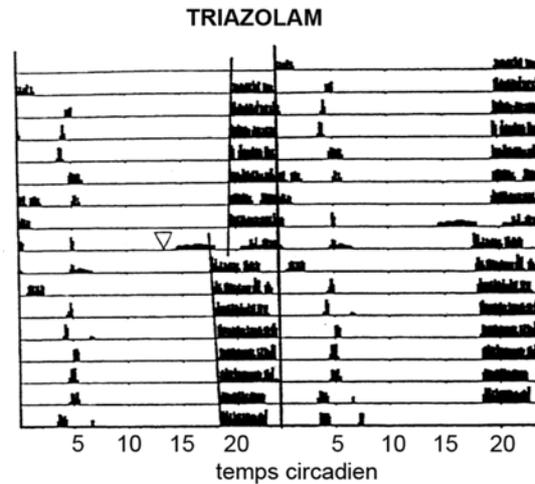


Fig. 7) Avance de phase du rythme d'activité locomotrice de hamster doré induite par injection de triazolam en milieu de jour subjectif. D'après Schuhler *et al.* 1998

Une autre stratégie consiste à **maintenir l'animal éveillé** pendant quelques heures au cours de sa période de repos. Sans qu'il devienne hyperactif, l'animal présente pourtant les jours circadiens suivants une avance de phase de son rythme d'activité locomotrice (Antle & Mistlberger, 2000).

Une autre classe de facteurs non photiques regroupe des substances pharmacologiques, comme la morphine (Marchant & Mistlberger, 1995) ou le triazolam précédemment cité, et des substances *naturelles* déjà présentes dans l'organisme, comme l'hormone mélatonine (Pitrosky *et al.*, 1999), le GABA (Smith *et al.*, 1989; Mintz *et al.*, 2002) ou le neuropeptide NPY (Biello *et al.*, 1994; Huhman & Albers, 1994). Lorsqu'elles sont appliquées à l'animal de façon exogène pendant le jour subjectif, ces molécules induisent des avances de phase de l'horloge (Challet & Pevet, 2003).

Quel que soit le zeitgeber, le processus de synchronisation est central, il agit sur la mécanistique moléculaire même de l'horloge. Les facteurs non photiques agissent *via* une diminution de l'expression des gènes *Per1* et *Per2* (Maywood *et al.*, 1999; Maywood & Mrosovsky, 2001), alors que la lumière est au contraire capable d'augmenter fortement l'expression de ces mêmes gènes (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Shigeyoshi *et al.*, 1997; Caldelas *et al.*, 2003). Le lien entre les déphasages de l'activité locomotrice et l'expression de *Per1* et *Per2* est encore mal compris, ballotté par des études contradictoires. D'une part, l'injection intra-cérébroventriculaire de sondes oligo-désoxynucléotidiques anti-*Per1* ou anti-*Per2* inhibent les décalages de phase induits par la lumière (Akiyama *et al.*, 1999; Wakamatsu *et al.*, 2001; Tischkau *et al.*, 2003). De plus, des souris mutantes pour *Per1* et *Per2* ne présentent plus d'avance et de retard de phase, respectivement (Albrecht *et al.*, 2001), démontrant l'implication de ces gènes dans la synchronisation photique. D'autre part, d'autres études montrent que des souris invalidées pour *Per1* (Cermakian *et al.*, 2001) et *Per2* (Bae & Weaver, 2003) ne présentent pas d'altération dans l'amplitude des décalages de phase induits par la lumière.

3. Sorties de l'horloge circadienne

L'horloge circadienne est vue comme un chef d'orchestre qui synchronise différentes fonctions physiologiques sur deux niveaux : les SCN veillent à ce que les fonctions soient coordonnées entre elles, et à ce qu'elles soient coordonnées avec l'environnement. C'est à partir des oscillations moléculaires des gènes horloge que les SCN vont pouvoir distribuer les rythmes synchronisés.

a) Gènes contrôlés par l'horloge (CCG)

Les gènes de sortie de l'horloge sont une fraction du génome des cellules des SCN que l'horloge exprime de façon rythmique. Au contraire des gènes horloge, ils ne participent aucunement à la construction mais bien à la transmission de la rythmicité.

En théorie, tous les gènes dont le promoteur contient une ou plusieurs E-box peuvent être considérés comme des CCG, car sujets à une transcription cyclique de la part du dimère CLOCK-BMAL1. L'activité transcriptionnelle de CLOCK-BMAL1 étant maximale en début de jour, la transcription des CCG est essentiellement diurne. Quatre exemples ont été particulièrement bien décrits :

- le TGF α (transforming growth factor α) et la Prokineticin-2 (PK2) sont des peptides impliqués dans la régulation de l'activité locomotrice (voir III. 2. b) ; l'expression de leur gène est rythmique, avec un maximum pendant le jour (Tournier *et al.*, 2007; Ji & Li, 2009)
- le vasoactive intestinal peptide (VIP) aurait un rôle d'agent synchronisateur entre les neurones des SCN (Vosko *et al.*, 2007) ; chez le hamster doré, l'expression de son gène est rythmique avec un maximum en début de jour (Tournier *et al.*, 2009)
- le gène codant la vasopressine (AVP) a beaucoup été étudié en tant que sortie de l'horloge ; l'AVP est impliquée dans le contrôle rythmique de la sécrétion des glucocorticoïdes (Kalsbeek *et al.*, 1996c) ; son gène possède une E-box (Jin *et al.*, 1999) et son expression au sein des SCN de nombreuses espèces est régulée de manière rythmique et circadienne avec un pic pendant le jour (Uhl & Reppert, 1986; Duncan *et al.*, 2001; Dardente *et al.*, 2004; Tournier *et al.*, 2009)

Une fois sortie des boucles moléculaires des gènes horloge, l'information rythmique est distribuée par deux moyens : la libération de facteurs diffusibles, tels que le TGF α et la PK2, et la libération synaptique de neurotransmetteurs et neuropeptides comme le GABA, le glutamate, l'AVP et le VIP. Dans le cas de l'AVP, le caractère rythmique de la synthèse du peptide se poursuit par un rythme de sa libération, engendré par un rythme de l'activité électrique du neurone.

b) Activité électrique des SCN

La rythmicité circadienne de l'activité électrique des SCN a été démontrée *in vivo* et *in vitro* par des enregistrements unitaires et multi-unitaires de neurones (Welsh *et al.*, 1995; Meijer *et al.*, 1997). Il ressort des enregistrements unitaires que chaque cellule possède son propre rythme d'activité électrique (Welsh *et al.*, 1995). Trois données expérimentales fondamentales concourent à l'expression du rythme d'activité électrique des SCN :

- chaque neurone est actif sur une très courte **période** de temps par 24h, de l'ordre de quelques heures (Schaap *et al.*, 2003; VanderLeest *et al.*, 2007); cette durée est variable d'un neurone à l'autre (Fig. 8 a)
- les profils de décharge individuels ont des **phases** différentes (Fig. 8 b) (Welsh *et al.*, 1995)
- l'activité électrique globale des SCN est la somme de toutes les décharges individuelles (Fig. 8 c) (Rohling *et al.*, 2006)

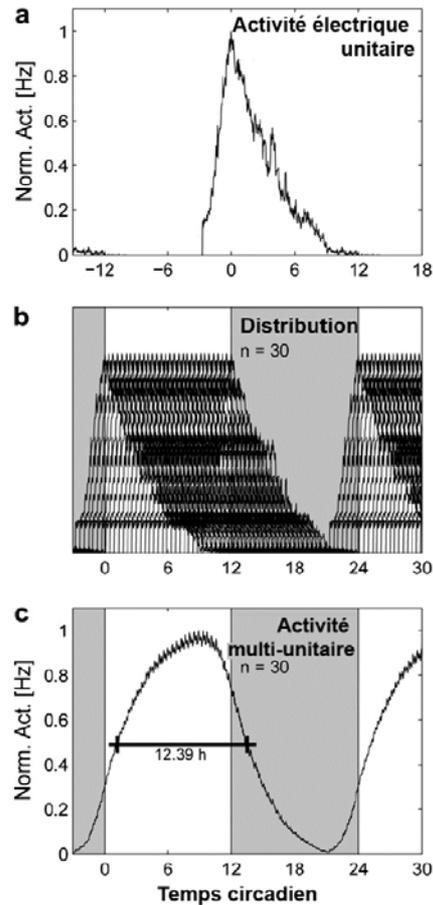


Fig. 8) Profils représentatifs d'activité électrique unitaire (a) ou multi-unitaire (b et c) enregistrés dans les SCN. D'après Rohling *et al.* 2006.

A l'échelle du tissu, l'activité électrique globale des SCN correspond à la somme des activités électriques de toutes les cellules. Elle présente un rythme circadien dont l'acrophase se situe pendant le jour subjectif (Fig. 8 c) (Meijer *et al.*, 1997; Mrugala *et al.*, 2000; Deboer *et al.*, 2003).

Le rythme d'activité électrique des neurones SCN engendre un rythme de libération de leurs neuromédiateurs. Le rythme de libération de l'AVP dans les SCN est, tout comme le rythme d'activité électrique, maximal pendant le jour subjectif (Kalsbeek *et al.*, 1995).

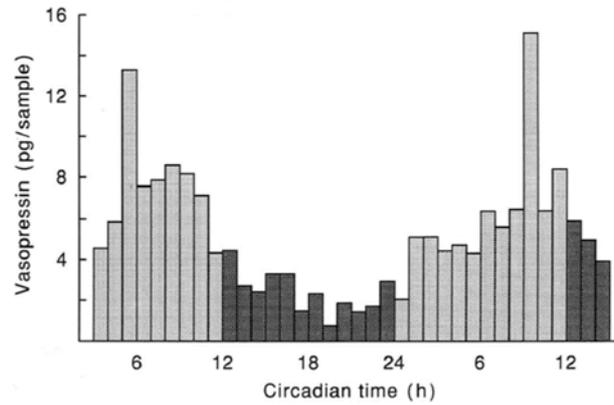


Fig. 9) Libération circadienne d'AVP dans les SCN de rat. La nuit subjective est définie de CT12 à CT24. D'après Kalsbeek *et al.* 1995.

Il est établi que le rythme d'activité électrique ne participe pas à la genèse des oscillations : suite à un blocage par la tétrodoxtine (TTX), le rythme d'activité électrique réapparaît avec une phase identique à celle mesurée avant application de TTX (Schwartz *et al.*, 1987). Cependant, le lien fonctionnel entre gènes horloge et activité électrique est encore mal connu.

4. L'horloge circadienne s'adapte à la photopériode

La plupart des études consacrées à la rythmicité circadienne ne se font qu'en une seule photopériode de référence, 12:12 (12 heures de lumière pour 12 heures d'obscurité) pour le rat et la souris, 14:10 pour le hamster doré. Or, hormis à l'équateur, la longueur du jour est un paramètre rythmique qui présente d'importantes variations en fonction des saisons. Le système circadien doit s'adapter en permanence à ces changements. Cette faculté d'adaptation est désignée par le terme photopériodisme.

a) Modulation photopériodique de l'expression des gènes horloge

La photopériode modifie les profils d'expression des gènes horloge chez de nombreuses espèces : le rat (Sumova *et al.*, 2002), le mouton (Lincoln *et al.*, 2002), le hamster sibérien (Messenger *et al.*, 2000; Nuesslein-Hildesheim *et al.*, 2000), le hamster doré (Carr *et al.*, 2003; Tournier *et al.*, 2003). Entre **photopériode longue (PL)** et **photopériode courte (PC)**, les profils d'expression des gènes *Clock*, *Bmal1*, *Cry* et *Per* sont modifiés sur des paramètres propres à chaque gène.

Chez le hamster doré (Tournier *et al.*, 2003; Tournier *et al.*, 2009), les rythmes d'expression de *Cry1* et *Bmal1* sont ajustés à la photopériode au niveau de leur **phase** (Fig. 10). *Clock* quant à lui, d'expression constante en PL, devient **rythmique** en PC. Pour les gènes *Per*, c'est la **durée du pic** d'expression diurne qui diminue en PC. La lumière est connue pour induire une augmentation de l'expression de *Per1* et *Per2* dans les SCN de souris (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Shigeyoshi *et al.*, 1997; Takumi *et al.*, 1998a) et de hamster (Moriya *et al.*, 2000a; Yokota *et al.*, 2000). Par contre, ce n'est pas le cas pour *Per3* (Takumi *et al.*, 1998b; Zylka *et al.*, 1998; Moriya *et al.*, 2000b). La durée de la période lumineuse est donc probablement intégrée en premier par la durée d'expression des gènes *Per1* et *Per2*. Cet effet pourrait induire un ajustement progressif de l'expression des autres gènes horloge jusqu'à formation d'un état stable. Il est important de noter que l'ajustement des gènes *Per* est directement proportionnel à la longueur du jour : en PC 8:16, le raccourcissement de la durée du pic d'expression de *Per2* est d'environ 8h par rapport à la PL 16:8 (Tournier *et al.*, 2009), tandis qu'entre PL 14:10 et PC 10:14 ce raccourcissement est de 4h (Tournier *et al.*, 2003).

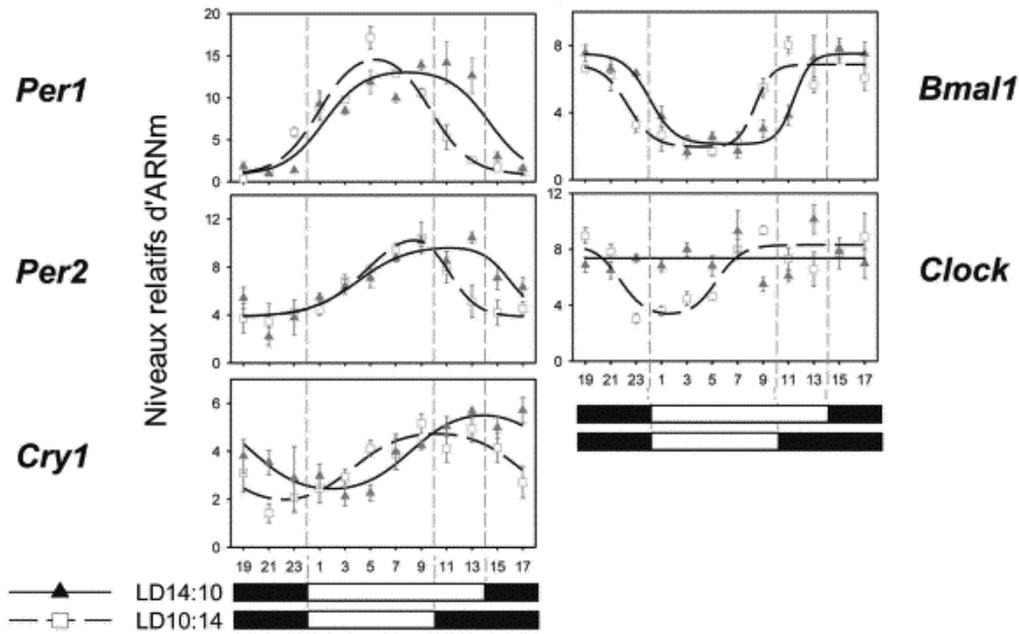


Fig. 10) Variations journalières des taux d'ARNm de différents gènes horloge dans les SCN de hamster doré en PL14:10 et en PC10:14. Les barres noires symbolisent la nuit.

D'après Tournier *et al.* 2003.

b) Ajustement photopériodique des rythmes de sortie de l'horloge

Les sorties immédiates de l'horloge décrites précédemment, les CCG et l'activité électrique, sont toutes deux exprimées de façon différentielle en PL et en PC.

Les gènes de l'AVP et du VIP (voir I. 2. a) sont des CCG dont le pic d'expression se situe en début de jour chez le hamster doré en PL (Tournier *et al.*, 2009). Chez des hamsters acclimatés à la photopériode courte, l'amplitude et la durée du pic d'ARNm-AVP sont significativement raccourcies (Fig. 11), tandis que les niveaux moyens d'ARNm-VIP sont significativement diminués (Tournier *et al.*, 2009).

Des modifications photopériodiques de CCG ont été mesurées chez d'autres espèces : *Avp* et *Vip* chez le hamster sibérien (Duncan *et al.*, 1995), *Avp* chez le rat (Jac *et al.*, 2000).

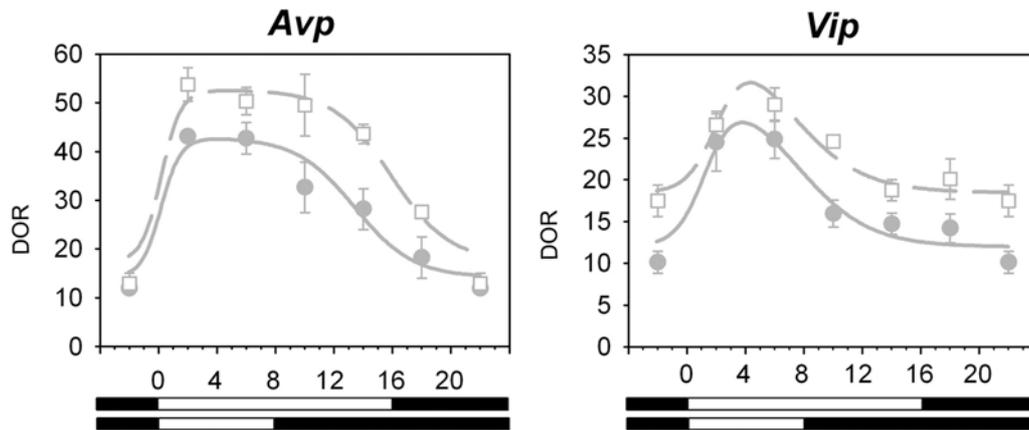


Fig. 11) Variations journalières des taux d'ARNm d'Avp et Vip dans les SCN de hamster doré en PL16 :8 (tracé pointillé) et PC8 :16 (tracé plein). DOR : Densité Optique Relative. Les barres noires symbolisent la nuit. D'après Tournier *et al.* 2009.

La photopériode est également intégrée dans le rythme d'activité électrique des SCN (Fig. 12). Des enregistrements multi-unitaires de neurones des SCN montrent que le pic d'activité électrique diurne est plus large en PL qu'en PC chez la souris (VanderLeest *et al.*, 2007), le rat (Schaap *et al.*, 2003) et le hamster doré (Jagota *et al.*, 2000; Mrugala *et al.*, 2000). Ce rythme persiste en obscurité constante (Jagota *et al.*, 2000; Mrugala *et al.*, 2000; VanderLeest *et al.*, 2007), ce qui confirme que la photopériode influence la construction circadienne de la rythmicité.

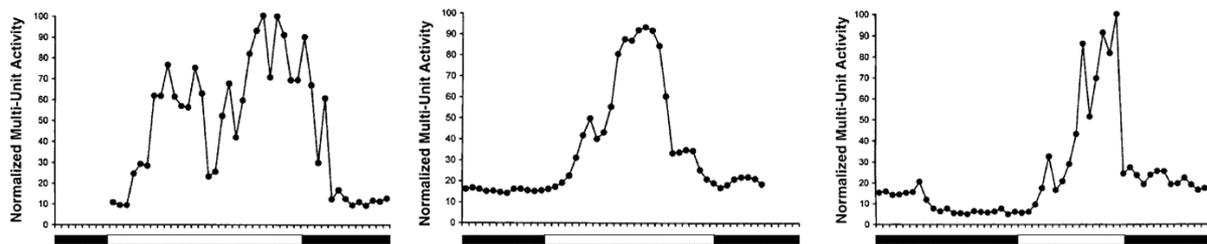


Fig. 12) Profils journaliers de l'activité électrique multi-unitaire de tranches de SCN chez trois hamsters dorés habitués respectivement à une photopériode 14:10 (gauche), 12:12 (milieu) et 8:16 (droite). Les barres noires symbolisent la nuit. D'après Mrugala *et al.* 2000.

Pour expliquer la différence de durée du pic d'activité électrique en PL et en PC, Rohling et al. (2006) avancent deux hypothèses construites à partir des données expérimentales obtenues par enregistrement unitaire de neurones des SCN (voir I.2.b). Les auteurs ont représenté par modélisation la contribution des rythmes individuels de décharge des neurones à l'ensemble du patron d'activité électrique des SCN.

Dans une première hypothèse, les auteurs montrent que lorsque la **distribution temporelle des phases des pics de décharge individuels** est changée, la durée du pic global est modifiée en conséquence (Fig. 13). Ainsi en PC, le pic d'activité des SCN est compressé proportionnellement à la faible longueur du jour. Ceci peut être expliqué par une distribution étroite des phases des pics de décharge des neurones individuels (Fig. 13 a). Le rythme global résultant de la somme de toutes les décharges individuelles a une durée de pic courte (Fig. 13 b). Au contraire, en PL, si les phases des pics de décharge des neurones individuels sont larges (Fig. 13 c), le rythme global possède un pic de durée longue (Fig. 13 d).

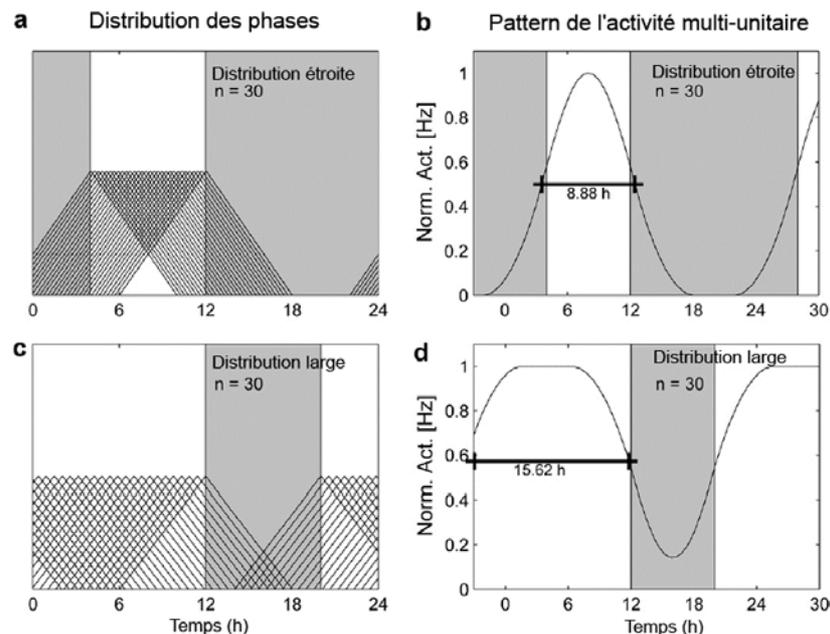


Fig. 13) Influence de la distribution des phases des activités électriques unitaires sur le profil d'activité multi-unitaire des SCN. Une distribution étroite (8h) (a) des phases de 30 activités unitaires conduit à un profil multi-unitaire compressé de type PC ; une distribution plus large (16h) conduit à un profil multi-unitaire décompressé de type PL. D'après Rohling et al. 2006.

Dans une deuxième hypothèse, la largeur du pic multi-unitaire d'activité électrique des SCN est cette fois la résultante de la **combinaison entre la distribution des phases des activités unitaires et la largeur de leur pic de décharge** (Fig. 14). En PC, si chaque neurone décharge pendant un temps très court par 24h et que la distribution des phases est étroite (Fig. 14 a), le rythme résultant au niveau de la globalité des SCN a un pic étroit (Fig. 14 b). En PL, si à la fois le temps de décharge et la phase de l'activité électrique de chaque neurone augmentent (Fig. 14 c), le rythme mesuré au niveau de la structure entière a un pic large (Fig. 14 d).

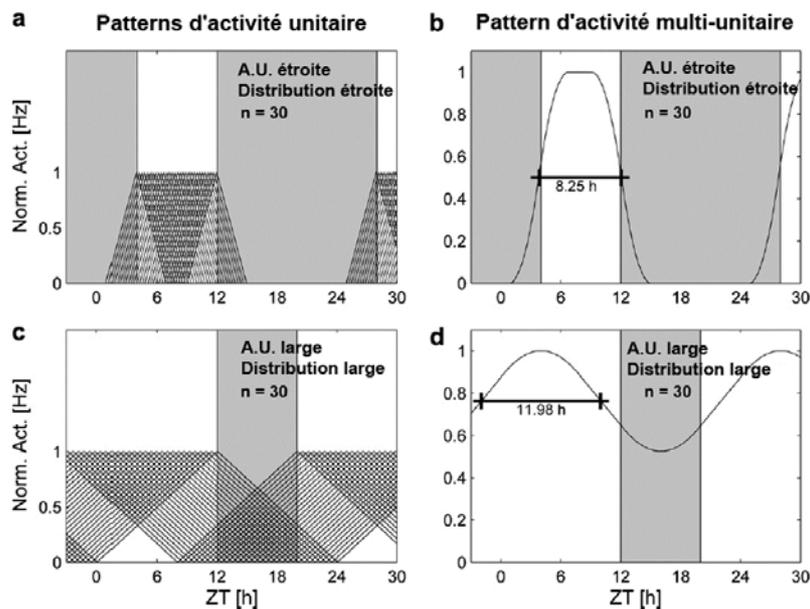


Fig. 14) Influence de la combinaison entre la distribution des phases et la largeur des pics d'activité unitaire (A.U.) des neurones des SCN sur la durée du pic d'activité multi-unitaire. Une distribution étroite de 30 A.U. de durée courte de 8h (a) est utilisée pour obtenir un profil multi-unitaire compressé de type PC (b). Une distribution large de 30 A.U. de durée longue de 16h (c) conduit à un profil multi-unitaire décompressé de type PL (d). D'après Rohling et al. 2006.

Bien que les deux hypothèses expliquent de façon séduisante la différence photopériodique de durée du pic d'activité électrique, VanderLeest et al. (2007) n'ont pas mesuré de différence significative dans la durée des pics individuels de décharge entre PL et PC. La question reste donc ouverte.

La photopériode modifie profondément les rouages moléculaires de l'horloge circadienne, ce qui est vérifié au niveau de l'expression rythmique de différentes sorties. Les SCN reçoivent donc en permanence des informations synchronisatrices de nature variée, non photiques, photique (alternance lumière/obscurité) et photopériodique, qu'ils doivent intégrer de façon harmonieuse. Le caractère harmonieux sous-entend que tous ces zeitgebers soient capables d'interagir au niveau des SCN. De telles interactions sont bien connues entre facteurs photique et non photiques (Challet & Pevet, 2003). Appliqués pendant la nuit subjective juste avant un flash lumineux, les facteurs non photiques sont capables d'inhiber les déphasages induits par la lumière. La 5-HT (dont l'action sur la synchronisation sera détaillée dans le chapitre II), le NPY et le GABA, par exemple, inhibent avances et retards de phase induits par la lumière (Gillespie *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 1997; Lall & Biello, 2003b; a). Inversement, pendant le jour subjectif, un flash lumineux appliqué avant, pendant ou après un stimulus non photique inhibe systématiquement les déphasages du rythme d'activité locomotrice, que ce soit avec un stimulus non photique comportemental (Mrosovsky, 1991) ou une injection de NPY (Maywood & Mrosovsky, 2001; Maywood *et al.*, 2002). Les facteurs non photiques sont également capables d'interagir entre eux. Par exemple, le NPY bloque les déphasages induits par la 5-HT en milieu de jour subjectif (Prosser, 1998). Par contre, il existe encore peu de données concernant les interactions entre la photopériode et les autres zeitgebers photique et non photiques.

c) Synchronisation photique et non photique en PL et en PC

Photique

En DD, la lumière possède un pouvoir synchronisant pendant la nuit subjective uniquement (voir I.3.b). La nuit subjective est donc rigoureusement définie par la période pendant laquelle les SCN sont sensibles à la lumière, *id est* la période de photosensibilité. La photosensibilité des SCN peut être mesurée par l'expression du gène précoce *c-fos* : ce marqueur de l'activation cellulaire est induit par un flash de lumière (Rea, 1989) et son induction est corrélée aux décalages de phase induits par ce même flash lumineux (Earnest *et al.*, 1990; Kornhauser *et al.*, 1990; Rusak *et al.*, 1990). De plus, une stimulation photique (Aronin *et al.*, 1990) ou non photique (Mead *et al.*, 1992; Cutrera *et al.*, 1993; Edelman & Amir, 1995) appliquée pendant le jour subjectif n'a aucun effet sur c-Fos.

Ce marqueur de photosensibilité des SCN a été employé pour mesurer la longueur de la nuit subjective chez des rats (Sumova *et al.*, 1995a) et des hamsters dorés et d'Europe (Vuillez *et al.*, 1996) maintenus dans différentes photopériodes. Chez les trois espèces, après transfert de PL à PC, la réduction de la longueur du jour s'accompagne d'un allongement de la phase de photosensibilité, ce qui indique que **l'horloge adapte sa capacité à être synchronisée par la lumière à la longueur de la nuit**. L'allongement de la phase de photosensibilité est progressif, plusieurs semaines sont nécessaires pour une extension maximale après transfert de PL à PC. Par contre, suite à un transfert inverse de PC à PL, la réduction de la phase de photosensibilité ne nécessite que trois jours (Sumova *et al.*, 1995a; Vuillez *et al.*, 1996). De manière importante, ces changements persistent chez des animaux pinéalectomisés (Sumova & Illnerova, 1996; Jacob *et al.*, 1997). La mélatonine, l'hormone de la glande pinéale véhiculant l'information photopériodique à certaines structures de l'organisme, ne semble donc pas intervenir dans l'ajustement de la phase de photosensibilité des SCN à la photopériode.

Du fait de l'allongement de la phase de photosensibilité, la courbe de réponse de phase des SCN à une stimulation lumineuse est modifiée : le rythme d'activité locomotrice de hamsters dorés peut en effet être déphasé par un flash lumineux sur un plus grand laps de temps en PC comparativement à la PL (Pittendrigh *et al.*, 1984). De plus, les avances et les retards de phase obtenus en PC sont deux à trois fois supérieurs en amplitude par rapport à ceux induits en PL par une même stimulation lumineuse, à la fois chez le hamster (Pittendrigh *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 2004) et chez la souris (vanderLeest *et al.*, 2009) (Fig. 15).

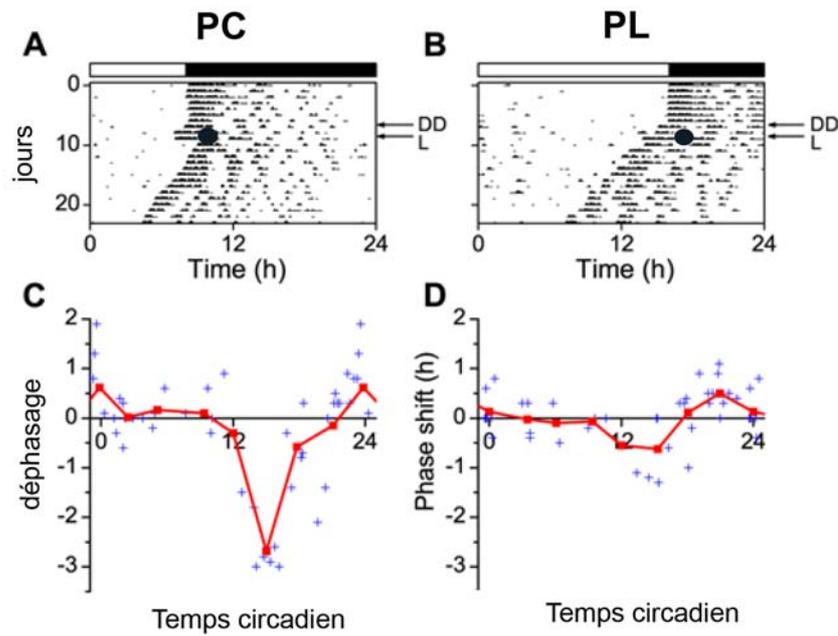


Fig. 15) Synchronisation photique du rythme d'activité locomotrice de souris en PC8:16 (gauche) et en PL16:8 (droite). Un créneau de lumière de 30min (A et B, rond noir) appliqué en DD 3h après le début d'activité de roue induit un retard de phase de grande amplitude en PC (A) et de faible amplitude en PL (B). La différence photopériodique de l'intensité des déphasages est nettement visualisée sur les CRP à la lumière en PC (C) et PL (D). La barre noire symbolise la nuit. D'après vanderLeest *et al.* 2009.

VanderLeest *et al.* (2009) ont montré que l'influence de la photopériode sur l'amplitude des déphasages du rythme d'activité locomotrice est bien intégrée au niveau des SCN. Les auteurs ont enregistré l'activité multiunitaire sur tranches de SCN provenant de souris entraînées à une PL 16:8 ou une PC 8:16. Une injection de NMDA (qui mime l'effet de la lumière) pendant le jour subjectif entraîne un décalage du rythme d'activité électrique d'une amplitude comparable à celle du rythme d'activité locomotrice, c'est-à-dire en moyenne trois fois supérieure en PC.

Il semble que ce soit une augmentation de la **sensibilité des SCN à la lumière** qui soit responsable des différences photopériodiques d'amplitude des déphasages, car de telles différences n'ont pas lieu avec un stimulus non photique (Evans *et al.*, 2004).

Non photique

Evans et al. (2004) ont étudié l'action d'un stimulus non photique comportemental, à savoir le surcroît spontané d'activité locomotrice induit par présentation d'une roue à l'animal, sur le rythme d'activité locomotrice de hamsters en PL et en PC. Le protocole était le même dans les deux photopériodes : après 31 jours d'acclimatation à la PL ou la PC, les hamsters étaient placés 2 jours en DD de manière à se couper des interactions photiques, puis exposés à 2h de roue à différentes heures du temps circadien. Les animaux étaient par la suite maintenus pendant 10 jours en DD afin de pouvoir mesurer leur période endogène τ , et finalement replacés dans leur photopériode respective.

Les décalages de phase induits par l'activité de roue ont permis aux auteurs de construire la CRP de l'horloge à ce stimulus non photique dans chaque photopériode. Aucune différence significative entre les deux CRP n'a pu être mise en évidence. Cependant, la mesure de la période endogène τ de l'horloge a révélé deux faits (Fig. 16) :

1. le τ moyen augmente en PC après stimulation non photique (alors qu'il n'est pas différent entre PL et PC chez les animaux contrôles non stimulés)
2. la valeur de τ en PC suite à la stimulation non photique dépend de l'heure circadienne à laquelle est présenté le stimulus, ce qui n'est pas le cas en PL

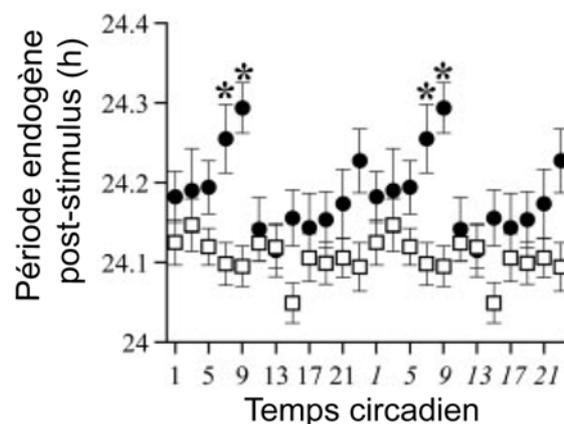


Fig. 16) Période endogène de hamsters dorés en PL14:10 (carrés blancs) et en PC10:14 (ronds noirs) mesurée après un stimulus non photique d'activité induite par la roue (2h) appliqué à différents temps circadiens. Le temps circadien CT12 est défini comme le début d'activité locomotrice.

D'après Evans *et al.* 2004.

Puisque τ est un reflet de la construction endogène du rythme circadien, il semble bien que la photopériode interagisse avec le stimulus non photique comportemental dans sa capacité à synchroniser l'horloge. Cependant, il existe encore peu de données concernant l'effet de la photopériode sur la synchronisation par d'autres stimuli non photiques, car la grande majorité des études sur la synchronisation de l'horloge circadienne ne sont réalisées qu'en PL.

En résumé

Les SCN répondent à la définition d'horloge circadienne, une structure pacemaker capable de distribuer des messages rythmiques. L'horloge circadienne peut être synchronisée par des facteurs photique et non photiques. La photopériode est un troisième message temporel capable de modifier la phase et la période de l'horloge. Elle semble interagir avec l'action synchronisatrice des facteurs photiques et non photiques, mais peu de données sont actuellement disponibles.

Pour préciser le rôle de la photopériode dans les mécanismes de synchronisation de l'horloge circadienne, il est nécessaire d'étudier le système sérotoninergique, car la 5-HT est un neurotransmetteur prépondérant dans les processus de synchronisation photique et non photique. Dans les deux prochains chapitres seront décrits le rôle de la sérotonine dans le système circadien, puis les liens entre le système sérotoninergique et différentes fonctions et comportements dépendant de la photopériode.

II. La sérotonine dans le système circadien

La sérotonine a été découverte à la fin des années 1940 (Rapport *et al.*, 1948) Sa purification depuis du sérum de bœuf et son action tonique sur la constriction des vaisseaux sanguins lui auront valu son nom. Elle fut plus tard chimiquement identifiée comme 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Rapport, 1949), nom qui lui est généralement préféré étant donné que ses effets physiologiques ne se limitent pas à la constriction vasculaire. Elle fut de fait identifiée dans le système nerveux central comme neurotransmetteur (Twarog & Page, 1953; Dahlstrom & Fuxe, 1964) et impliquée dans de nombreuses grandes fonctions comme le sommeil, la douleur, la thermorégulation. La 5-HT joue en outre un rôle important dans le contrôle de comportements tels que la prise alimentaire ou le comportement sexuel. Le neurotransmetteur est également impliqué dans le contrôle de l'humeur, associé à l'étiologie de pathologies psychologiques et psychiatriques telles qu'anxiété, schizophrénie, dépression (Lucki, 1998). Toutes ces fonctions et comportements ont une composante rythmique. Il s'avère que la sérotonine est un acteur majeur de la synchronisation de l'horloge circadienne. L'action de la 5-HT et des drogues sérotoninergiques sur l'horloge va dépendre du moment de la journée auquel elles vont être appliquées (Cutrera *et al.*, 1996; Challet & Pevet, 2003). Le temps est ainsi une variable qui est intégrée à la fois dans la synthèse et dans la libération du neurotransmetteur.

1. Neuroanatomie

Au sein du système nerveux central, la source principale de production de 5-HT est constituée par les noyaux du raphé, disposés dans le plan médian depuis le pont de Varole jusqu'au mésencéphale. Suivant l'axe caudo-rostral, on trouve successivement les noyaux du raphé obscurus, pallidus, magnus, pontis, médian, dorsal, supralemniscal et linearis.

Les neurones 5-HT des noyaux du raphé projettent dans de nombreuses régions du système nerveux central, depuis la moelle épinière jusqu'au cortex cérébral. Les noyaux les plus caudaux projettent essentiellement vers la moelle épinière, les plus rostraux innervent les régions antérieures de l'encéphale : cortex cérébral, hypothalamus, amygdale, striatum (Jacobs & Azmitia, 1992).

a) Voies sérotoninergiques raphé → SCN

Les SCN reçoivent une dense innervation sérotoninergique en provenance du raphé (voir I.3.a). Si seul le raphé médian (MnR) projette directement sur cette structure, le raphé dorsal (DR) est également anatomiquement et fonctionnellement impliqué dans la voie sérotoninergique raphé → SCN (Fig. 17).

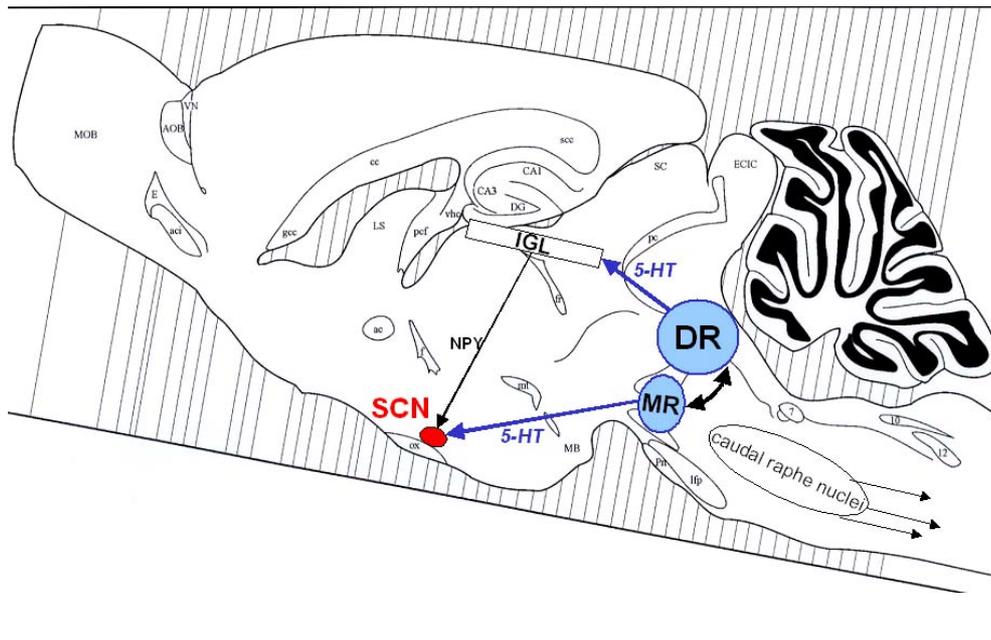


Fig. 17) Représentation des voies nerveuses sérotoninergiques directes et indirectes projetant sur les SCN sur une coupe sagittale de cerveau de hamster doré. D'après Morin & Wood, 2001.

Chez le hamster doré, l'innervation sérotoninergique des SCN provient directement du seul MnR (Morin & Meyer-Bernstein, 1999). Seule une faible proportion de cellules est concernée, dont la moitié seulement contient de la 5-HT (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998). Le fait que les fibres sérotoninergiques soient particulièrement denses dans les SCN suggère donc l'existence de nombreuses collatérales. La nature des neuromédiateurs présents dans les afférences non sérotoninergiques provenant du MnR est encore inconnue.

Le DR ne projette pas directement sur les SCN mais *via* les IGL (Meyer-Bernstein & Morin, 1996), qui envoient à leur tour des projections NPYergiques sur l'horloge.

DR et MnR ne sont pas des noyaux indépendants, il existe une innervation réciproque entre ces deux structures (Tischler & Morin, 2003), dont la fonctionnalité a été mise en évidence par des expériences de stimulation électrique. Une stimulation localisée aussi bien dans le DR que dans le MnR est capable d'induire la libération de 5-HT dans les SCN (Dudley *et al.*, 1999; Glass *et al.*, 2000; Glass *et al.*, 2003) et de mimer les effets de la 5-HT sur l'horloge. Ainsi, une stimulation électrique dans le DR ou le MnR peut d'une part bloquer l'induction de c-Fos par la lumière, et d'autre part déphaser le rythme d'activité locomotrice de l'animal (Meyer-Bernstein & Morin, 1999). Ces expériences suggèrent l'existence d'une voie nerveuse sérotoninergique DR→MnR→SCN.

b) Synthèse et libération de 5-HT

Métabolisme

La 5-HT est synthétisée à partir de l'acide aminé essentiel L-Tryptophane (Fig. 18), qui est successivement hydroxylé par la tryptophane hydroxylase (TPH) et décarboxylé en 5-hydroxytryptamine par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (AADC). La TPH est l'enzyme limitante de la voie métabolique (Ashcroft *et al.*, 1965; Lovenberg *et al.*, 1967; Jequier *et al.*, 1969), son activité et ses niveaux d'expression conditionnent les taux de sérotonine synthétisés. Cette enzyme est codée par le gène *tph1* en périphérie (sang, duodenum, glande pinéale...) et par le gène *tph2* dans le système nerveux central (Cote *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2003).

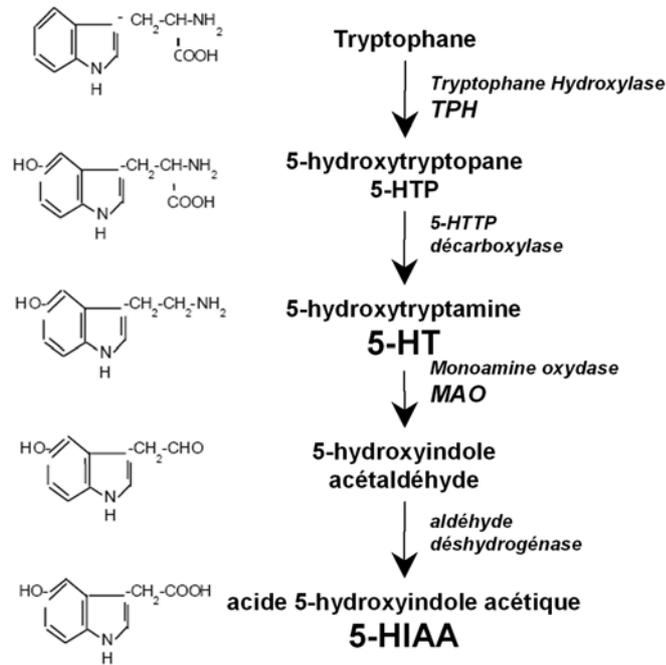


Fig. 18) Biosynthèse et principale voie catabolique de la 5-HT.

La 5-HT néo-synthétisée est prise en charge par une protéine spécifique (la Serotonin Binding Protein SBP), transportée vers les terminaisons et stockée dans des vésicules synaptiques (Del Rio *et al.*, 1995). Libérée dans la fente synaptique, la 5-HT se dissocie de sa protéine de liaison et agit sur des récepteurs spécifiques dont sept classes sont actuellement connues (Hoyer *et al.*, 2002). L'action du neurotransmetteur sur ses cibles est terminée par recapture *via* des transporteurs de sérotonine (SERT) localisés sur les neurones sérotoninergiques (Zhou *et al.*, 1998), mais également au niveau de neurones non sérotoninergiques et de cellules gliales (Pickel & Chan, 1999). Après recapture, la 5-HT est catabolisée en 5-HIAA au niveau des mitochondries par action successive de la monoamine oxydase A (MAO-A) et de l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH).

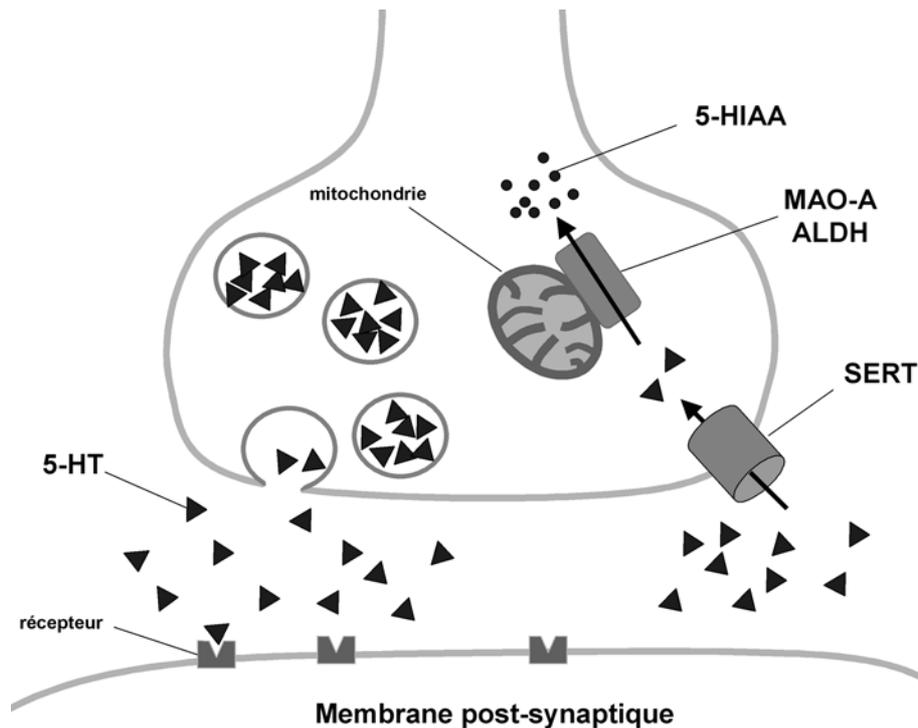


Fig. 19) Représentation schématique de la libération, recapture et dégradation de 5-HT au niveau d'une terminaison synaptique sérotoninergique.

Rythmicité

Le caractère rythmique et circadien de la synthèse de 5-HT a été très bien étudié chez le rat, évalué en premier lieu par la mesure de l'expression de l'enzyme limitante TPH. En condition 12:12 (12h de lumière, 12h d'obscurité), l'expression du gène *tph2* est rythmique dans le MnR (Fig. 20) et le DR (Malek *et al.*, 2005), et le rythme persiste en DD, avec un maximum en fin de jour/jour subjectif. Les variations circadiennes d'ARNm-*tph2* sont corrélées à un rythme circadien des taux de protéine TPH dans le MnR (Fig. 20) et les subdivisions latérales du DR (Malek *et al.*, 2004), avec un maximum en milieu de nuit/nuit subjective. Un rythme circadien des concentrations de TPH est également présent dans les terminaisons sérotoninergiques des IGL (Malek *et al.*, 2004) et des SCN (Barassin *et al.*, 2002) avec un pic en fin de jour/jour subjectif.

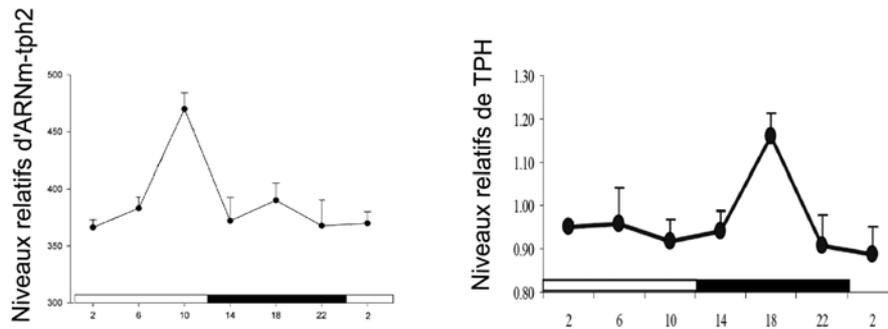


Fig. 20) Variations journalières des concentrations d'ARNm-tph2 (gauche) et de protéine TPH (droite) dans le MnR de rat. La barre noire symbolise la nuit.

D'après Malek *et al.* 2005 (gauche) et Malek *et al.* 2004 (droite).

Corrélées à ces variations circadiennes des taux de TPH, des variations journalières du contenu en 5-HT ont été décrites dans le MnR et le DR (pic début de jour, (Cagampang *et al.*, 1993) et dans les SCN (Fig. 21, pic début de nuit, (Cuesta *et al.*, 2009).

Les profils rythmiques de tous ces paramètres de la synthèse de 5-HT, depuis les taux d'ARNm de *tph2* jusqu'aux quantités de molécule synthétisée, sont systématiquement décalés de quelques heures dans le temps. Les différents décalages peuvent s'expliquer par le délai requis pour les processus intracellulaires de traduction, post-traduction, transport axonal (de l'ordre de 5 à 7mm par 24h chez le rat (Meek & Neff, 1972)) et la latence nécessaire à l'anabolisme du neurotransmetteur. **Il a donc été proposé que la rythmicité de la synthèse de 5-HT se trouve régulée au niveau de l'expression du gène *tph2*** (Malek *et al.*, 2005).

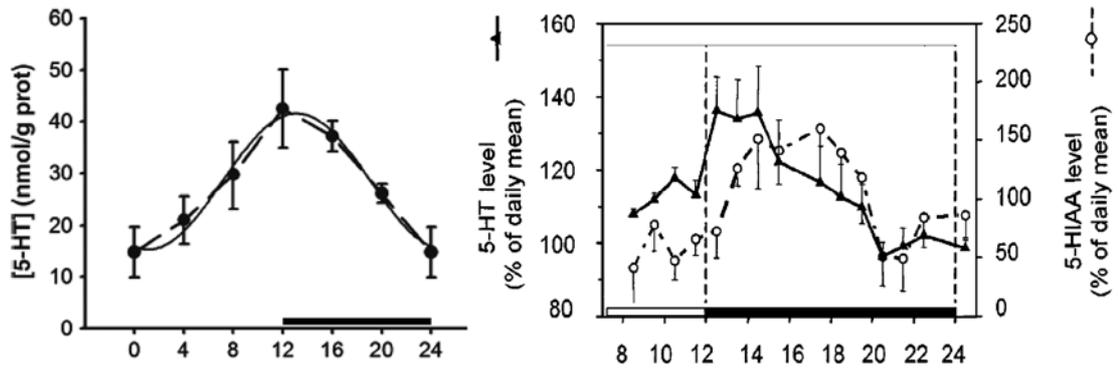


Fig. 21) Variations journalières du contenu (gauche) et de la libération de 5-HT (droite) dans les SCN de rat. La barre noire symbolise la nuit. D'après Cuesta *et al.* 2009 (gauche) et Barassin *et al.* 2000 (droite).

Etroitement associée au profil nycthémeral du contenu en 5-HT, la libération du neurotransmetteur dans les SCN, mesurée chez l'animal vigile et libre de ses mouvements par microdialyse *in vivo*, est également rythmique et persiste en obscurité constante (Fig. 21) (Barassin *et al.*, 2002). Le rythme de libération est caractérisé par des valeurs maximales en début de phase nocturne, lorsque le rat est le plus actif du point de vue comportemental, et des valeurs minimales pendant le jour, lorsque le rat présente son minimum d'activité locomotrice. Ceci est concordant avec l'activité électrique des neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé, qui dépend des différents états de vigilance (Trulson & Jacobs, 1979; Jacobs & Fornal, 1991; Jacobs & Azmitia, 1992) : lorsque le rat est actif sur le plan locomoteur (période nocturne), la décharge des neurones 5-HT est maximale ; elle est faible lorsque l'animal entre en phase de sommeil lent, nulle pendant la phase de sommeil REM (Jacobs & Fornal, 1991).

Ainsi, les phases des différents rythmes caractérisant le fonctionnement des neurones 5-HT, à savoir l'activité électrique, la synthèse et la libération de 5-HT, sont chez le rat temporellement coordonnées.

Chez le hamster doré, aucune étude n'a porté sur l'étude des variations journalières de tryptophane hydroxylase. Par contre, des rythmes du contenu en 5-HT ont été décrits dans le MnR, le DR et les SCN, avec des valeurs maximales se situant systématiquement en fin de jour (Ozaki *et al.*, 1993). De plus, la libération du neurotransmetteur, mesurée par microdialyse *in vivo* dans les IGL (Grossman *et al.*, 2004) et les SCN (Fig. 22) (Dudley *et al.*, 1998), est également rythmique et maximale en début de nuit, avec des valeurs minimales

pendant le jour. Le profil de libération de 5-HT dans les SCN est donc identique chez le rat et chez le hamster doré.

Toutefois, il faut souligner que les travaux portant sur le hamster doré ont été effectués en PL 14:10 uniquement. Aucune donnée n'existe actuellement dans la littérature concernant l'état du système sérotoninergique en PC, ni sur la synthèse de 5-HT ni sur sa libération.

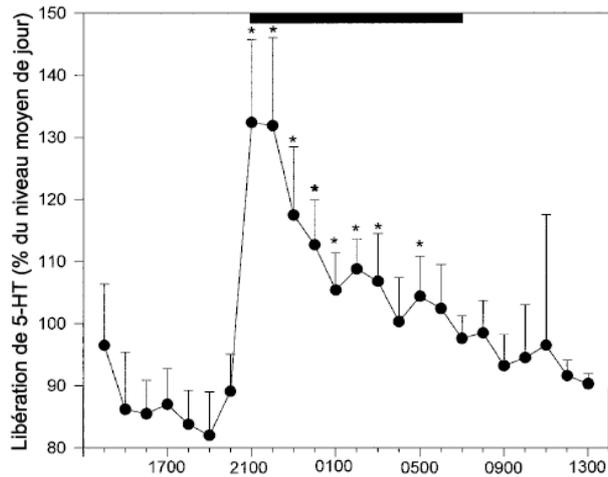


Fig. 22) Libération journalière de 5-HT dans les SCN de hamster doré en PL 14:10.

La barre noire symbolise la nuit. D'après Dudley *et al.* 1998.

2. Sérotonine et synchronisation de l'horloge circadienne

La 5-HT, comme il a été évoqué précédemment, tient un rôle prépondérant dans la synchronisation de l'horloge, car elle est impliquée dans les deux types de synchronisation, photique et non photique.

a) 5-HT modulatrice de la synchronisation photique

L'un des effets majeurs de la sérotonine sur les SCN est une inhibition des effets d'entraînement de l'horloge par la lumière (Morin, 1999). Cet effet passe au niveau des SCN par des interactions entre la sérotonine et les fibres glutamatergiques provenant de la rétine, interactions dont la médiation est assurée par plusieurs types de récepteurs 5-HT.

Injecté en systémique (Rea *et al.*, 1994) ou localement dans la région des SCN (Weber *et al.*, 1998) juste avant un flash lumineux, l'agent sérotoninergique 8-OH-DPAT (agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₇) est capable de bloquer les déphasages de l'activité locomotrice des hamsters dorés (Fig. 23).

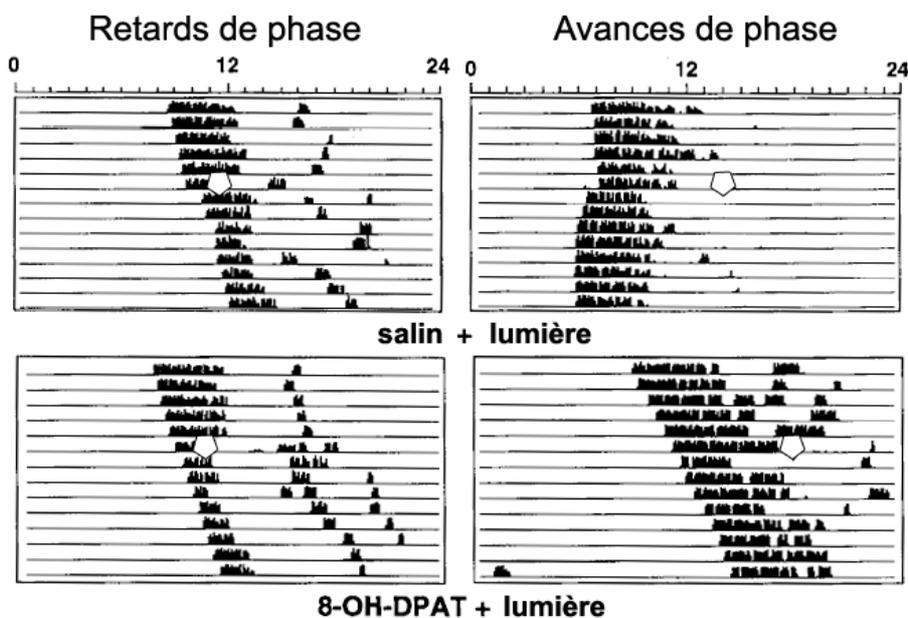


Fig. 23) Inhibition des décalages de phase du rythme d'activité locomotrice induits par la lumière par le 8-OH-DPAT chez le hamster doré en DD. Les hamsters ont reçu une injection de salin (haut), 8-OH-DPAT (milieu) 30min avant application du stimulus lumineux (pentagone) en début (gauche) ou fin de nuit subjective (droite). D'après Rea et al. 1994.

Dans les SCN, la 5-HT et le 8-OH-DPAT bloquent de manière transitoire les potentiels évoqués par une stimulation du nerf optique (Rea *et al.*, 1994; Ying & Rusak, 1994). Les mêmes molécules injectées en systémique ou appliquées localement, sont encore capables d'inhiber l'augmentation extracellulaire de glutamate (Selim *et al.*, 1993; Srkalovic *et al.*, 1994) et l'induction de c-Fos (Rea *et al.*, 1994) dans les SCN.

Il semble que l'effet intra-SCN de la 5-HT et du 8-OH-DPAT passe par une activation des **récepteurs 5-HT₇**, dont la présence a été décrite dans les SCN de hamster (Duncan *et al.*, 1999). En effet, leur blocage par application locale d'un antagoniste spécifique lève l'effet inhibiteur de la 5-HT et du 8-OH-DPAT sur les potentiels évoqués par stimulation photique (Ying & Rusak, 1997). Les **récepteurs 5-HT_{1A}** sont également présents dans les SCN de hamster (Duncan *et al.*, 1999), mais leur implication dans les processus de modulation de l'information photique est plus floue. Une injection systémique d'un antagoniste 5-HT_{1A} spécifique potentialise les déphasages d'activité locomotrice induits par la lumière (Smart & Biello, 2001). Cependant, une application locale de ce même antagoniste ne bloque pas l'effet inhibiteur de la 8-OH-DPAT sur les potentiels évoqués par la lumière (Ying & Rusak, 1997).

Une autre classe de récepteurs 5-HT est encore fortement impliquée dans la modulation de l'information photique par la sérotonine, les **récepteurs 5-HT_{1B}**. Ces récepteurs sont présents sur les terminaisons glutamatergiques du RHT (Pickard *et al.*, 1999). Leur activation locale entraîne *in vivo* une diminution de la libération de glutamate dans les SCN (Srkalovic *et al.*, 1994) et *ex vivo* une inhibition des potentiels évoqués par stimulation du nerf optique (Pickard *et al.*, 1999). De plus, une injection systémique d'agonistes 5-HT_{1B} inhibe l'expression de c-Fos dans les SCN et les déphasages de l'activité locomotrice induits par un flash de lumière (Pickard *et al.*, 1996).

b) 5-HT relais de facteurs non photiques

Pendant le jour subjectif, la sérotonine possède un pouvoir synchronisateur de type non photique. Cutrera *et al.* (1996) ont ainsi mis en évidence qu'une injection systémique de 8-OH-DPAT est capable de provoquer des avances de phase de l'activité locomotrice pendant le jour subjectif uniquement (Fig. 24). La CRP obtenue avec le 8-OH-DPAT est typiquement celle d'un stimulus non photique.

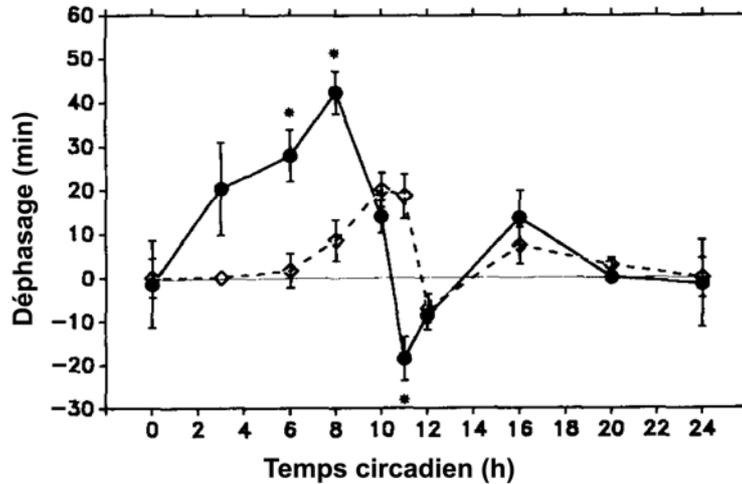


Fig. 24) Décalages de phase induits par injection i.p. de l'agoniste sérotoninergique 8-OH-DPAT (ligne pleine) en comparaison à une injection contrôle de solution saline (ligne pointillée) chez le hamster doré en DD. Les astérisques indiquent une différence significative entre 8-OH-DPAT et salin au temps circadien correspondant. D'après Cutrera *et al.* 1996.

Des résultats similaires ont été obtenus après injection locale de l'agoniste sérotoninergique dans les SCN (Challet *et al.*, 1998). De plus, une stimulation électrique du MnR et du DR déclenche la libération de 5-HT dans les SCN et induit des avances de phase de l'activité locomotrice, pendant le jour subjectif toujours (Meyer-Bernstein & Morin, 1999). Au niveau des gènes horloge, l'injection de 8-OH-DPAT en milieu de jour subjectif conduit à une diminution de l'expression de *Per1* et *Per2* dans les SCN (Horikawa *et al.*, 2000; Caldelas *et al.*, 2005), tout comme le font d'autres stimuli non photiques tels que l'activité induite par la roue (Maywood *et al.*, 1999). Les effets du 8-OH-DPAT impliquent à la fois le récepteur 5-HT_{1A} et le 5-HT₇ : des injections systémiques de pindolol, antagoniste 5-HT_{1A}, et de DR4004, antagoniste 5-HT₇, bloquent séparément l'effet du 8-OH-DPAT sur les déphasages du rythme d'activité locomotrice (Tominaga *et al.*, 1992; Ehlen *et al.*, 2001).

Par quel biais la sérotonine peut-elle synchroniser les SCN pendant le jour quand sa libération est essentiellement nocturne ? L'activation du système sérotoninergique pendant le jour peut être déclenchée de façon ponctuelle par des stimuli non photiques. Par exemple, le stimulus comportemental d'activité locomotrice induite par la roue est corrélé à une augmentation transitoire de la libération de 5-HT dans les SCN pendant le jour (Dudley *et al.*, 1998). La privation de sommeil induit de la même façon une augmentation de la libération de 5-HT dans

les SCN qui est corrélée à des avances de phase du rythme d'activité locomotrice (Grossman *et al.*, 2000). De plus, la lésion sélective des fibres sérotoninergiques raphé → SCN supprime les déphasages de l'activité locomotrice induits par injection de triazolam (Cutrera *et al.*, 1994; Schuhler *et al.*, 1999).

La 5-HT constitue donc un relais par lequel des facteurs non photiques exercent leur effet synchronisateur sur l'horloge.

En résumé

La libération de 5-HT dans les SCN est rythmique, maximale au début de la phase nocturne du nyctémère. Le caractère rythmique de la libération du neurotransmetteur est un élément important dans les phénomènes de synchronisation de l'horloge : pendant la nuit, la 5-HT inhibe la synchronisation par la lumière, et pendant le jour elle exerce sur l'horloge une action synchronisatrice de type non photique. Il est donc nécessaire qu'elle soit synthétisée et libérée au moment approprié pour une synchronisation harmonieuse.

La photopériode a été décrite comme une information temporelle modulant les synchronisations photique et non photique. Il est donc probable qu'elle ait également une influence sur la synthèse et la libération d'un paramètre aussi important que la sérotonine. Actuellement, aucune donnée ne fait état du fonctionnement du système 5-HT en photopériode courte.

La question se pose de savoir comment l'information photopériodique peut atteindre le DR et le MnR. Aucune voie nerveuse directe depuis la rétine ou les SCN (Kalsbeek *et al.*, 1993) vers aucun noyau du raphé n'a en effet été décrite chez le hamster doré. Ce serait donc de manière indirecte, *via* un messager exprimé de manière différentielle en PL et en PC, que l'information photopériodique pourrait être distribuée au DR et au MnR. De nombreux paramètres physiologiques et comportementaux sont grandement modifiés entre PL et PC. Plusieurs de ces paramètres dépendants de la photopériode ont été décrits comme des modulateurs du système 5-HT en PL.

Dans le prochain chapitre seront détaillés les principaux changements physiologiques et comportementaux provoqués par la photopériode chez le hamster doré. Chaque fonction et comportement photopériodique sera analysé dans la perspective de ses liens avec le système sérotoninergique.

III. Modulation du système 5-HT par des processus dépendant de la photopériode

Généralités sur la physiologie saisonnière du hamster doré

C'est grâce à la photopériode que les mammifères se situent dans le temps saisonnier. Cela leur permet d'anticiper la venue de l'automne et de l'hiver, pauvres en ressources alimentaires et peu propices aux naissances. L'un des paramètres saisonniers les mieux étudiés est le contrôle de la fonction de reproduction, dont le hamster doré représente un modèle d'étude classique.

Le hamster doré est une espèce dite de jour long, c'est pendant la période de l'année où la longueur des jours augmente qu'il se reproduit en condition naturelle. La durée de gestation des femelles est très courte (21 jours). Les hamsters atteignent la puberté au bout de 45 à 60 jours, les mâles un peu plus tardivement que les femelles. L'espérance de vie est chez cette espèce de deux ans environ (Bartke, 1985 ; Lisk, 1985).

En condition naturelle, les jours diminuent à partir du solstice d'été (21 juin). Lorsque l'équinoxe d'automne approche (22 septembre), la longueur des jours diminue jusqu'à égaler la longueur des nuits (Fig. 25). Lorsqu'une certaine photopériode, dite critique, est atteinte, la fonction et le comportement reproducteur du hamster doré entrent progressivement en quiescence (Fig. 25 ; 1). Chez le mâle, les taux circulants de gonadotropines déclinent (Reiter & Johnson, 1974; Turek *et al.*, 1975; Tamarkin *et al.*, 1976; Turek *et al.*, 1976), la spermatogénèse est inhibée et les testicules s'atrophient (Desjardins *et al.*, 1971; Tamarkin *et al.*, 1976). Conséquemment, la biosynthèse des hormones sexuelles est sévèrement diminuée (Ottenweller *et al.*, 1987), ce qui se traduit par une atrophie des vésicules séminales (Desjardins *et al.*, 1971; Tamarkin *et al.*, 1976) et une perte de la libido (Morin *et al.*, 1977). Pendant toute la durée de l'hiver, le hamster est sexuellement inactif (Fig. 25 ; 2). Puis, environ 24 à 25 semaines après l'entrée en quiescence, l'axe reproducteur du hamster se réactive spontanément (Fig. 25 ; 3). Cette réactivation est indépendante de la photopériode, elle survient bien avant l'équinoxe de printemps (21 mars) et permet au hamster d'anticiper la période de l'année favorable à sa reproduction.

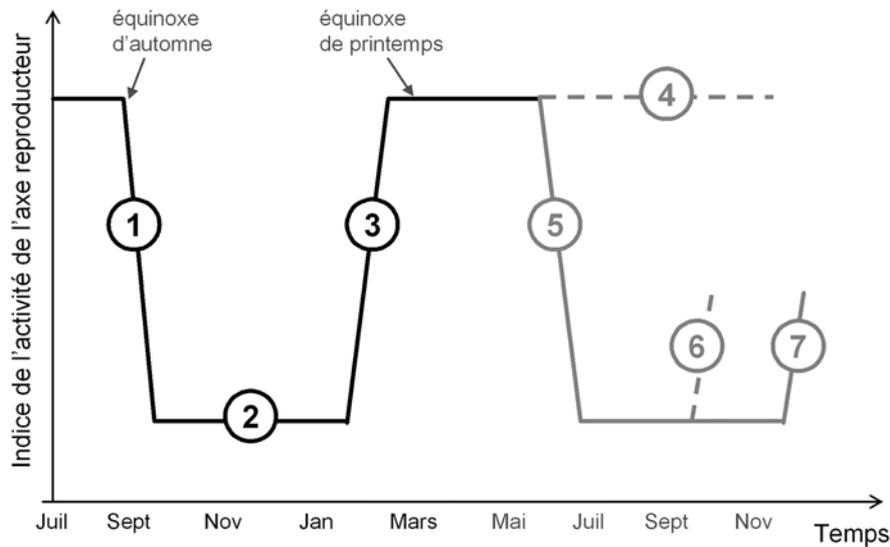


Fig. 25) Régulation photopériodique de la fonction de reproduction, en éclairage naturel (noir) et de laboratoire (gris). Adapté de Gorman *et al.* 2001.

En condition de laboratoire, l'activité sexuelle du hamster est maintenue aussi longtemps qu'il reste en PL (Fig. 25 ; 4). L'entrée en quiescence est induite après exposition à une photopériode courte (10:14 et 8:16 sont des PC classiquement utilisées). Huit semaines sont nécessaires à la pleine intégration physiologique de la PC (Fig. 25 ; 5). La photopériode critique, déterminée expérimentalement par exposition prolongée de hamsters adultes à différents régimes photopériodiques et mesure de l'atrophie testiculaire, varie entre 12h30 (Gaston & Menaker, 1967) et 12h (Vitaterna & Turek, 1993) suivant les études. Une fois que le hamster a intégré la PC, l'axe reproducteur est réactivé soit expérimentalement par exposition à une PL (Fig. 25 ; 6) soit spontanément environ 24 semaines après la mise en PC (Fig. 25 ; 7 ; le hamster échappe alors à l'effet inhibiteur de la PC, il est en phase photoréfractaire).

La photopériode modifie d'autres paramètres physiologiques et comportementaux du hamster doré. En PC, sa masse corporelle augmente suite à une accumulation de masse grasseuse (Bartness & Wade, 1985). Son activité locomotrice nocturne est « compressée » en PL et « décompressée » en PC (Hastings *et al.*, 1987; Elliott & Tamarkin, 1994). Le même phénomène est observé pour la durée du pic nocturne de mélatonine, compressé pendant les nuits courtes d'été et décompressé pendant les nuits longues d'hiver (Hastings *et al.*, 1987;

Elliott & Tamarkin, 1994). En PC, les rythmes de sécrétion d'hormones telles que les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes sont abolis ou fortement diminués en amplitude (Otteweller *et al.*, 1987).

Le système sérotoninergique est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de ces fonctions physiologiques et comportements. La 5-HT contribue à la régulation de la sécrétion d'hormones telles que la prolactine (Freeman *et al.*, 2000; Samson *et al.*, 2003) et la LH (Vitale & Chiochio, 1993). Elle peut activer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) pour stimuler la synthèse et la libération des glucocorticoïdes (Liposits *et al.*, 1987; Fuller, 1992; Bagdy & Makara, 1994; Fuller, 1996; Jorgensen, 2007). La 5-HT est également impliquée dans le contrôle de la locomotion (Schmidt & Jordan, 2000; Jordan *et al.*, 2008) et exerce un contrôle inhibiteur sur la prise alimentaire (McGuirk *et al.*, 1992; Simansky, 1996).

En retour, certains de ces comportements et fonctions physiologiques photopériodiques modulent le fonctionnement du système sérotoninergique, apparaissant ainsi comme des messagers capables de distribuer l'information photopériodique à ce dernier. Quatre de ces facteurs vont être détaillés, pour leurs liens étroits avec le système sérotoninergique et leur rôle potentiel ou avéré de donneur de temps photopériodique.

1. Mélatonine

La mélatonine est l'hormone donneuse de temps photopériodique par excellence. Chez les mammifères, elle est synthétisée principalement par la glande pinéale. Sa synthèse est nocturne, rythmique, et sous contrôle de l'horloge circadienne.

a) Hormone circadienne et saisonnière

La voie SCN → pinéale est polysynaptique, elle fait intervenir comme structures relais les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), les noyaux de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière et les ganglions cervicaux supérieurs (Larsen, 1999; Teclemariam-Mesbah *et al.*, 1999). La lésion des SCN ou de l'une de ces structures relais entraîne une abolition du rythme de mélatonine ou de celui de l'expression de l'enzyme limitante pour sa synthèse, l'arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) (Klein & Moore, 1979; Kalsbeek *et al.*, 2000; Garidou *et al.*, 2001; Perreau-Lenz *et al.*, 2003).

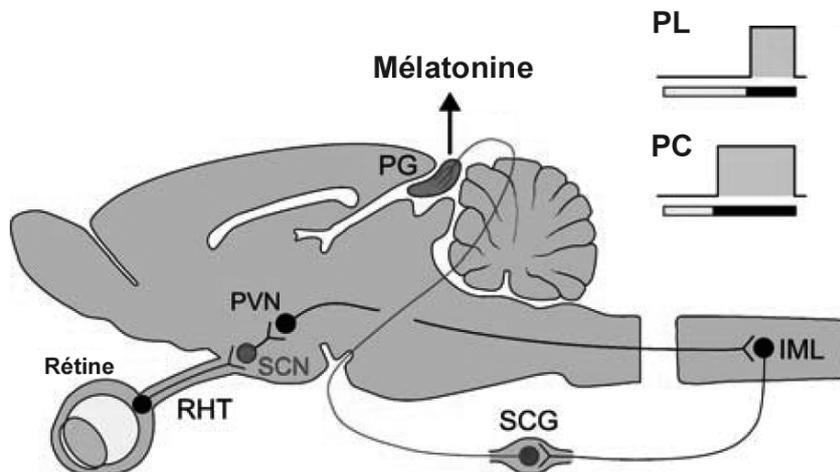


Fig. 26) Contrôle photopériodique de la sécrétion de mélatonine. Le message photopériodique est intégré par les SCN et distribué à la glande pinéale (PG) par une voie polysynaptique via les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), les noyaux de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (IML) et les ganglions cervicaux supérieurs (SCG). La sécrétion nocturne de mélatonine est compressée en photopériode longue (PL) et décompressée en photopériode courte (PC).

D'après Revel *et al.* 2007.

Tout comme la sérotonine, la mélatonine est synthétisée à partir de l'acide aminé tryptophane. Le tryptophane est d'abord hydroxylé par la TPH1 puis décarboxylé en 5-HT. Dans cette réaction, la TPH1 n'est pas limitante car présente en quantités non saturables. Puis, par action successive de l'AA-NAT et de l'hydroxy-indole-O-méthyl-transférase (HIOMT), la 5-HT est transformée en mélatonine.

Chez les rongeurs, c'est par une régulation rythmique de l'expression du gène *Aa-nat* que les SCN contrôlent le rythme de synthèse de mélatonine. Les ARNm-*Aa-nat* s'accumulent pendant la phase nocturne ; une fois traduite, l'enzyme est immédiatement active, et sa présence en quantités élevées pendant la nuit conditionne le pic nocturne de synthèse de l'hormone (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Après synthèse, la mélatonine est directement libérée dans la circulation générale et le liquide cébrospinal, dans lesquels sa demi-vie est courte, de l'ordre de 20min (Malpaux *et al.*, 2001).

La durée du pic de mélatonine est modulée par la durée de l'expression de l'*Aa-nat* (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Au cours des saisons, les variations de la durée relative de la nuit modifient la longueur de la période pendant laquelle l'*Aa-nat* est transcrit (Ribelayga *et al.*, 1999). En PL, le pic est étroit, et lorsque les jours raccourcissent le pic s'élargit. En conséquence, **la photopériode est intégrée dans le rythme de synthèse de mélatonine.**

b) Mélatonine et reproduction

L'effet le plus remarquable de la mélatonine est son rôle de **donneur de temps photopériodique**, en particulier pour le contrôle saisonnier de la fonction de reproduction (Pevet, 2003). C'est par la durée de son pic nocturne de sécrétion que l'hormone distribue le message photopériodique (Fig. 26). Chez des hamsters dorés pinéalectomisés, des infusions quotidiennes de mélatonine pendant 16h mimant une sécrétion de type « jour court » sont capables d'induire l'atrophie testiculaire, au contraire d'infusions de 6h typiques de jours longs (Bartness *et al.*, 1993). De plus, des injections en fin de jour ou en fin de nuit chez des hamsters dorés en PL, qui miment un allongement de la durée de la nuit, sont également capables de provoquer la réduction des gonades, alors que des injections pendant le jour sont sans effet (Gauer *et al.*, 1994).

c) Système 5-HT

De nombreux effets de la mélatonine sur le système 5-HT ont été décrits chez le rat. Deux semaines après pinéalectomie, les taux de 5-HT et 5-HIAA, de même que l'activité de la TPH sont diminués dans différents noyaux de l'hypothalamus (Sugden & Morris, 1979; Miguez *et al.*, 1991). La pinéalectomie n'a cependant pas d'effet sur les taux de 5-HT dans la région des noyaux du raphé (Sugden & Morris, 1979). Inversement, un traitement avec des injections de mélatonine répétées quotidiennement provoque une augmentation des taux de 5-HT ou de 5-HIAA dans de nombreuses régions cérébrales, dont l'hypothalamus et l'amygdale (Miguez *et al.*, 1994). *In vitro*, la mélatonine est de plus capable de bloquer les décalages de phase du rythme d'activité électrique des SCN induits par le 8-OH-DPAT (Prosser, 1999). Plusieurs équipes ont étudié la libération et la recapture de 5-HT dans des synaptosomes générés à partir de plusieurs régions hypothalamiques ; des injections de mélatonine sur ces préparations, répétées pendant plusieurs jours, entraînent une augmentation de la recapture et modulent la libération de 5-HT (Cardinali *et al.*, 1975; Miguez *et al.*, 1995). **Il semble donc que, chez le rat, la mélatonine influence localement le turnover et l'action de la 5-HT par une modulation de sa libération et de sa recapture.**

Ceci paraît cohérent avec une étude chez le hamster doré, chez qui des injections répétées de mélatonine en fin de jour induisent une augmentation du contenu en 5-HT dans le noyau caudé du striatum mais ne modifient pas l'activité de la TPH (Alexiuk & Vriend, 2007). Cette étude est cependant sujette à caution de par le fait que les injections de mélatonine induisent une régression des testicules, signe que l'animal initialement en PL acquiert un statut hormonal de type PC à la fin de l'expérience. La comparaison de ces animaux « PC-like » avec des contrôles PL non injectés et non régressés est donc problématique, masquant des interactions probables entre un effet direct de la mélatonine et le statut physiologique général des animaux.

Des expériences d'autoradiographie avec de la mélatonine marquée avec un isotope radioactif ont permis de mettre en évidence les sites de fixation de la mélatonine. Plus d'une centaine de structures cérébrales ont pu être détectées par cette méthode chez les mammifères, mais avec une grande variabilité inter-espèces dans la localisation et le nombre de structures marquées. Il en ressort que seuls les SCN et la pars tuberalis apparaissent de façon marquée chez la plupart des espèces de rongeurs étudiées. Il semble également que les noyaux du raphé ne

soient pas une cible majeure de la mélatonine puisqu'aucun marquage spécifique n'y a été détecté, au contraire de structures hypothalamiques telles que l'aire préoptique médiane, le noyau ventromédian ou les SCN (Masson-Pevet *et al.*, 1994). **Il semble donc que l'effet direct de la mélatonine sur le système 5-HT s'effectue au niveau des terminaisons sérotoninergiques dans des régions spécifiques du cerveau, et non au niveau des corps cellulaires au sein du raphé.**

2. Stéroïdes sexuels

La synthèse et la libération de testostérone sont régulées par l'axe hypothalamo-hypophysogonadique (axe HPG). L'hormone contrôle les caractères sexuels secondaires et agit au niveau du système nerveux central, au sein duquel elle influence le comportement sexuel et module sa propre sécrétion par rétroaction sur l'axe HPG.

a) Contrôle photopériodique de l'axe HPG

Chez les mammifères, la fonction de reproduction est sous contrôle des gonadotropines LH et FSH, qui sont libérées dans la circulation par les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure. Chez le mâle, la LH stimule la production de la testostérone par les cellules de Leydig, tandis que la FSH stimule la maturation des cellules germinales.

La libération de LH et FSH est contrôlée par la gonadotropin releasing hormone (GnRH), sécrétée de façon pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Les corps cellulaires des neurones à GnRH sont situés principalement dans l'hypothalamus medio-basal, les aires septo-préoptiques, la partie rostrale de la région péricommissurale et la région péri-mammillaire (Barry & Dubois, 1976). Le fait que leur population ne soit pas regroupée dans un site bien défini rend leur étude malaisée (Witkin *et al.*, 1982; Hahn & Coen, 2006).

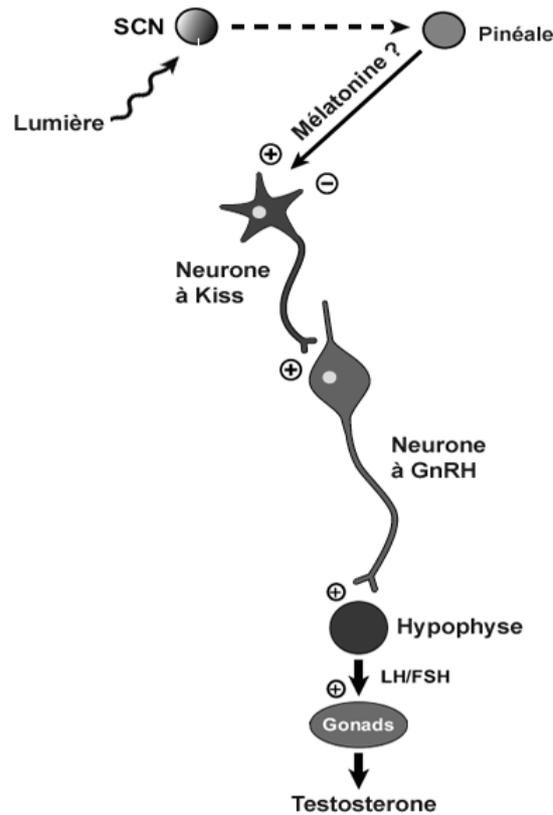


Fig. 27) Contrôle photopériodique de la sécrétion de testostérone par l'axe HPG. La sécrétion de testostérone découle de l'activation en chaîne des différents acteurs de l'axe HPG : neurones à Kiss du noyau arqué (libération de neuropeptide Kiss), neurones à GnRH de l'hypothalamus (libération de GnRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire), cellules gonadotropes hypophysaires (libération de LH et FSH dans la circulation générale), stimulation des cellules de Leydig productrices des hormones sexuelles. La photopériode semble influencer sur le fonctionnement de l'axe par un contrôle mélatoninergique de la production de neuropeptide Kiss par les neurones à Kiss du noyau arqué. D'après Popa *et al.* 2008.

En PC, l'axe HPG est quiescent. Paradoxalement, les neurones à GnRH sont encore capables de synthétiser l'hormone en photopériode courte, de même qu'après un traitement exogène à la mélatonine qui inhibe l'axe HPG (Glass, 1986; Ronchi *et al.*, 1992a; Ronchi *et al.*, 1992b; Brown *et al.*, 2001). De plus, l'axe HPG est toujours sensible à l'action de la GnRH puisqu'un traitement exogène avec des amino-acides excitateurs conduit à une libération de GnRH et une augmentation faible mais significative des taux circulants de gonadotropines (Meredith *et al.*, 1991; Hui *et al.*, 1992). L'hypothèse actuelle est donc que la quiescence de l'axe HPG soit due à une **inhibition de la libération de GnRH en PC** (Brown *et al.*, 2001).

La régulation des neurones à GnRH implique une famille de neuropeptides codés par le gène *Kiss1*, les kisspeptines, et leur récepteur Kiss-R (ou GPR54), qui est exprimé sur les neurones à GnRH (Irwig *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005). Les kisspeptines sont de puissants stimulateurs de la libération de GnRH : chez la souris mâle, l'administration centrale de kisspeptine à des doses minimales stimule la sécrétion de LH et FSH, effet bloqué par pré-traitement par des inhibiteurs compétitifs de la GnRH (Gottsch *et al.*, 2004; Irwig *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2004). Chez des souris dont le gène codant Kiss-R est invalidé, l'injection de kisspeptine n'est plus capable de stimuler la libération des gonadotropines (Messenger *et al.*, 2005).

Les kisspeptines sont fortement exprimées dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Smith *et al.*, 2006). Les neurones à Kiss de ce noyau sont une cible à la fois des stéroïdes sexuels et de la mélatonine. Les stéroïdes sexuels exercent sur eux un rétrocontrôle négatif, car une gonadectomie augmente les niveaux d'expression de *Kiss1*, effet inversé par traitement exogène aux stéroïdes sexuels (Navarro *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005). En photopériode courte, l'expression de *Kiss1* dans le noyau arqué est inhibée chez le hamster doré mâle (Revel *et al.*, 2006), ce qui n'est pas dû aux stéroïdes sexuels puisque des implants de testostérone chez des animaux en PC ne modifient pas les taux de *Kiss1*-mRNA. L'hypothèse actuelle est donc que la photopériode inhiberait le tonus stimulateur exercé par les neurones à Kiss sur la libération de GnRH. Cet effet pourrait être exercé par la mélatonine, puisque la pinéalectomie de hamsters en PL avant transfert en PC empêche à la fois la diminution des taux de *Kiss1*-mRNA et l'inactivation de l'axe HPG (Revel *et al.*, 2006).

C'est donc probablement au niveau des neurones kisspeptinergiques que la photopériode, par l'intermédiaire de la mélatonine, agit sur le contrôle de l'axe HPG.

b) Testostérone et récepteurs aux stéroïdes sexuels

Testostérone et 17 β -estradiol sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol. Chez le mâle, l'androgène circulant principal est la testostérone ; celle-ci peut être métabolisée en un autre androgène, la 5 α -dihydrotestostérone (DHT), par la 5 α -reductase (Fig. 28) (Hsiao *et al.*, 2000). Les deux androgènes se lient au récepteur du même nom (AR pour androgen receptor), avec une affinité beaucoup plus forte pour la DHT. Les AR sont des récepteurs

nucléaires capables, après activation et dimérisation, de se lier à des séquences promotrices ARE (androgen response element) de l'ADN et de moduler la transcription des gènes en aval de ces séquences (Black & Paschal, 2004). Cette voie d'action génomique est lente, supérieure à 30min. D'autres modes d'action cellulaires rapides et non génomiques des androgènes ont été décrits. Nombreux et variés, ces mécanismes impliquent l'activation de récepteurs membranaires couplés à des protéines G, la stimulation de différentes protéines kinases, la modulation directe de canaux et de transporteurs ligand et voltage-dépendants (Heinlein & Chang, 2002; Michels & Hoppe, 2008).

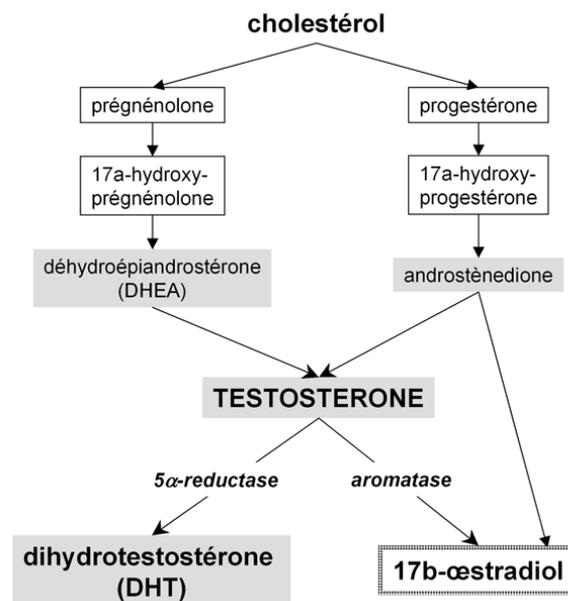


Fig. 28) Voie de biosynthèse des stéroïdes sexuels principaux. Encadrés trait pleins : progestagènes ; en gris : androgènes ; encadré pointillé : œstrogène ; en italique : enzyme.

D'après Michels & Hoppe 2008.

La testostérone est un précurseur des œstrogènes, elle peut être transformée en 17β-œstradiol par la P450-aromatase (ou aromatase, ou estrogen synthase) et agir sur des récepteurs aux œstrogènes (ER), ce qui n'est pas le cas de la DHT, non aromatisable. Il existe deux types de ER, ERα et ERβ, qui appartiennent comme tout récepteur aux stéroïdes à la superfamille des récepteurs nucléaires. Une fois activés par leur ligand, ERα et ERβ peuvent former des homo- et hétérodimères capables de se lier à des séquences ERE (estrogen response element) de

l'ADN et réguler la transcription des gènes en aval. Ils peuvent également agir sous forme de monomères pour réguler la transactivation exercée par d'autres facteurs de transcription (Matthews & Gustafsson, 2003; Zhao *et al.*, 2008). Enfin, tout comme pour les AR, des effets non génomiques des ER ont été décrits, qui passeraient par des récepteurs membranaires non encore complètement caractérisés (Prossnitz *et al.*, 2007; Raz *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008).

Les deux types de récepteur, AR et ER, ainsi que les enzymes de conversion des stéroïdes sexuels, sont présents dans de nombreuses structures du système nerveux central du hamster doré mâle, avec une distribution différentielle en fonction des structures considérées (Martini *et al.*, 1990; Wood & Newman, 1995). La testostérone peut donc potentiellement exercer des effets régionaux spécifiques dépendant de son aromatisation, de sa conversion en différents métabolites et de son action subséquente sur différents types de récepteurs.

c) Testostérone et photopériode

Chez le hamster doré, l'inhibition de l'axe HPG et l'atrophie des gonades en PC conduisent à une chute drastique de la synthèse et de la libération de testostérone (Desjardins *et al.*, 1971; Tamarkin *et al.*, 1976; Negri-Cesi *et al.*, 1987; Ottenweller *et al.*, 1987). Le caractère rythmique de la sécrétion de l'hormone stéroïdienne est aboli, et les taux circulants deviennent quasiment nuls (Fig. 29).

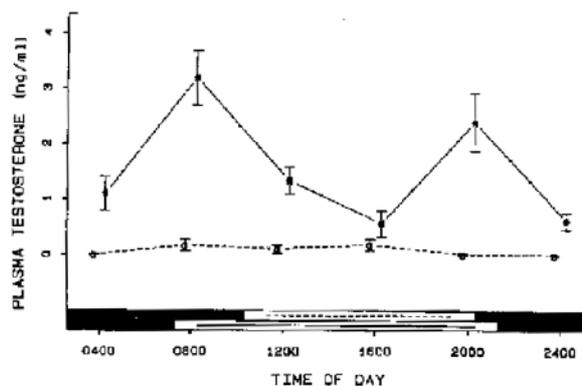


Fig. 29) Sécrétion journalière de testostérone chez le hamster doré en PL 14 :10 (trait plein) et PC 10 :14 (trait pointillé). Les barres noires symbolisent la nuit. D'après Ottenweller *et al.* 1987.

Parallèlement, la sensibilité de l'axe HPG aux stéroïdes sexuels augmente en PC, car les doses de testostérone, de DHT et d'estradiol nécessaires à la suppression des taux plasmatiques de LH et FSH sont bien plus faibles chez des animaux castrés en PC que chez des animaux castrés en PL (Tamarkin *et al.*, 1976; Turek, 1977). Au contraire, à dose équivalente, la testostérone induit une activation beaucoup moins forte du comportement de copulation chez des hamsters castrés maintenus en PC par rapport à des hamsters castrés en PL (Morin *et al.*, 1977). La photopériode semble donc moduler de façon spécifique l'axe HPG et les fonctions qui lui sont associées.

Ceci peut s'expliquer par une expression différentielle et régionalisée des récepteurs et enzymes de conversion des stéroïdes sexuels en PL et en PC. Par exemple, la conversion de la testostérone en Δ^4 -androstène-3,17-dione (androstenedione, un androgène aromatisable en estrone) est augmentée en PC uniquement dans l'hypophyse, ce qui pourrait participer à une régulation locale de l'action de la testostérone sur l'axe HPG (Negri-Cesi *et al.*, 1987).

Au contraire, l'activité de l'aromatase est diminuée en PC dans des régions telles que l'hypothalamus ou le mésencéphale (Callard *et al.*, 1986; Negri-Cesi *et al.*, 1989; Martini *et al.*, 1990; Hutchison *et al.*, 1991), mais pas le cortex cérébral (Martini *et al.*, 1990).

L'activité de l'aromatase semble être contrôlée par les taux d'androgènes circulants, car une castration induit une diminution d'activité de l'enzyme (Turek *et al.*, 1975; Callard *et al.*, 1986), effet inversé par application exogène de testostérone (Turek *et al.*, 1975). La diminution de l'activité de l'aromatase en PC peut donc s'expliquer par une chute des taux circulants de testostérone. Cependant, Callard *et al.* (1986) ont rapporté une diminution significativement plus importante de l'activité de l'aromatase chez des animaux castrés et exposés à une photopériode courte. De plus, l'effet de la photopériode courte sur l'activité de l'aromatase n'est pas compensé par un traitement à la testostérone (Hutchison *et al.*, 1991). Il semble donc que **la photopériode constitue un facteur régulateur de l'aromatisation de la testostérone, agissant au niveau de structures spécifiques de l'encéphale**. Une diminution de la conversion de la testostérone en estrogènes pourrait être un facteur reflétant une régulation photopériodique de l'action centrale de la testostérone.

Chez le hamster d'Europe, la testostérone joue un rôle physiologique prépondérant dans le contrôle photopériodique du cycle d'hibernation par le système vasopressinergique. En PC, suite à la réduction des taux circulants de l'hormone, l'immunoréactivité vasopressinergique

est fortement réduite dans de nombreuses régions du cerveau, dont la bande diagonale de Broca, le noyau habénulaire latéral, l'amygdale médiane, l'hippocampe ventral, et particulièrement le septum latéral (Buijs *et al.*, 1986). La même réduction d'immunoréactivité vasopressinergique est mesurée après castration, et les effets de la castration et de la PC sont inversés par des implants de testostérone et d'estrogènes (de Vries *et al.*, 1984; Buijs *et al.*, 1986). Or, chez certains mammifères la neurotransmission vasopressinergique dans le septum latéral est impliquée dans le maintien d'une température corporelle normale, agissant comme une sorte de soupape de sécurité prévenant des écarts de température trop importants (Cooper *et al.*, 1979; Malkinson *et al.*, 1987). La disparition de l'innervation vasopressinergique en PC est donc un prérequis nécessaire à l'expression des phases d'hypothermie caractéristiques de l'hibernation. Effectivement, l'infusion continue pendant 8 semaines d'AVP dans le septum latéral de hamsters en PC inhibe quasiment complètement les phases d'hypothermie, tandis que les hamsters infusés avec du Ringer dans le septum latéral ou avec de l'AVP dans des structures en-dehors du septum latéral présentent encore des phases d'hypothermie (Hermes *et al.*, 1989). **La diminution des taux circulants de testostérone en PC est donc nécessaire à la réduction de la neurotransmission vasopressinergique dans le septum latéral et à l'entrée en hibernation subséquente des hamsters d'Europe.** Il est probable qu'un mécanisme similaire existe chez le hamster doré, chez qui la castration et la PC induisent une diminution de la densité des récepteurs vasopressinergiques Avpr1a dans plusieurs régions de l'hypothalamus (Johnson *et al.*, 1995; Caldwell *et al.*, 2008).

d) Action des stéroïdes sexuels sur le système sérotoninergique

Au niveau central, la testostérone et les stéroïdes sexuels agissent sur de nombreuses structures de l'hypothalamus et de l'hippocampe impliquées dans le contrôle du comportement sexuel (Matsuda *et al.*, 2008), de la prise alimentaire (Ozawa, 2005), de la mémoire (Foy *et al.*, 2008), de la douleur (Craft, 2007), de l'anxiété et de l'agressivité (Clark & Henderson, 2003; Mong & Pfaff, 2003).

Chacun de ces processus physiologiques, comportementaux et émotionnels est régulé par la sérotonine (Sijbesma *et al.*, 1990; Van de Kar, 1991; Jacobs & Azmitia, 1992; Wang & Nakai, 1994; Coccaro *et al.*, 1997).

Les preuves d'une action des stéroïdes sexuels sur le fonctionnement du système sérotoninergique sont nombreuses, autant au niveau des noyaux du raphé que dans les terminaisons 5-HT de diverses structures cérébrales. Chez le rat, l'injection i.c.v. de testostérone ou de 17 β -estradiol entraîne une augmentation de l'activité électrique des neurones 5-HT du DR, aussi bien chez le mâle que chez la femelle (Robichaud & Debonnel, 2005). La castration diminue le nombre de cellules exprimant le transporteur de la sérotonine SERT dans le DR, mais pas dans le MnR (McQueen *et al.*, 1999). L'effet inhibiteur de la castration est inversé par injection de testostérone et d'estradiol. Cet effet semble impliquer les ER spécifiquement, car l'injection de DHT (androgène non aromatisable) n'inverse pas la diminution du nombre de cellules *SERT*-mRNA positives induite par la castration (McQueen *et al.*, 1999). Parallèlement, la densité de SERT, mesurée par liaison de paroxétine (inhibiteur de recapture de 5-HT) radioactive, diminue après castration dans le noyau arqué et le raphé médian, et augmente dans l'amygdale basolatérale et l'hypothalamus ventromédian après traitement à l'estradiol et à la testostérone (McQueen *et al.*, 1999). **Chez le rat, l'effet de la testostérone passe donc au moins par la modulation des taux extracellulaires de 5-HT**, *via* une régulation de l'activité électrique et de l'expression du transporteur. Ces travaux ont été rapprochés de l'effet bénéfique de la testostérone pour traiter certaines formes de dépression chez l'Homme (Ebinger *et al.*, 2008; Amore *et al.*, 2009), effet thérapeutique qui pourrait impliquer une activation du système sérotoninergique.

Chez le macaque rhésus femelle, des travaux consistants de l'équipe de Cynthia Bethea ont mis en évidence l'action stimulatrice des estrogènes sur l'expression de la tryptophane hydroxylase et sur d'autres paramètres du système sérotoninergique. Chez des femelles ovariectomisées, un traitement chronique aux estrogènes entraîne une augmentation d'un facteur 4 à 6 des taux d'ARNm-*tph2* (Sanchez *et al.*, 2005) et de protéine TPH (Bethea *et al.*, 2000) dans le DR. Parallèlement, les estrogènes induisent dans le DR une diminution des taux intracellulaires d'ARNm-SERT et du nombre de cellules exprimant le transporteur (Pecins-Thompson *et al.*, 1998). De même, les hormones ovariennes entraînent une diminution de l'expression du gène codant la MAO-A dans le DR et différents noyaux hypothalamiques (Gundlah *et al.*, 2002). En résumé, **les estrogènes activent le fonctionnement du système sérotoninergique des macaques femelles en augmentant l'expression de TPH et la disponibilité extracellulaire de 5-HT**.

Les estrogènes ont le même effet potentialisateur chez le cochon d'Inde femelle, leur administration après ovariectomie augmente les taux de protéine TPH dans le DR et les taux

de 5-HT dans l'hypothalamus (Lu *et al.*, 1999), chez cette espèce qui exprime ER β dans le DR (Lu *et al.*, 1999).

Chez le hamster doré mâle en PL, les androgènes diminuent le nombre de fibres 5-HT dans certaines régions de l'hypothalamus et de l'amygdale et augmentent l'agressivité, effet comportemental inversé par un traitement par l'antidépresseur sérotoninergique fluoxétine (Grimes & Melloni, 2002). En outre, le MnR semble être une cible pour les androgènes, puisque la présence de AR et ER y a été détectée, que l'infusion i.c.v. de testostérone est capable de diminuer le nombre de cellules contenant des AR après 1 jour, et qu'une infusion prolongée de 15 jours normalise les taux de AR et augmente l'expression de la protéine c-Fos (Dimeo & Wood, 2006).

3. Activité locomotrice

La composante rythmique du comportement locomoteur est contrôlée par l'horloge, puisqu'elle disparaît après lésion des SCN (Stephan & Zucker, 1972) et est restaurée après transplantation (Ralph *et al.*, 1990). Cependant, la voie de sortie impliquée dans le contrôle de ce rythme implique certains **facteurs diffusibles**, dont le rôle est démontré depuis des expériences de greffe de SCN fœtaux contenus dans une capsule poreuse : malgré l'impossibilité pour le greffon d'établir des contacts synaptiques, le rythme d'activité locomotrice est tout de même restauré (Silver *et al.*, 1996).

a) Origine de la rythmicité

Trois pistes sont explorées quant à la nature de ces facteurs diffusibles : la PK2 (prokineticin-2), le TGF α (transforming growth factor α) et la CLC (cardiotrophin-like cytokine). Ces trois protéines ont une expression et une action similaires chez la souris : toutes trois sont exprimées de façon rythmique dans les SCN avec un pic pendant le jour, et l'infusion i.c.v. de chacune d'entre elles dans le troisième ventricule induit une inhibition transitoire de l'activité locomotrice (Kramer *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002; Kraves & Weitz, 2006). **Leur pic d'expression pendant le jour serait donc à l'origine du rythme activité/repos.** Confirmant cette hypothèse, un flash de lumière est capable de déphaser le rythme d'expression de la PK2 (Cheng *et al.*, 2002), et le blocage des récepteurs à la CLC induit une augmentation de l'activité locomotrice pendant le jour (Kraves & Weitz, 2006).

Le rythme d'activité locomotrice n'est pas le seul paramètre circadien à être affecté par l'expression de ces peptides. Des souris invalidées pour le gène *PK2* présentent une réduction de la robustesse du rythme d'activité locomotrice, ainsi qu'une réduction de la rythmicité d'autres paramètres physiologiques et comportementaux, tels que le cycle veille-sommeil, la température corporelle, les taux de glucocorticoïdes et de glucose circulants (Li *et al.*, 2006). Des souris invalidées pour le gène du récepteur au TGF α présentent de la même façon une diminution du rythme d'activité locomotrice, et l'injection du peptide dans le troisième ventricule perturbe le cycle veille-sommeil des animaux (Kramer *et al.*, 2001). **Il semble**

donc que ces facteurs diffusibles jouent un rôle dans l'entretien de la robustesse des rythmes circadiens.

Plus récemment, Li *et al.* ont montré l'implication de la vasopressine dans la régulation du rythme d'activité locomotrice. Chez des souris mutantes pour le gène codant le récepteur vasopressinergique V1a, le caractère rythmique de l'activité locomotrice est réduit de 50 à 75%. L'expression des gènes horloge de ces mutants n'est pas altérée, par contre les auteurs ont mesuré une diminution de l'amplitude du pic d'expression de *PK2* (Li *et al.*, 2009). In vitro, l'application d'AVP induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *PK2*, qui passe par l'activation de récepteurs V1a (Li *et al.*, 2006). L'AVP semble donc réguler le rythme d'activité locomotrice par une activation cyclique de l'expression de la PK2.

b) Activité locomotrice et photopériode

En PL, l'activité locomotrice du hamster doré est maximale immédiatement après la transition jour-nuit (Fig. 30) et reste soutenue pendant toute la durée de la nuit. En PC, l'activité est plus fragmentée, moins intense à la transition, et sa durée s'allonge avec celle de la nuit (Hastings *et al.*, 1987; Elliott & Tamarkin, 1994; Scarbrough *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2004). La « décompression » du rythme d'activité locomotrice en PC est un phénomène qui s'observe chez d'autres espèces, telles que la souris (Refinetti, 2002) et le hamster sibérien (Puchalski & Lynch, 1991).

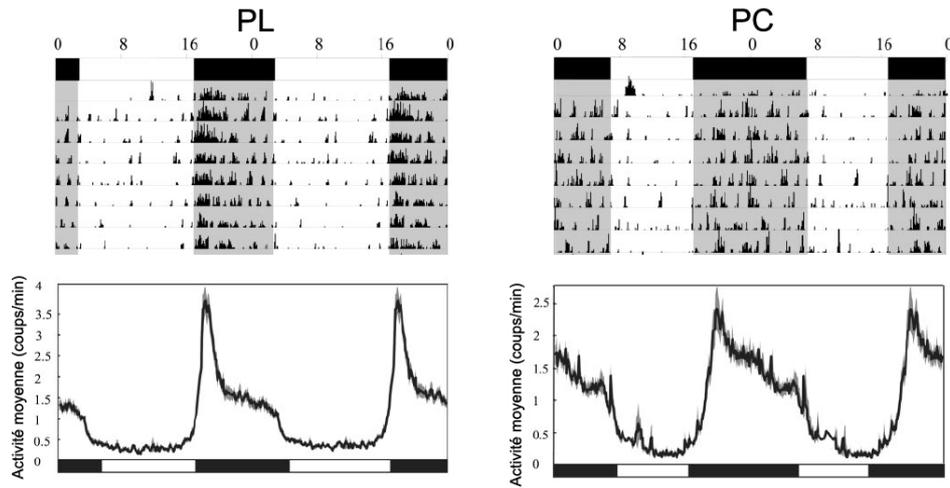


Fig. 30) Rythme nyctéméral d'activité locomotrice générale chez le hamster doré en PL 14 :10 (gauche) et PC 10 :14 (droite), représenté sous forme d'actogramme (haut) et d'activité moyenne par 24h (bas). Les barres noires symbolisent la nuit. D'après Evans *et al.* 2004.

Le caractère fragmenté et décompressé du comportement locomoteur en PC se retrouve également dans l'activité de roue chez le hamster doré : en jours courts, la fragmentation se manifeste par une diminution du nombre de périodes d'activité de roue supérieures à 60min, par une augmentation du nombre de périodes d'activité de roue inférieures à 6min et par une augmentation du nombre total de périodes d'activité de roue par jour. Ces effets s'accompagnent d'un allongement de la durée de l'activité locomotrice de roue nocturne (Morin & Cummings, 1981).

De manière intéressante, ces mêmes effets de la photopériode sur l'activité de roue ont été constatés chez des hamsters en PL ayant subi une castration chirurgicale, suggérant une implication des stéroïdes sexuels dans le contrôle photopériodique de l'organisation circadienne de l'activité locomotrice (Morin & Cummings, 1981). Leur rôle est tout de même à relativiser, puisqu'un traitement à la testostérone de hamsters en PC n'est pas capable d'inverser la diminution d'activité locomotrice induite par la PC (Ellis & Turek, 1983). Finalement, c'est probablement par une interaction entre les stéroïdes sexuels et une action directe de la photopériode au niveau des SCN que le rythme d'activité locomotrice est régulé dans le temps saisonnier.

c) **Activité locomotrice et système 5-HT**

Comme il a été fait mention précédemment (I.3.b), l'activité locomotrice a des effets synchronisateurs de type non photique sur l'horloge circadienne. Différentes études ont montré l'implication du système sérotoninergique dans ce processus.

Chez le hamster en PL, l'activité locomotrice déclenchée par la présentation d'une roue à un animal naïf pendant quelques heures induit une augmentation transitoire de la libération de 5-HT dans les SCN (Fig. 31), mesurée par microdialyse *in vivo* (Dudley *et al.*, 1998). Un autre stimulus non photique, la privation de sommeil, induit également une libération de 5-HT dans les SCN pendant le jour subjectif, ce qui est corrélé à un déphasage du rythme d'activité locomotrice de l'animal stimulé (Grossman *et al.*, 2000). En cycle lumière-obscurité, la privation de sommeil stimule toujours la libération de 5-HT mais le déphasage du rythme d'activité locomotrice est bloqué par l'effet inhibiteur de la lumière sur la stimulation non photique (Grossman *et al.*, 2000). Enfin, des propriétés non photiques ont été prêtées au triazolam. L'injection de cette benzodiazépine chez le hamster doré induit paradoxalement une hyperactivité transitoire ; or, une injection de triazolam accompagnée d'une immobilisation de l'animal pendant le temps du traitement n'est plus capable de déphaser le rythme d'activité locomotrice (Van Reeth & Turek, 1989). Il semble donc que ce soit l'hyperactivité elle-même et non la drogue qui constitue le stimulus non photique. La sérotonine agit là encore en tant que relais de ce facteur non photique puisque la lésion sélective des fibres sérotoninergiques raphé → SCN supprime complètement les déphasages de l'activité locomotrice induits par injection de triazolam (Cutrera *et al.*, 1994; Schuhler *et al.*, 1999).

L'activité locomotrice est donc capable de stimuler la libération de 5-HT, dans les SCN mais aussi dans de nombreuses autres régions du cerveau (pour revue, consulter Rueter *et al.*, 1997).

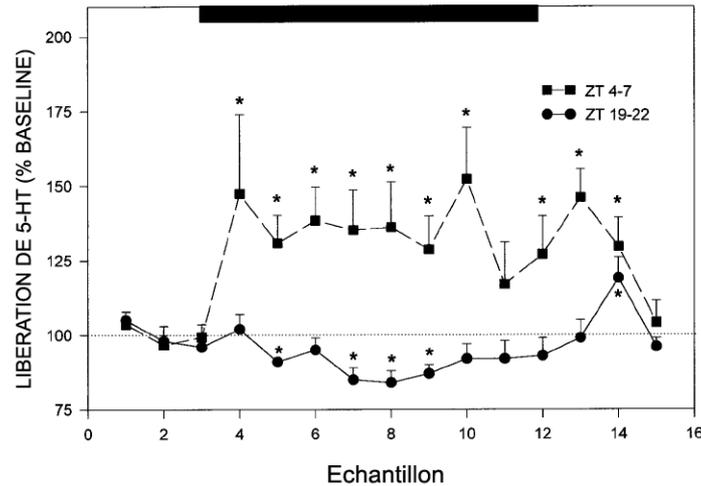


Fig. 31) Modulation de la libération de 5-HT dans les SCN induite par 3h d'activité de roue en milieu de jour (symboles carrés) et en milieu de nuit (symbole rond) chez le hamster doré en PL14 :10. La barre noire symbolise la période de confinement dans une cage à roue. D'après Dudley *et al.* 1998.

A plus long terme a été décrite chez le rat une action stimulatrice de l'activité physique de roue sur l'expression de certains paramètres du système sérotoninergique : 6 semaines d'activité de roue induisent une augmentation des taux d'ARNm du transporteur SERT et du récepteur 5-HT_{1A} dans le DR et le MnR (Greenwood *et al.*, 2005). La même activité de roue est également corrélée à une augmentation de l'amplitude du rythme journalier d'ARNm-*tph2*, et ce de manière indépendante de l'action de la corticostérone (Malek *et al.*, 2007).

Chez le hamster en PL, aucune étude à long terme n'a été menée. Il est cependant probable qu'une hyperactivité prolongée induisant une libération continue de 5-HT ait des répercussions génomiques pour compenser l'accroissement des taux extracellulaires du neurotransmetteur, *via* l'activation d'auto-récepteurs tels que 5-HT_{1A}. De plus, la diminution et la fragmentation de l'activité locomotrice en PC pourrait représenter un facteur supplémentaire de modulation de la libération de 5-HT au niveau central.

4. Axe HPA et glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol, synthétisées et libérées par la zone fasciculaire de la couche corticale des glandes surrénales. Chez l'Homme, le cortisol est le glucocorticoïde principal, chez le rat c'est la corticostérone. Le hamster doré synthétise les deux à quantité équivalente (Albers *et al.*, 1985). Les glucocorticoïdes participent à la régulation de nombreux processus métaboliques ainsi qu'à la réaction au stress, tant au niveau du système nerveux central que dans la plupart des tissus et organes périphériques. Ils ont également des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs, antiprolifératifs et cytotoxiques. Au sein du système nerveux central, ils agissent sur l'humeur et les fonctions cognitives.

Le rythme de sécrétion des glucocorticoïdes est caractérisé par un pic qui anticipe la période d'activité. Chez les rongeurs nocturnes, ce pic survient généralement avant la transition lumière-obscurité.

a) Sécrétion rythmique

La nature endogène du rythme d'activité adrénocorticale a été démontrée par le fait que le rythme persiste en condition d'obscurité constante avec une périodicité circadienne (Takahashi *et al.*, 1977; Perlow *et al.*, 1981; Fischman *et al.*, 1988) et qu'il est supprimé après lésion des SCN (Moore & Eichler, 1972). La synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes sont sous la dépendance hormonale de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (axe HPA) et sous le contrôle du système nerveux autonome.

La sécrétion des glucocorticoïdes est directement stimulée par l'adrenocorticotropique hormone (ACTH), hormone libérée par les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure (Fig. 32). La libération d'ACTH est sous la dépendance stimulatrice de la corticotrophin-releasing hormone (CRH), libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire par les cellules à CRH des noyaux parvocellulaires des PVN.

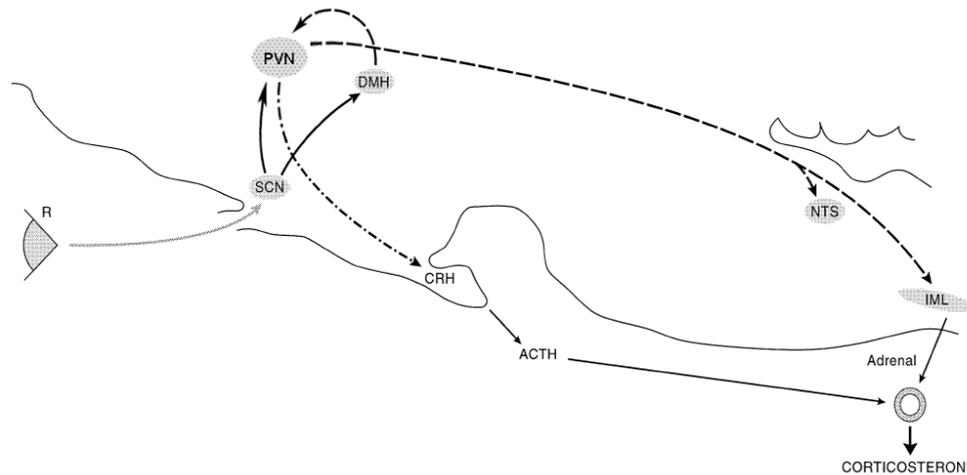


Fig. 32) Voies neuro-hormonales de contrôle circadien de la sécrétion de corticostérone chez le rat. Les SCN modulent le fonctionnement rythmique des PVN par des projections vasopressinergiques directes et indirectes *via* l'hypothalamus dorsomédian (DMH). Les PVN contrôlent la sécrétion de corticostérone par deux voies, l'une nerveuse impliquant le système sympathique (par des projections sur la colonne intermédiaire latérale IML), l'autre hormonale par sécrétion de CRH dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, qui induit la libération d'ACTH dans la circulation générale par l'hypophyse antérieure. D'après Buijs *et al.* 1999.

Au sein des PVN, le contrôle rythmique du fonctionnement de l'axe HPA implique la vasopressine, libérée de façon rythmique depuis les SCN *via* l'hypothalamus dorsomédian (DMH) (Roland & Sawchenko, 1993; Hermes *et al.*, 2000). La libération maximale d'AVP pendant le jour inhibe la sécrétion des glucocorticoïdes. Cet effet passe par l'activation de neurones GABAergiques situés dans le DMH, qui projettent eux-mêmes sur les neurones à CRH des PVN (Hermes *et al.*, 2000). Chez le rat ayant subi une lésion des SCN, la micro-infusion d'AVP dans les PVN et le DMH inhibe la libération de corticostérone pendant le jour, tandis que le blocage des récepteurs vasopressinergiques V1 la stimule (Kalsbeek *et al.*, 1992). Ces mêmes effets sont observés chez l'animal intact à différentes heures du jour (Kalsbeek *et al.*, 1996b; Kalsbeek *et al.*, 1996c). **L'AVP possède donc une action inhibitrice sur l'axe HPA *via* le DMH et les PVN, et sa libération maximale pendant le jour assure une sécrétion minimale de corticostérone.** Cependant, l'augmentation des taux de corticostérone circulants en fin de jour, quand les taux d'AVP sont encore hauts, ne peut s'expliquer que par l'action stimulatrice sur l'axe HPA d'un facteur activateur hypothétique non encore caractérisé (Kalsbeek & Buijs, 1996; 2002).

La comparaison des réponses de l'ACTH et de la corticostérone à différentes conditions expérimentales révèle que le rythme de libération de corticostérone ne dépend pas exclusivement du rythme de sécrétion d'ACTH, d'amplitude comparativement très faible (Kalsbeek *et al.*, 1996c; Buijs *et al.*, 1997). Le pic journalier de corticostérone semble dépendre d'une modulation de la sensibilité surrénalienne à l'ACTH, sous contrôle du système nerveux autonome *via* le nerf splanchnique. Une splanchnectomie des surrénales conduit à une augmentation de l'activité surrénalienne pendant le jour, supprimant son fonctionnement rythmique (Jasper & Engeland, 1994).

La voie nerveuse polysynaptique reliant les SCN aux surrénales a été décrite par traçage antérograde à l'aide d'un virus transneuronal (Buijs *et al.*, 1999). Les structures intermédiaires entre SCN et surrénales sont le DMH et la zone périventriculaire des PVN, qui projettent tous deux dans la partie dorsale des PVN (Fig. 32). Cette dernière projette à son tour sur les noyaux de la colonne intermédiolatérale, qui innerve directement les surrénales par des fibres sympathiques. La fonctionnalité de cette voie nerveuse partant des SCN a été mise en évidence par la mesure des taux de corticostérone circulants après application d'un stimulus lumineux. Présenté en début de nuit, le stimulus induit une diminution significative de corticostérone alors que les taux d'ACTH ne sont pas affectés (Buijs *et al.*, 1999). De plus, cette réponse est rapide, significative deux minutes après stimulation. Cet effet implique directement l'horloge circadienne puisque l'inhibition n'a pas lieu en fin de nuit ni pendant le jour, et que la lésion des SCN supprime l'effet inhibiteur de la lumière.

b) Récepteurs

L'action des glucocorticoïdes sur leurs cibles cellulaires passe par l'activation indépendante ou conjointe de deux types de récepteurs, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), et le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) (Lightman, 2008). GR et MR appartiennent à la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Le MR a cette particularité de pouvoir être activé par deux classes d'hormones, les minéralocorticoïdes (aldostérone et déoxycorticostérone) et les glucocorticoïdes.

Tout comme les récepteurs aux androgènes et aux estrogènes, GR et MR sont capables, après liaison avec leur ligand et dimérisation, de se fixer à l'ADN au niveau de séquences consensus et de moduler la transcription du génome en aval de ces séquences, soit par

transactivation, soit par transrépression (Roumestan *et al.*, 2004; Heitzer *et al.*, 2007; Pippal & Fuller, 2008). La séquence consensus de liaison aux GR (GRE pour glucocorticoid response element) est bien caractérisée, mais jusqu'à présent il n'a pas été décrit de séquence MRE unique, probablement parce que peu de gènes sont spécifiquement régulés par les MR, et que ces gènes sont également régulés par les GR par l'intermédiaire de GRE (Fuller & Young, 2005; Pippal & Fuller, 2008). Des effets non génomiques « rapides » des glucocorticoïdes ont également été décrits (induisant l'apparition de réponses cellulaires après 1 à 3 minutes, qui disparaissent au bout de 5 à 10 minutes), qui impliquent l'activation de voies de signalisation intra-cellulaires (Solito *et al.*, 2003; Fuller & Young, 2005). Il n'est toujours pas clairement établi si les glucocorticoïdes activent ces cascades moléculaires par l'intermédiaire des GR et MR ou par liaison à d'autres récepteurs non encore caractérisés.

Au contraire du rat, qui synthétise en majorité de la corticostérone, le hamster doré produit cortisol et corticostérone à des taux relativement équivalents. L'équipe de Sutanto (Sutanto & De Kloet, 1987; Sutanto *et al.*, 1988a; Sutanto *et al.*, 1988b) a comparé l'affinité *in vitro* du GR et du MR pour les deux glucocorticoïdes chez le rat et chez le hamster (Fig. 33). Il en ressort que chez le hamster, les deux glucocorticoïdes ont la même affinité pour le MR, mais que le cortisol a 6 fois moins d'affinité pour le GR que la corticostérone. Chez le rat, la corticostérone a 4 fois plus d'affinité pour le MR que pour le GR, et possède une affinité plus grande que le cortisol pour GR (facteur 2) et MR (facteur 5). ***In vitro*, chez les deux espèces, la corticostérone est l'hormone la plus affine pour le GR, et chez le hamster cortisol et corticostérone ont la même affinité pour le MR.**

Species	CORTISOL		CORTICOSTERONE	
	K _d	B _{max}	K _d	B _{max}
Hamster				
MR	0.9	42.3	0.9	131.9
GR	3.0	106.5	0.5	61.3
Rat				
MR	2.2	15.0	1.0	43.5
GR	20.1	19.6	3.9	260.3

Fig. 33) Comparaison de l'affinité de la corticostérone et du cortisol pour leurs récepteurs GR et MR, mesurée dans l'hippocampe chez le hamster et le rat. Le K_d est la constante de dissociation, plus sa valeur est forte moins l'hormone est affine pour le récepteur. B_{max} est la capacité de liaison maximale, elle est un reflet de la densité des récepteurs. D'après Sutanto & De Kloet 1987.

De façon remarquable, la mesure *in vivo* de l'occupation du récepteur MR chez des animaux surrénalectomisés montre que chez le hamster la dose de corticostérone nécessaire à l'occupation de 80% des sites MR est 1000 fois plus importante que celle de cortisol. Le rapport inverse est observé chez le rat. Ces différences entre les études *in vitro* et *in vivo* s'expliquent probablement par la présence en condition *in vivo* de facteurs régulant le rapport entre les deux glucocorticoïdes, tels que la liaison à la protéine de transport des glucocorticoïdes (CBG), la dégradation de l'une ou l'autre des hormones par des enzymes spécifiques, la pénétration des hormones à l'intérieur des cellules cibles... Quoi qu'il en soit, **en condition *in vivo* le MR se lie préférentiellement au cortisol chez le hamster et à la corticostérone chez le rat.** Par contre, le GR ne présente pas de préférence marquée entre la liaison au cortisol ou à la corticostérone chez le hamster. Chez le rat, il faut une dose de cortisol 15 à 30 fois supérieure à celle de corticostérone pour occuper 50% des sites GR, ce qui reflète la faible affinité du cortisol pour le GR mesurée *in vitro*.

Chez le rat, la présence de GR a été mise en évidence par hybridation *in situ* et immunohistochimie dans les neurones des noyaux du raphé (Aronsson *et al.*, 1988; Ahima & Harlan, 1990; Morimoto *et al.*, 1996). Les GR sont fortement exprimés dans les cellules à 5-HT de tous les noyaux du raphé (Harfstrand *et al.*, 1986) et sont exprimés dans les neurones sérotoninergiques contenant la protéine TPH dans le DR et le MnR (Malek 2007). Le MR, quant à lui, n'est pas exprimé dans le raphé (Ahima *et al.*, 1991). Chez le hamster doré, la distribution des GR et MR dans l'encéphale n'a jamais été décrite.

c) Glucocorticoïdes et système 5-HT

Au niveau central, le rôle des glucocorticoïdes a été intensivement étudié chez le rat dans le cadre de la réponse au stress (de Kloet, 2000). Les protocoles de stress chronique tels que la défaite sociale ou la subordination au sein d'un groupe suractivent l'axe HPA et perturbent le rythme de sécrétion des glucocorticoïdes (Lightman, 2008). Parallèlement, stress chronique et glucocorticoïdes modifient les fonctions qui sont associées au système sérotoninergique : altération de rythmes biologiques tels que l'activité locomotrice, la température corporelle, le rythme veille-sommeil (Harper *et al.*, 1996; Meerlo *et al.*, 1996; Meerlo *et al.*, 2002), changements dans le comportement de prise alimentaire (Foster *et al.*, 2006), développement

de comportements symptomatiques d'anxiété ou de dépression (Rodgers & Cole, 1993; Berton *et al.*, 1998; Keeney *et al.*, 2006).

L'effet des corticoïdes sur le système 5-HT a beaucoup été étudié dans l'hippocampe, région riche en GR et MR et innervée par le DR/MnR. Dans cette structure, une surrénalectomie induit une diminution du turnover de la 5-HT, effet compensé par administration exogène de corticostérone (De Kloet *et al.*, 1982; Korte-Bouws *et al.*, 1996). Cet effet pourrait passer par une action de l'hormone sur les récepteurs 5-HT_{1A} exprimés sur les terminaisons des fibres sérotoninergiques, et dont la stimulation induit une inhibition du taux de décharge et une diminution de la libération de 5-HT (Meltzer & Sumiyoshi, 2008). Stress et corticostérone diminuent la densité de ces autorécepteurs dans plusieurs régions de l'hippocampe (McKittrick *et al.*, 1995; Berton *et al.*, 1998; Meijer *et al.*, 1998), mais également dans le raphé dorsal (De Kloet *et al.*, 1986). La corticostérone semble induire une désensibilisation ou une internalisation de ces récepteurs car leur niveau d'expression dans le DR n'est pas affecté par le traitement aux glucocorticoïdes (Laaris *et al.*, 1995; Fairchild *et al.*, 2003). Corrélié à cet effet, la corticostérone induit dans le DR une diminution de l'effet inhibiteur des agonistes 5-HT_{1A} sur l'activité électrique des neurones 5-HT (Laaris *et al.*, 1995; Fairchild *et al.*, 2003). **La corticostérone a donc un effet facilitateur de la libération de 5-HT** par une diminution de la sensibilité des neurones sérotoninergiques au rétrocontrôle négatif exercé par la 5-HT sur les autorécepteurs 5-HT_{1A}.

D'autres études ont montré que la corticostérone était capable de moduler l'expression de tryptophane hydroxylase au sein du DR et du MnR. Chez la souris, un traitement chronique par la dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) induit une diminution des taux d'ARNm-*tph2* (Clark *et al.*, 2005) et de protéine TPH2 (Clark *et al.*, 2008). Chez le rat, l'effet de la dexaméthasone semble plus complexe : un traitement chronique induit d'une part une augmentation de la protéine TPH (Azmitia *et al.*, 1993) et d'autre part une diminution des taux d'ARNm-*tph* (Clark & Russo, 1997).

S'appuyant sur l'action avérée des glucocorticoïdes sur le système sérotoninergique, Malek *et al.* ont cherché à caractériser l'influence du rythme de sécrétion de corticostérone sur l'expression rythmique de *tph2*. Chez des rats surrénalectomisés et supplémentés avec un taux diurne constant de corticostérone, le rythme d'expression de *tph2* est aboli (Fig. 34). La restauration d'un rythme artificiel de corticostérone par addition de l'hormone dans l'eau de

boisson pendant la nuit est capable de rétablir les variations journalières des taux d'ARNm-*tph2* (Malek *et al.*, 2007). **Le rythme de corticostérone est donc nécessaire à l'établissement des variations rythmiques de *tph2* chez le rat.** Cependant, il se peut que d'autres paramètres concourent à l'établissement de la rythmicité, comme l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes. Dans l'hippocampe, les taux d'ARNm des GR et des MR présentent des variations journalières ; si les variations d'ARNm-MR semblent contrôlées par les taux circulants de corticostérone, les variations d'ARNm-GR sont encore présentes dans certaines régions de l'hippocampe après surrénalectomie (Herman, 1993; Herman *et al.*, 1993).

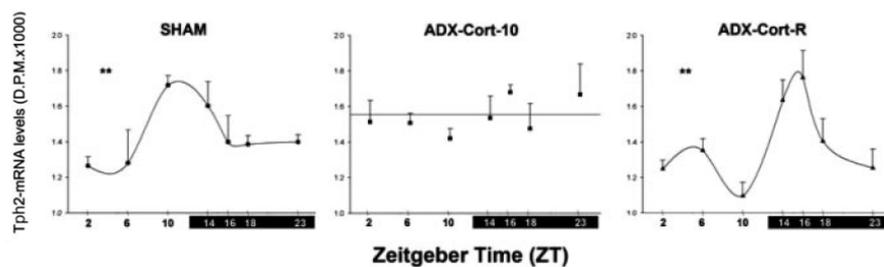


Fig. 34) La suppression du rythme de corticostérone abolit les variations journalières d'ARNm-*tph2* chez le rat. La figure de gauche montre le profil journalier d'expression de *tph2* mesuré chez des animaux contrôles dans le raphé médian. Après suppression du rythme de corticostérone, les variations d'ARNm-*tph2* ne sont plus significatives (figure du milieu). La restauration d'un rythme artificiel de corticostérone rétablit les variations journalières d'ARNm-*tph2* (figure de droite). Les barres noires horizontales symbolisent la nuit. D'après Malek *et al.* 2007.

Chez le hamster doré en PL, stress et glucocorticoïdes jouent également un rôle dans le contrôle du système sérotoninergique du DR. Suite à un protocole de stress aigu (défaite sociale, 5min), les hamsters défaits présentent dans le DR une augmentation de l'expression de c-Fos à l'intérieur de cellules sérotoninergiques et non sérotoninergiques (Kollack-Walker *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2009), ainsi qu'une diminution des taux d'ARNm-*5-HT_{1A}* dans le DR (Cooper *et al.*, 2009).

c) Glucocorticoïdes et photopériode

Chez le hamster doré, le rythme de sécrétion des glucocorticoïdes est modifié par la photopériode. En PL 14:10, les rythmes de cortisol et de corticostérone ont leur acrophase au même moment de la journée, à la transition lumière-obscurité (Fig. 35). Pendant le jour, les taux minimum de corticostérone sont supérieurs à ceux de cortisol ; la tendance s'inverse lorsque les taux maximum sont atteints en début de nuit (Albers *et al.*, 1985). La valeur du pic est de 8 à 10 fois supérieure aux niveaux minimum pour le cortisol, de 2 à 4 fois pour la corticostérone (Albers *et al.*, 1985; Ottenweller *et al.*, 1987).

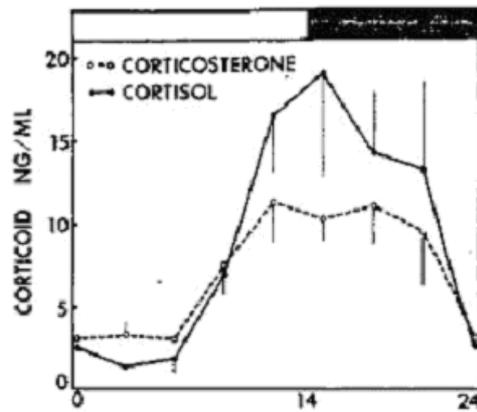


Fig. 35) Variations journalières des taux circulants de corticostérone (trait pointillé) et de cortisol (trait plein) chez le hamster doré en PL 10:14. La barre noire symbolise la nuit. D'après Albers et al. 1985.

En PC 10:14, le rythme de corticostérone est complètement aboli (Fig. 36). Si le rythme de cortisol persiste, l'amplitude du pic est sévèrement diminuée par rapport à la PL (de Souza & Meier, 1987; Ottenweller *et al.*, 1987).

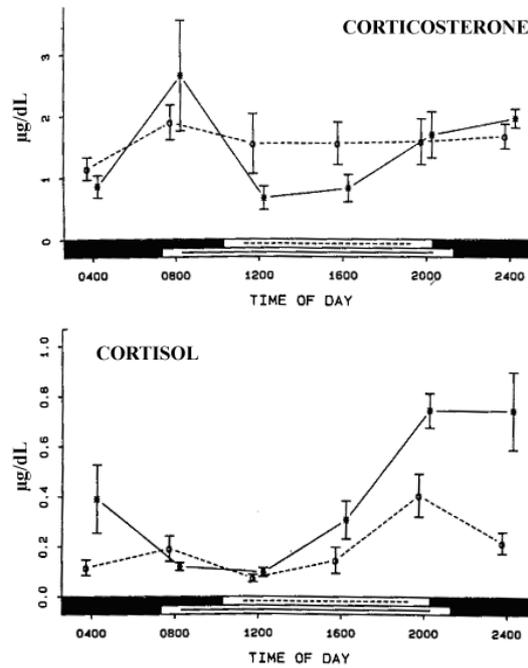


Fig. 36) Variations journalières des taux circulants de corticostérone et de cortisol chez le hamster doré en PL 10:14 (trait plein) et PC 10 :14 (trait pointillé). D'après Ottenweller et al. 1987.

Parallèlement, 8 semaines de PC induisent une augmentation des MR dans l'hippocampe et l'hypothalamus de hamsters dorés, mesurée par le taux de liaison d'hormones marquées par un isotope radioactif (Ronchi *et al.*, 1998). Cet effet n'est pas dû à la chute des taux de stéroïdes sexuels puisque des hamsters PC supplémentés en testostérone présentent encore cette hausse (Ronchi *et al.*, 1998). De plus, les taux d'ARNm-MR augmentent dès 18 jours d'exposition à la PC dans l'hippocampe, avant même que les premiers signes physiologiques de l'intégration de la photopériode (masse des gonades, comportement locomoteur) n'apparaissent (Lance *et al.*, 1998). La réponse au stress est également rapidement modifiée en PC : dès 4 semaines d'exposition, bien avant que l'axe HPG ne soit complètement inhibé (Turek *et al.*, 1975; Steger *et al.*, 1982; Negri-Cesi *et al.*, 1987) les hamsters en PC répondent différemment de ceux en PL à un stress à l'éther exercé en début de jour. Dans les deux groupes, les taux de glucocorticoïdes augmentent significativement dix minutes après le stress. Cependant, après 1h les taux de glucocorticoïdes sont encore élevés en PL mais revenus à la normale en PC (Ronchi *et al.*, 1998). **La photopériode courte induit donc des changements rapides de l'expression relative de MR et GR**, qui concourent probablement à une modification de la réponse au stress. Il semble que l'affaîssement des rythmes de

glucocorticoïdes ne s'établisse qu'en second lieu, car après 4 semaines les taux de cortisol et de corticostérone des hamsters en PC sont équivalents à ceux des animaux en PL (Ronchi *et al.*, 1998).

Objectifs de la thèse

Mélatonine, testostérone, glucocorticoïdes et activité locomotrice sont des paramètres physiologiques et comportementaux qui, chez le hamster doré, varient avec la photopériode. Chez de nombreuses espèces, ces paramètres ont une influence sur le fonctionnement de divers systèmes, dont le système sérotoninergique, *via* une modulation de la synthèse et de la libération de 5-HT.

Au niveau des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR, la synthèse (chez le rat) et la libération (chez rat et hamster doré PL) de 5-HT sont rythmiques. Ces rythmes sont nécessaires à une synchronisation harmonieuse de l'horloge circadienne des mammifères. Toutefois, bien que l'horloge circadienne s'adapte à la photopériode, son influence sur la synthèse et la libération de 5-HT n'a jamais été étudiée en photopériode courte.

La photopériode a-t-elle une influence sur le fonctionnement journalier des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR ?

Pour intégrer les versants nyctéméral et photopériodique d'une telle question, le hamster doré est un modèle de choix. Cependant, peu de données étant disponibles dans la littérature sur ce sujet, il nous a fallu étudier le système sérotoninergique du DR et du MnR à la fois sur le plan morphologique et sur le plan fonctionnel.

Nous avons d'abord analysé la **distribution anatomique des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR** le long de leur extension caudo-rostrale, en PL (14:10) et en PC (10:14). DR et MnR sont des noyaux volumineux à l'intérieur desquels les neurones 5-HT se trouvent regroupés en différentes régions et sous-régions. La délimitation rigoureuse de ces régions, le long de l'axe caudo-rostral et au sein d'un plan sagittal donné, a servi de base anatomique à l'étude de plusieurs paramètres du fonctionnement des neurones 5-HT.

Les **niveaux d'expression de la TPH** ont été étudiés en PL et en PC en tant que paramètre reflet de la synthèse de 5-HT. Les concentrations d'ARNm- *tph2* ont été quantifiées en différents points du nyctémère et dans les deux photopériodes. Les concentrations de la protéine TPH ont été quantifiées de la même façon dans les deux photopériodes pour établir un lien entre ARNm et protéine.

Pour compléter cette étude, les **variations journalières du métabolisme de la 5-HT** ont été évaluées dans les deux photopériodes par le rapport entre les taux de 5-HT et ceux de son métabolite le 5-HIAA.

Après avoir démontré que les différents paramètres étudiés présentaient des variations journalières en PL, mais que ces variations étaient abolies en PC, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

Comment les messages journalier et photopériodique sont-ils délivrés aux noyaux du raphé ?

Sans évidence de l'existence d'une voie nerveuse directe SCN → raphé, et au vu des travaux de Malek et al. (2007) sur l'importance du rythme de glucocorticoïdes pour l'établissement des variations journalières de l'expression de *tph2*, nous avons favorisé l'hypothèse hormonale pour répondre à cette question.

L'étude du rôle de la mélatonine semblait s'imposer : cette hormone a une composante circadienne, elle délivre le message photopériodique à une partie de l'organisme, elle est capable de moduler le fonctionnement du système 5-HT. Cependant, nous n'avons pas privilégié cette piste pour une raison simple : la présence de récepteurs à la mélatonine n'a jamais été décrite dans le DR ou le MnR chez aucune espèce de mammifère.

Au contraire, **DR et MnR expriment des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux stéroïdes sexuels chez différentes espèces de mammifères**. Une action directe de ces hormones au sein de ces noyaux du raphé est donc possible chez le hamster doré. De plus, outre leurs effets modulateurs du fonctionnement des neurones 5-HT déjà décrits dans la littérature, glucocorticoïdes et testostérone présentent une particularité intéressante vis-à-vis de la problématique : le caractère rythmique de leur sécrétion en PL, et l'abolition de ce rythme en PC. Nous avons donc cherché à établir si ces hormones jouaient un **rôle dans l'établissement des variations journalières et saisonnières de l'expression de *tph2* en PL**.

Les **variations journalières d'ARNm-*tph2*** ont été quantifiées dans différentes conditions expérimentales visant à établir un statut hormonal comparable à celui mesuré en PC. Pour les **stéroïdes sexuels**, la source de production principale de testostérone a été supprimée par castration. Pour les **glucocorticoïdes**, le rythme circadien a été aboli par surrénalectomie et implantation de capsules délivrant des taux diurnes constants de cortisol et de corticostérone. Chez un groupe supplémentaire de hamsters surrénalectomisés et implantés, cortisol et corticostérone ont été ajoutés à l'eau de boisson pendant la nuit pour restaurer un rythme artificiel de glucocorticoïdes.

Résultats

Chapitre I

**Influence de la photopériode sur la synthèse journalière de
sérotonine dans le raphé dorsal et médian du hamster doré**

Au sein du système circadien du hamster doré, les neurones sérotoninergiques du DR/MnR libèrent la 5-HT de façon rythmique dans les SCN et les IGL en photopériode longue 14:10 (Dudley *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2004). Le caractère rythmique de la libération de 5-HT sous-tend le rôle nyctéméral du neurotransmetteur dans la régulation de la synchronisation photique et non photique de l'horloge.

Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si la rythmicité de la libération de 5-HT en PL était un processus régulé non seulement au niveau local, dans des terminaisons sérotoninergiques de structures particulières, mais aussi en amont au niveau des corps cellulaires des neurones 5-HT du DR/MnR, pour une distribution plus large du message nyctéméral. Pour cela nous avons étudié sur 24h le métabolisme de la 5-HT dans les SCN et le DR/MnR, ainsi que l'expression de la TPH et l'ARNm-*tph2* dans le DR/MnR.

Parallèlement, à partir du constat que la synchronisation de l'horloge est profondément modifiée en photopériode courte 10:14 (Pittendrigh *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 2004), nous avons abordé la question de l'influence de la photopériode sur la rythmicité du fonctionnement des neurones 5-HT en PC avec une méthodologie similaire à celle employée pour les hamsters en PL.

Complex regional influence of photoperiod on the nycthemeral functioning of the dorsal and median raphé serotonergic system in the Syrian hamster

Laurent NEXON, Vincent-Joseph POIREL, Daniel Clesse, Paul PÉVET,
and Sylvie RAISON

Accepted in the European Journal of Neuroscience

Abstract

The Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) is a widely used species for the study of biological clock synchronization and photoperiodism. The serotonergic system arising from the median (MnR) and the dorsal raphé (DR) is a major actor in circadian clock synchronization. This serotonergic system is also associated with functions and behaviors influenced by seasonal changes. The aim of the present study was to assess the influence of photoperiod on the daily functioning of the MnR and DR serotonergic system. The morphology of both raphé nuclei was analyzed in hamsters kept in long and short photoperiod by immunocytochemical detection of two markers of the serotonergic system, serotonin and tryptophan hydroxylase (TPH, rate-limiting enzyme of serotonin synthesis). The morphological analysis revealed a fairly complex morphological organization of the DR and MnR along their caudo-rostral extent. This morphological organization was similar in both photoperiods. However, the quantification of several markers of serotonin (5-HT) synthesis in the DR and MnR revealed a time-dependent functioning of serotonergic cells which was locally influenced by photoperiod. In particular, the significant daily variations of *tph2*-mRNA and TPH levels in the rostral MnR, and of the 5-HT/5-HIAA ratio within the SCN, were abolished in short photoperiod. The results are discussed in regard to the known physiological role of the serotonergic system on the biological clock.

Introduction

The Syrian hamster is a model to study the influence of photoperiod on physiological systems and behaviors. Photoperiod is defined as the length of the light period during 24 h, a parameter used by mammals to situate themselves in seasonal time. In short photoperiod (SP), the hamster's sexual activity is inhibited (Reiter, 1972; Bartke et al., 1982), the circadian organization of its general locomotor activity is strongly modified (Scarborough et al., 1997; Evans et al., 2004) and rhythmic production of hormones such as glucocorticoids and testosterone is abolished or flattened (Ottenweller et al., 1987).

All these photoperiod-dependent parameters are able to regulate different structures of the central nervous system, including the serotonergic system of the dorsal (DR) and median (MnR) raphe nuclei (Dudley et al., 1998; Dimeo & Wood, 2006; Cooper et al., 2009). However, the influence of these physiological factors on serotonergic system functioning have not been investigated in SP.

In biological rhythms studies, serotonin (5-HT) is of major importance as a key component of circadian clock synchronization (Morin, 1999), through its modulatory action on light-induced resetting and its role as a relay of non-photic synchronizing information (Challet & Pevet, 2003). Localized in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus, the circadian clock receives direct serotonergic innervation from the MnR, and indirect input from the DR (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander et al., 1998; Tischler & Morin, 2003).

In the rat, serotonergic neurons function in a rhythmic fashion, the origins of which implicate the rate-limiting enzyme of 5-HT synthesis, tryptophan hydroxylase (TPH). In the DR and MnR, the expression of the *tph2* gene, the predominant isoform in raphe nuclei, is rhythmic and circadian (Malek et al., 2005). This rhythm is correlated with circadian variations in TPH protein, both in the DR/MnR (Malek et al., 2004) and in the SCN nerve endings (Barassin et al., 2002). Within the SCN, this rhythmicity is observed in both 5-HT content (Cuesta et al., 2009) and release (Barassin et al., 2002).

In the Syrian hamster, the most commonly used mammalian species in behavioral studies of SCN circadian phase-shifting (Rosenwasser & Dwyer, 2001), 5-HT release within the SCN is

circadian in LP (Dudley et al., 1998), but daily expression of TPH has never been investigated. Moreover, no data is available in SP concerning 5-HT synthesis or its metabolism in the SCN. We thus addressed the general question of the influence of photoperiod on the daily functioning of the serotonergic system.

The design of our study was focused on the DR and MnR serotonergic system, for its anatomical and functional connections with the clock. In the rat, DR and MnR are complex nuclei known to exhibit important regional anatomical differences (Tork, 1990; Jacobs & Azmitia, 1992), which underlie functional regionalization (Staub et al., 2005; Staub et al., 2006). In the present work on the Syrian hamster, we aimed firstly to analyze the tissue and cellular organization, as seen by 5-HT and TPH immunohistochemistry, of both raphé nuclei across their entire caudo-rostral extent. Based on the anatomical findings, we assessed the functional influence of photoperiod by quantifying the daily expression levels of tph2-mRNA and TPH protein within the different regions of the DR and MnR, as well as 5-HIAA and 5-HT content within the SCN.

Materials and Methods

Animals

A hundred and forty male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*, inbred colony) were housed in groups of 4 to 5 in transparent plastic cages under a 14 h-light, 10 h-dark cycle (long photoperiod LP) with constant dim red light (<2 lux) and food and water ad libitum. At the age of 2-3 months, half of the animals were transferred in a room with a 10 h-light, 14 h-dark cycle (short photoperiod SP), the other half remaining in LP. Referential zeitgeber time ZT12 was defined as the beginning of the dark period. Nine weeks later, at the time of sacrifice, hamsters were four to five months old and weighed between 120 and 150 g. Regression of testes and seminal vesicles was measured as an index of SP integration. All experiments were performed in accordance with National Institutes of Health Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, with the European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/6.9/EEC) and French Laws.

5-HT and TPH immunostaining

From each photoperiodic group, 2 hamsters were sacrificed at ZT7 and ZT13 as follows: after deep isoflurane anaesthesia, the animals were transcardially perfused with phosphate buffered saline 0.1 M (PBS) and paraformaldehyde 4% in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4). Brains were removed, post-fixed 24 h at 4°C, rinsed with PBS, cryoprotected in a 30% sucrose-PBS solution, frozen in cold isopentane and stored at -80°C. Twenty micrometers thick serial coronal sections across the caudo-rostral extent of DR and MnR (-6.9 mm to -4.9 mm bregma, Morin and Wood, 2001) were obtained using a Leica CM3050S cryostat, collected in PBS containing 0.01% sodium azide and stored at 4°C. For each brain, adjacent sections were immunolabeled in alternation for both TPH and 5-HT in order to obtain a complete map of the hamster DR and MnR serotonergic system.

Sections immunolabeled for TPH were first blocked for 1 h in a saturating solution containing 1% bovine serum albumine (BSA), 3% goat serum (GS) and 0.5% Triton X100 in PBS. Primary antibody (TPH sheep antiserum; Chemicon, CA, USA) was diluted 1/1000 and sections were incubated during 24h at 4°C. Then they were washed 30 min in PBS, incubated 2 h in the blocking solution with 1/2000 diluted donkey anti-sheep biotinylated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA), washed 30 min in PBS and incubated 1 h in ABC reagents (Vector Laboratories). Sections were rinsed in PBS, incubated

20 min in a 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution, and the antigen-antibody complex was visualized adding 0.003% H₂O₂.

Sections immunolabeled for 5-HT were blocked overnight in a saturating PBS solution containing 0.2% BSA, 0.1% Tween-20 and 10% GS. They were then incubated 48 h at 4°C in 1/30,000-diluted primary antibody (5-HT rabbit antiserum; Oncogene, USA), washed 6 h in PBS containing 0.01% Tween-20, blocked 1 h in the saturating solution, incubated overnight at 4°C in a 1/2000-diluted donkey anti-rabbit biotinylated secondary antibody solution (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) and washed 6 h in PBS containing 0.01% Tween-20. The antigen-antibody complex was then revealed using ABC reagents and DAB as described for TPH immunostaining.

Negative control sections were incubated without the 5-HT and TPH antisera and showed no evidence of significant reaction product. The specificity of the TPH antibody was further confirmed by western-blotting raphé and extra-raphé structures from rat and hamster brains. A single TPH band of approximately 54 kDa was detected for both species in the raphé nuclei extracts but not in the non-serotonin-containing structures.

Hamster tph2 cloning

Total RNA were extracted from the DR region of *Mesocricetus auratus* according to the protocol of Chomczynski and Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) and reverse transcribed. Primers designed to frame a region specific of the rat *tph2* gene (oligonucleotides 5'-TCGCAGAGCTGGCTATGAACTACA-3' and 5'-TCGGCAAGCATGAGTGGGGTAGA-3'; GenBank accession number AY098915) were used to PCR-amplify a predicted 450 bp region of the hamster *tph2* gene. The amplified products of the predicted size were purified and ligated into the pCR-Script Amp SK(+) cloning vector (Stratagene). Identity of the clones was confirmed by sequencing (AGOWA sequencing services, Germany) and the obtained sequence deposited in GenBank (Malek et al., 2003, accession number AY345967).

Tph2-mRNA in situ hybridization

Five hamsters of each group were killed by decapitation at each of the following time points: ZT7, ZT11, ZT13, ZT17, ZT21, ZT23. Brains were rapidly removed, frozen in cold isopentane, stored at -80°C and cut in serial 20 µm thick coronal sections across the DR and MnR caudo-rostral extent (-6.9 mm to -4.9 mm bregma; Morin and Wood, 2001) with a Leica CM3000 cryostat. Sections were collected on SuperFrost Plus slides (VWR) and stored at -20°C. In situ hybridization (ISH) was performed as previously described (Malek et al., 2005).

Sections were fixed 10 min in 4% paraformaldehyde, rinsed in PBS, acetylated twice for 10 min (0.5% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine), rinsed, dehydrated and air dried. Antisense riboprobes for *tph2*-mRNA were transcribed from linearized plasmids using T7 polymerase (MAXI script; Ambion, Austin, TX) in the presence of [³⁵S]UTP (462.5 kBq/μL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The labeled probes were denatured (5 min at 95°C, 2 min in ice) and diluted (400 pM) in a 54°C hybridization buffer containing 50% deionized formamide, 2X sodium saline citrate (SSC), 1X Denhardt's solution, 0.25 mg/mL yeast tRNA, 1 mg/mL salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate, and 10 mM dithiothreitol. A hundred microliters of the probe-containing hybridization solution were applied to each slide, and the sections were covered with siliconed coverslips. The slides were incubated overnight at 54°C. Once the hybridization complete, sections were treated with 0.2 μg/mL ribonuclease A (Sigma) for 30 min at 37°C. After several stringency washes in 0.5 X (53°C) and 0.2 X SSC (62°C), sections were dehydrated through a series of graded alcohol rinses containing 300 mM ammonium acetate, and air dried. Processed slides together with ¹⁴C-plastic standards were exposed to autoradiographic films (Kodak BioMax; Kodak, Rochester, NY), later developed and scanned at a 1200 dpi resolution for further quantitative analysis. Some slides were dipped in nuclear emulsion (Hypercoat Emulsions, Amersham) and exposed for 3 weeks at 4°C. They were then developed using Kodak BioMax reagents.

TPH western-blotting

Five hamsters of each group were killed by decapitation at each of the following time points: ZT1, ZT5, ZT9, ZT13, ZT17, ZT21. Brains were rapidly removed, frozen in cold isopentane, stored at -80°C. The DR and MnR of each hamster were punched out of 300μm-thick coronal sections with a 1.2 mm diameter needle. Both the DR and MnR were separated in two antero-posterior (A-P) regions, extending from -6.3 to -5.7 mm bregma for the caudal DR, from -5.7 to -5.1 mm bregma for the rostral DR, from -6 to -5.4 mm bregma for the caudal MnR and from -5.4 to -5.1 mm bregma for the rostral MnR. Each tissue sample was sonicated during 15 sec. in cold lysis buffer consisting of 20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA pH 8, 0.2% SDS, 1 mM DTT, protease inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitor (Sigma). After centrifugation (13000rpm, 4°C, 20 min), 10 μg of total proteins for each sample were heated after the addition of Laemmli buffer (Bio-Rad)/10% β-mercaptoethanol, subjected to 10% SDS-PAGE containing 4% stacking gel and transferred onto PVDF membrane. Membranes were dehydrated, blocked for 1 h at room temperature in 5% milk TBS then probed overnight at 4°C with the primary antibody (TPH sheep antiserum;

Chemicon, CA, USA) diluted 1:1000 in the blocking buffer. Membranes were then rinsed in TBS, incubated 1 h at room temperature in peroxidase-conjugated Donkey anti-sheep antibody (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) diluted 1:100,000 in blocking buffer. After washing, membranes were incubated with Immobilon Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, MA, USA) and exposed to autoradiography film.

5-HT and 5-HIAA content in the SCN

For each hamster of the western-blotting experiment, the SCN region was punched out of two 300 μ m-thick brain slices (-0.9 to -0.3 mm bregma; Morin and Wood, 2001) and stored at -80°C. Each tissue sample was homogenized by ultrasonication in 0.4 M HClO₄, 0.4 mM sodium metabisulfite and 1 mM EDTA. After centrifugation, supernatants were kept at 4°C in an autosampler (Triathlon, Spark, Emmen, Netherlands) and analyzed for 5-HT and 5-HIAA with an amperometric electrochemical detection HPLC system (HPLC-ED; Decade Antec, Leyden, Netherlands). The electrochemical flow cell VT-03 was an Ag/AgCl (filled with saturated KCl) versus glassy carbon electrode configuration equipped with a 50 μ m spacer. The working potential was set at 0.6 V. Each sample was injected inside a 750 mm length 4.6 mm internal diameter C18 column (Ultrasphere ODS 3 μ 80A, Beckman, Fullerton, CA, USA) equipped with a guard column. Both the detection cell and the column were maintained at 35°C. The mobile phase was composed of 4% methanol (V/V), 40 mM citric acid, 40 mM Na₂HPO₄ and 1 mM EDTA, and the flow rate was maintained constant at 0.8 mL/min by a high pressure pump (LC-10AD, Shimadzu, Kyoto, Japan). Chromatograms were analyzed on the Azur v4.5 acquisition software (Datalys, St Martin d'Hères, France). 5-HT and 5-HIAA levels were normalized to the total amount of proteins and expressed in fmol/ μ g.

Data analysis and statistics

Immunolabeled sections were microphotographed on a Leica DMRB microscope with an Olympus DP50 digital camera and digital imaging software (Viewfinder Lite version 1.0.135; Pixera corporation). Using a digital image-processing software (Photoshop CS2 9.0, Adobe Systems Incorporated), the size and luminosity/contrast of the images were adjusted for better ease of viewing. Maximal perikarya diameters were measured on representative DR and MnR sections in each hamster of both photoperiods using an image analysis software (ImageJ 1.37v; National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov>).

For ISH, quantitative analysis of the autoradiograms was performed using ImageJ. Non-specific binding (NSB) mean gray value was randomly quantified all over the sections. NSB

signal being both homogenous and negligible compared to the specific binding signal (NSB values representing 4 to 8% of the lowest specific binding values), each scanned film was thresholded at the level of maximal NSB value before quantification. The standardization was completed thanks to ^{14}C -plastic standards, so as to obtain the same linear relationship between ^{14}C -radioactivity and mean gray values for each thresholded radiographic film. Thanks to the fine anatomical resolution obtained after the hybridization technique, caudo-rostral regions were identified in both the MnR and the DR, as well as the different subregions of the DR. Representative sections were selected as references to help establish a standard anatomical level correspondence between each section series of each brain. After nuclear emulsion, *tph2*-mRNA-positive cells were visually counted in three hamsters per time point (ZT13 and ZT23) in both photoperiods. Four sections per animal were considered for the MnR, two for the middle DR (DRm) and three for the rostral DR (DRr). Differences between ZT and photoperiods were assessed by two-way ANOVA. The delimitation of the DRr subdivisions (Fig. 1) was realized with respect to the position of serotonergic cells and comparison with known DR subdivisions from other species, as the rat (Barassin *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2006) and the rabbit (Bjarkam *et al.*, 1997). The main subdivisions include a dorsal one, two lateral and a ventro-median.

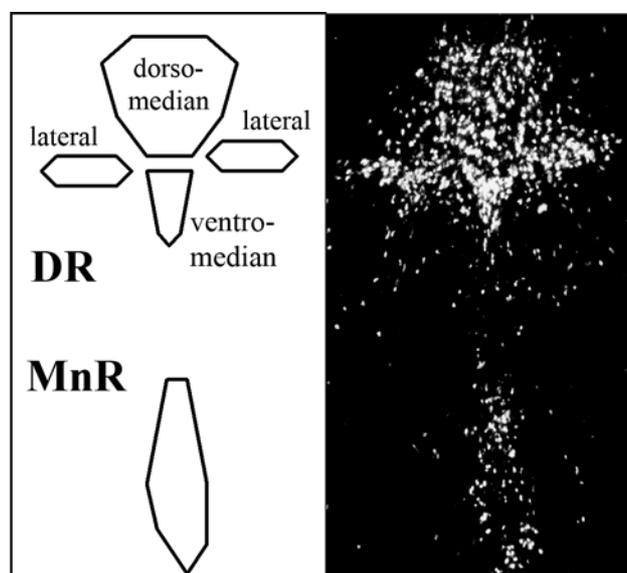


Fig. 1. Schematic representation of the dorsal (DR) and median raphé (MnR) nuclei (left panel), showing the main DR subdivisions. This schematic delineation was drawn with respect to the position of serotonergic cells as illustrated on the right panel, which shows 5-HT-producing cells after *tph2*-mRNA *in situ* hybridization and nuclear emulsion on a section taken at -5.4 mm bregma.

For western-blot, TPH bands were quantified with ImageJ and normalized to β -actin levels, which was detected on the same membranes after stripping. Three samples of low, intermediate and high intensity were repeated on each blot of a given DR/MnR region and used as an inter-assay normalizing scale.

Regional daily profiles of *tph2*-mRNA, TPH and 5-HT/5-HIAA levels were analyzed by either a one-way analysis of variance (ANOVA I, ZT) or a two-way ANOVA (ZT-anatomical level). Comparison of daily profiles of *tph2*-mRNA, TPH and 5-HT/5-HIAA were assessed by ANOVA II (ZT-nucleus or ZT-photoperiod) with a Newman-Keuls post-hoc test. Regional differences between LP and SP were assessed by an independent two-tailed Student's t-test. Differences were considered at $P < 0.05$.

Results

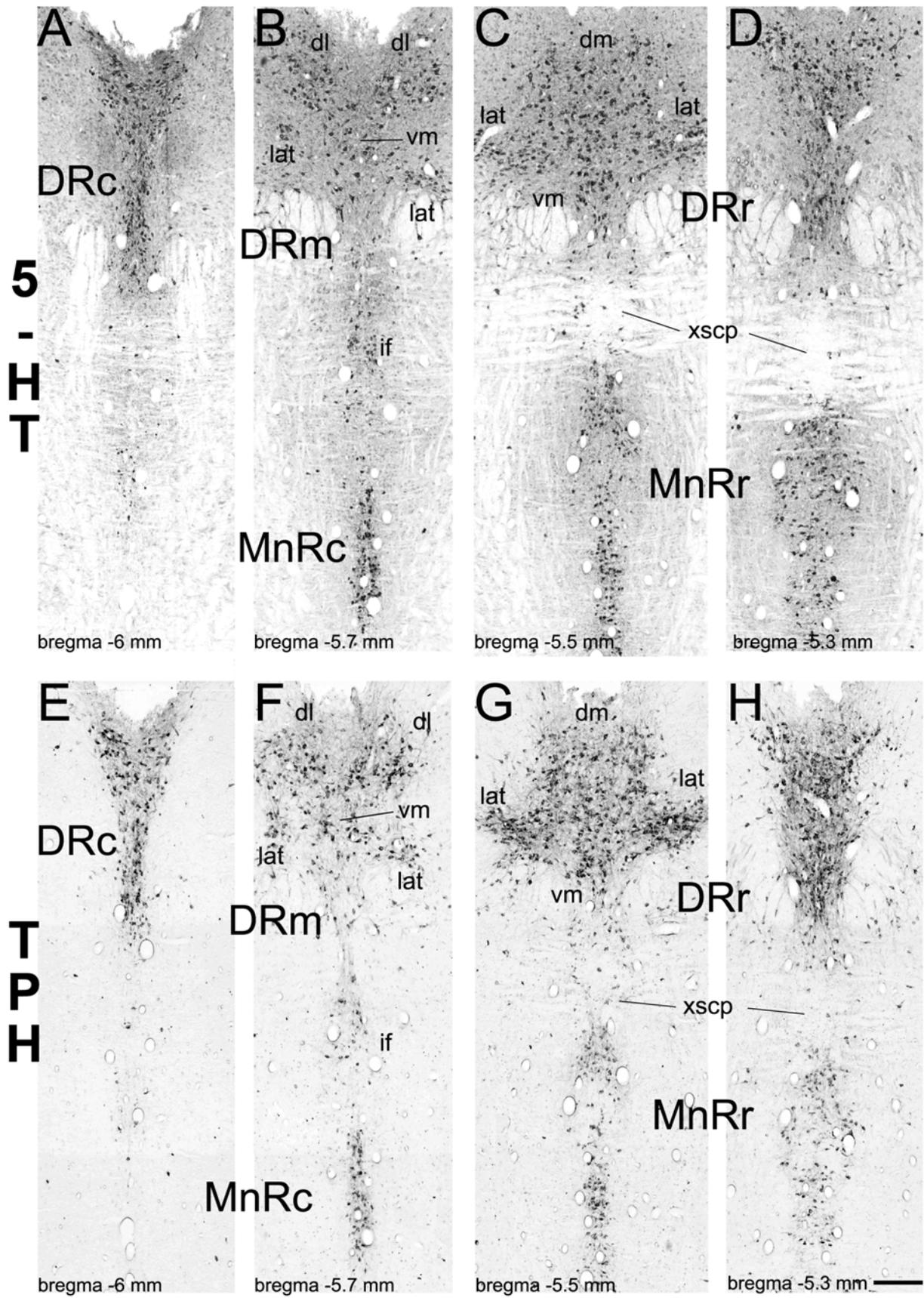
Caudo-rostral distribution of 5-HT and TPH-containing cells in the DR and MnR

Adjacent serial sections were alternatively immunolabeled for 5-HT (Fig. 2 A to D) and TPH (Fig. 2. E to H). There was an almost complete superimposition of the 5-HT and TPH-positive cells distribution patterns.

According to the morphology of the tissue, we have divided the DR into three regions along the anterior-posterior axis: caudal (DRc, -6.6 to -5.9 mm bregma), middle (DRm, -5.9 to -5.6 mm bregma) and rostral (DRr, -5.6 to -5.1 mm bregma). The DRc serotonergic cells (Fig. 2 A and E) are distributed in the midline as a median Y-shape structure ventral to the 4th ventricle. The DRm (Fig. 2 B and F) is made of several clusters of cells, laterally (lateral, dorsolateral), and in the midline (ventromedian, infra fascicular). The DRr can be divided in two parts: the posterior region (Fig. 2 C and G) has serotonergic cells expanding laterally from the ventral zone; the anterior region (Fig. 2 D and H) only contains midline serotonergic cells.

We have considered the MnR as caudal (MnRc, Fig. 2 B and F) from -5.9 to -5.5 mm bregma and rostral (MnRr, Fig. 2 C-D and G-H) from -5.5 to -5 mm bregma, the limit being defined as the decussation of the superior cerebellar peduncle (xscp). The MnRc is made of a narrow vertical line of serotonergic cells in a central position. In the MnRr, 5-HT and TPH-containing cells are sparser and more laterally situated on each section.

Fig. 2. DR and MnR adjacent serial sections immunolabeled for 5-HT and TPH. 5-HT (A-D) and TPH (E-H) immunostainings are shown on four sections representative of the caudal to rostral DR and MnR regions. All sections come from the same LP hamster. Abbreviations: dl, dorso-lateral; DRc, dorsal raphé caudal; DRm, dorsal raphé middle; DRr, dorsal raphé rostral; if, infra fascicular; lat, lateral; MnRc, median raphé caudal; MnRr, median raphé rostral; xscp, decussation of the superior cerebellar peduncle. Scale bar = 200 μ m.



The DR and MnR consist of heterogeneous populations of serotonergic cells. Representative TPH- and 5-HT-positive cells of the DR (Fig. 3 A and B) are twice bigger than MnR cells (Fig. 3 C and D). Within the DR, some subregions exhibit particular cells, which are small in the infrafascicular subnucleus (Fig. 3 E and F), fusiform and horizontal in the lateral subnuclei (Fig. 3 G and H).

There was no difference in the caudo-rostral distribution of 5-HT and TPH-containing cells between LP and SP hamsters (data not shown). The same regions and subregions have been identified in the DR and MnR, as well as the same heterogeneous populations of cells, in both photoperiods.

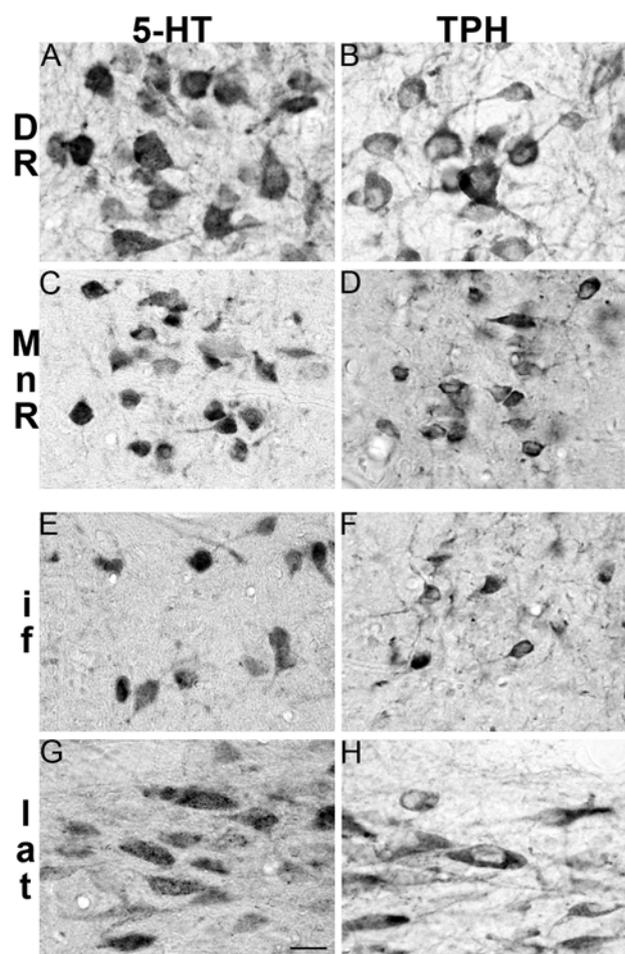


Fig. 3. High magnification of 5-HT (left panel) and TPH (right panel) immunolabeled cells of the DR (A-B) and the MnR (C-D) and of the infrafascicular (E-F) and lateral (G-H) subregions of the DR.

Scale bar = 20 μ m

DR and MnR tph2-mRNA levels in both photoperiods

The hamster 450 bp *tph2* cloned sequences used for ISH presented 90% identity with the corresponding sequence of the known *tph2* genes of rats and mice. Moreover, the same cloned fragments shared only 11% identity with the corresponding sequence of the rat *tph1* gene, and no significant one with the mouse *tph1* gene. The ISH performed from the hamster cDNA fragment was thus highly specific for the *tph2* isoform. ISH displayed a clear signal with the antisense riboprobe to the hamster DR and MnR (Fig. 4), no signal being detected with the antisense riboprobe (not shown). The fine tissular resolution allowed a quantification of *tph2*-mRNA levels in the different antero-posterior regions previously defined for the DR and MnR.

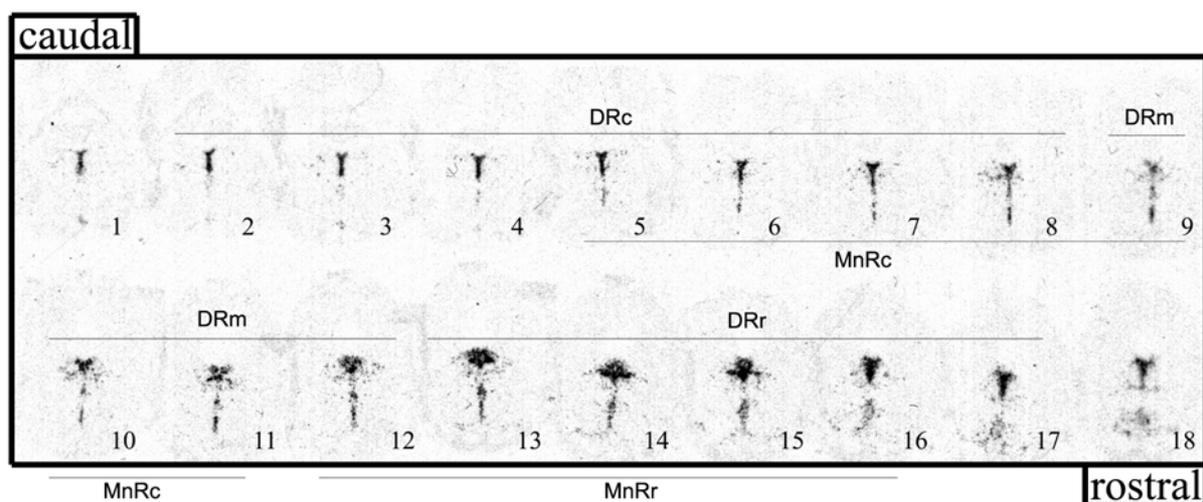


Fig. 4. *Tph2*-mRNA expression in the caudo-rostral extension of DR and MnR nuclei. The figure shows the ³⁵S autoradiograph of one slide after *tph2*-mRNA *in situ* hybridization on the DR and MnR of a single hamster. 18 sections at 80- μ m intervals represent the whole DR and MnR caudo-rostral extension from approximately -6.5 mm bregma (section 1) to -5.1 mm bregma (section 18). The number on each section is an arbitrary anatomical level used to standardize the caudo-rostral quantitative analysis of each slide. DR was quantified on the sections 2 to 8 for its caudal part, 9 to 12 for its middle part, 13 to 17 for its rostral part. MnR was quantified on sections 5 to 11 for its caudal part and 12 to 16 for its rostral part.

Significant daily variations of *tph2*-mRNA levels have been found in LP in every region of the DR and MnR except in the MnRc (Fig. 5 table F; ANOVA II, main effect of time in the DRc: $F_{5,118} = 2.87$, $P = 0.018$; DRm: $F_{5,79} = 2.4$, $P = 0.044$; DRr: $F_{5,96} = 2.83$, $P = 0.022$; MnRc: $F_{5,102} = 1.52$, $P = 0.19$; MnRr: $F_{5,59} = 4.88$, $P < 0.001$). The overall LP profiles display the same pattern: declining *tph2*-mRNA concentrations at the end of the light phase, with the lowest value at ZT13, and rising concentrations at the end of the dark period (Fig. 5 A-B-C-E). In SP, none of the DR and MnR regions but the DRc (ANOVA II, main effect of time: $F_{5,114} = 3.48$, $P = 0.006$) displayed significant daily variation of *tph2*-mRNA concentrations (Fig. 5). In addition, mean daily levels of *tph2*-mRNA were significantly decreased in SP (Fig. 5 B and E, framed boxes) in the DRm (Student's *t*-test, $t_{205} = 2.75$, $P < 0.01$) and the MnRr, ($t_{164} = 2.93$, $P < 0.01$) when compared to LP.

After nuclear emulsion of the ISH hybridized sections and visual counting of the number of *tph2*-mRNA positive cells in the DRm, DRr and MnRr at two time points (ZT13 and ZT23), no significant difference was observed within a given photoperiod, neither between both photoperiods (data not shown).

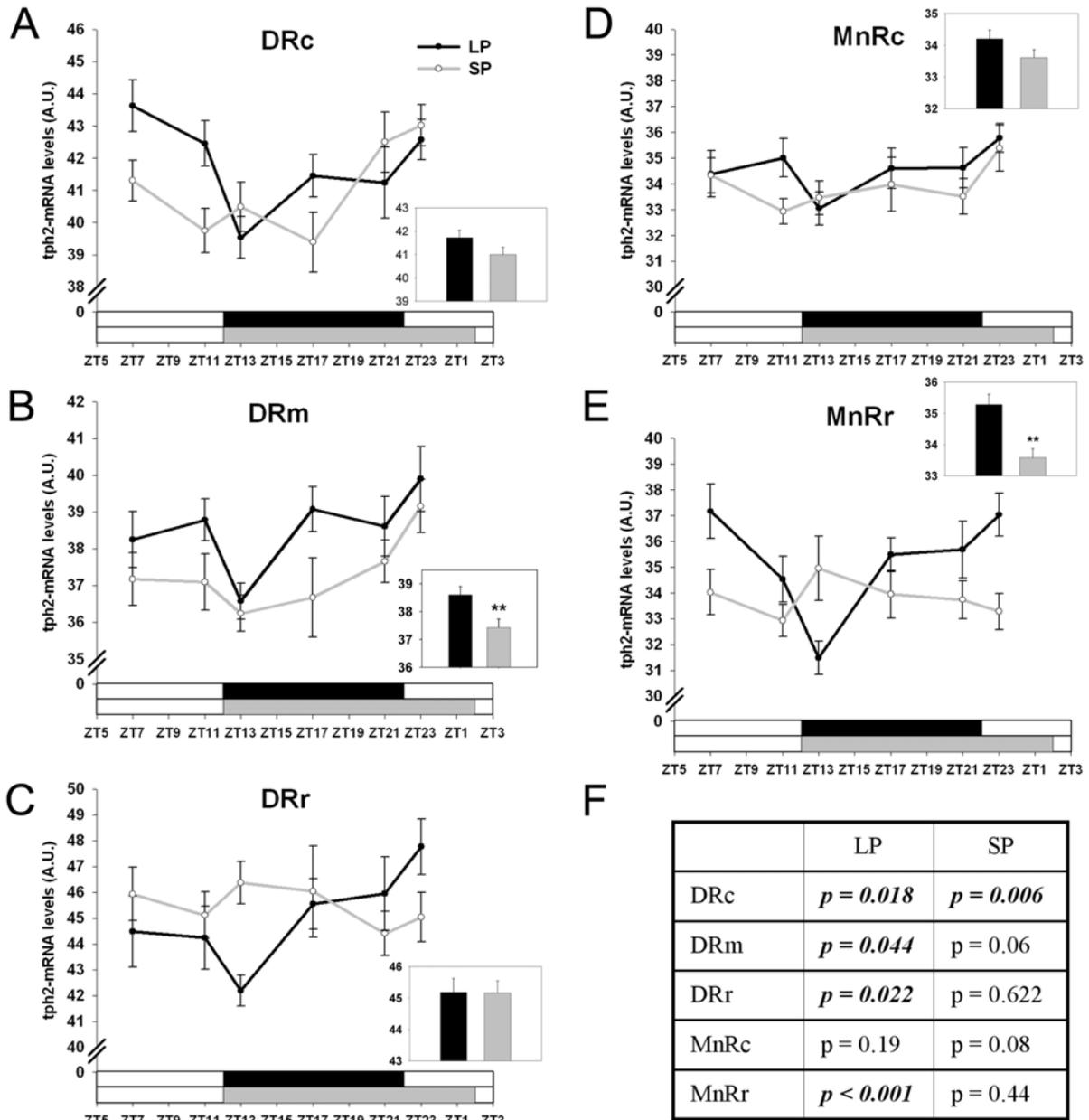
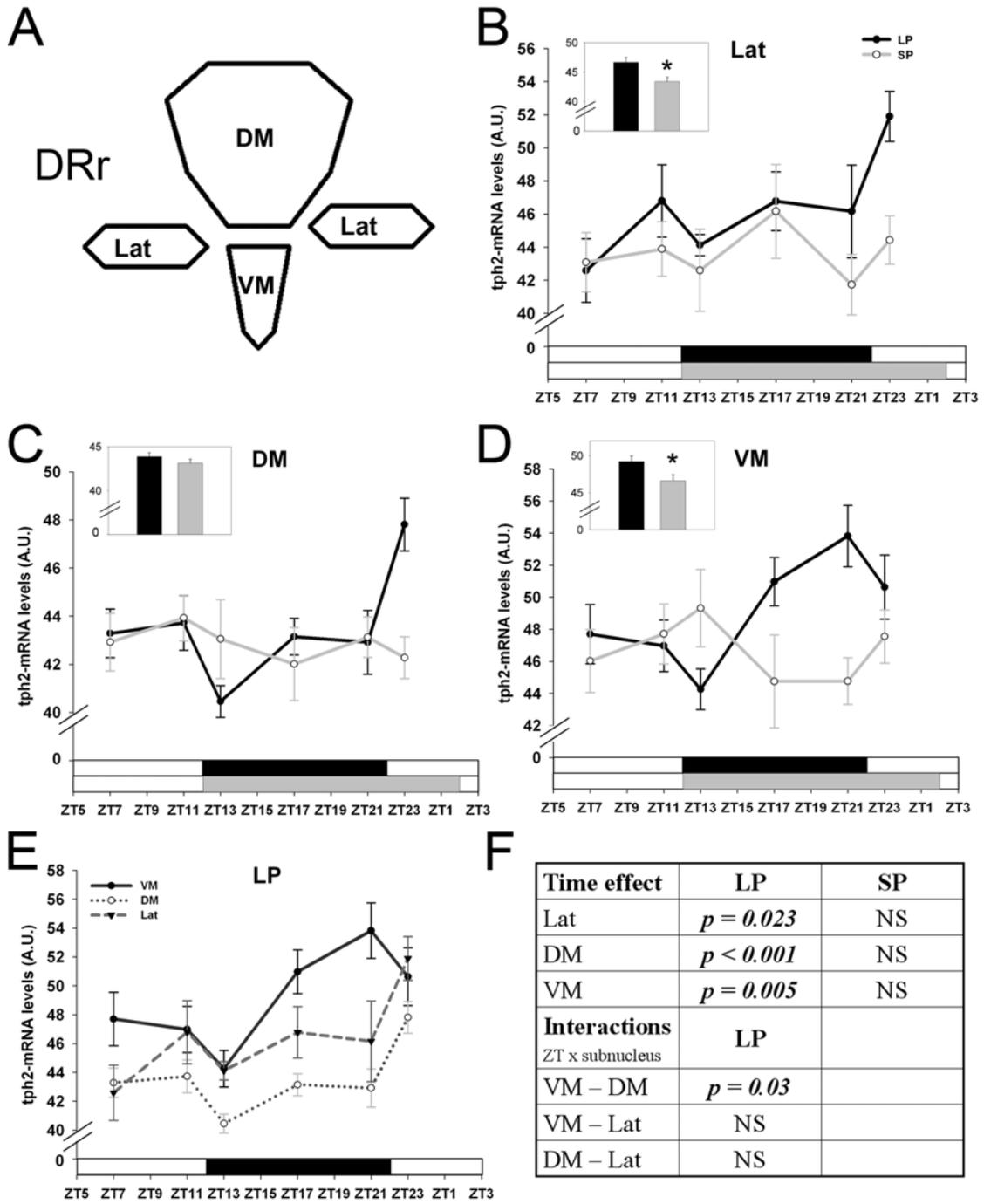


Fig. 5. *Tph2*-mRNA nychthemeral levels in both photoperiods in the three antero-posterior regions of the DR, caudal (A), middle (B) and rostral (C), and in the two antero-posterior regions of the MnR, caudal (D) and rostral (E). Each point is the mean \pm SEM of *tph2*-mRNA relative concentrations at one ZT in LP (black curves) and in SP (grey curves). Horizontal bars symbolize the light (blank) and dark (solid) periods in LP (black bars) and in SP (grey bars). Effect of time in each photoperiod and in each region was assessed by two-way ANOVA with ZT and anatomical level as factors; p-values for time effects are compiled in **table F**; significance was set at $p < 0.05$; all significant values are in bold italic characters. Framed boxes represent the mean daily levels of *tph2*-mRNA measured in LP (black histogram) and SP (grey histogram). Significance was determined by t-test; two stars symbolize $P < 0.01$.

To assess whether some subregions of the DRr displayed singular profiles, *tph2*-mRNA levels were quantified separately within each of its subdivisions (Fig. 6 A). In LP, all the subregions (Fig. 6 B-C-D-F) displayed significant daily variations of *tph2*-mRNA (ANOVA II, main effect of time in Lat: $F_{5,66} = 2.8$, $P = 0.023$; DM: $F_{5,121} = 5.65$, $P < 0.001$; VM: $F_{5,120} = 3.6$, $P = 0.005$), characterized by minimum values at ZT13 and maximum values at the end of the dark period. For the VM profile, *tph2*-mRNA levels reached their maximum at ZT21 (Newman-Keuls post-hoc analysis, ZT13 vs. ZT21, $P < 0.01$), whereas the maximum was at ZT23 for Lat (ZT13 vs. ZT23, $P < 0.05$), and DM (ZT13 vs. ZT23, $P < 0.001$). Interactions of ZT and the DM/VM subregions were significant ($F_{5,241} = 2.48$, $P = 0.03$), indicating a differential effect of time on *tph2*-mRNA levels in both subregions (Fig. 6 E). In SP, none of the three subdivisions displayed significant daily variation of *tph2*-mRNA levels. Moreover, *tph2*-mRNA mean levels (Fig. 6 B-D) were significantly reduced in SP within the Lat (Student's *t*-test, $t_{139} = 2.85$, $P < 0.01$) and VM subregions ($t_{240} = 2.39$, $P < 0.01$).

Fig. 6. Comparison of *tph2*-mRNA nycthemeral levels within each subdivision of the rostral DR in both photoperiods. **A:** Schematic drawing of the three subregions of the rostral DR. **B-C-D:** *Tph2*-mRNA nycthemeral levels in both photoperiods in the lateral (**B**), dorsomedian (**C**) and ventromedian (**D**) subregions of the DRr. Each point is the mean \pm SEM of *tph2*-mRNA relative concentrations at one ZT in LP (black curves) and in SP (grey curves). Horizontal bars symbolize the light (blank) and dark (solid) periods in LP (black bars) and in SP (grey bars). Effect of time in each photoperiod and in each region was assessed by ANOVA; p-values for time effects in each photoperiod are compiled in table F. Framed boxes represent the mean daily levels of *tph2*-mRNA measured in LP (black histogram) and SP (grey histogram). Significance was determined by t-test; one star symbolizes $p < 0.05$. **E:** Comparison of the LP *tph2*-mRNA profiles of the three DRr subdivisions. Interactions between the three profiles were assessed by two-way ANOVA; *P*-values are compiled in table F.

Significance was set at $P < 0.05$.



DR and MnR TPH protein levels in both photoperiods

Both the DR and MnR were quantified for TPH protein in their rostral and caudal region (Fig. 7). In LP, there were significant daily variations of TPH in the DRc (Fig. 7 A, ANOVA I, main effect of time, $F_{5,15} = 3.16$, $P = 0.038$) and MnRr (Fig. 7 D, $F_{5,26} = 2.87$, $P = 0.034$), but not in the DRr (Fig. 7 B) and MnRc (Fig. 7 C). The DRc and MnRr TPH daily variations displayed maximal values at the end of the dark period (Fig. 7 A-B); minima were measured at ZT7 and ZT13 respectively.

In SP, there was no significant daily variation of TPH protein in neither region of the DR and MnR. In the MnRr, mean daily levels of TPH were higher in LP than in SP (Fig. 7 D, framed box; Student's *t*-test, $t_{60} = 3.25$, $P = 0.002$), which was not seen in the other regions.

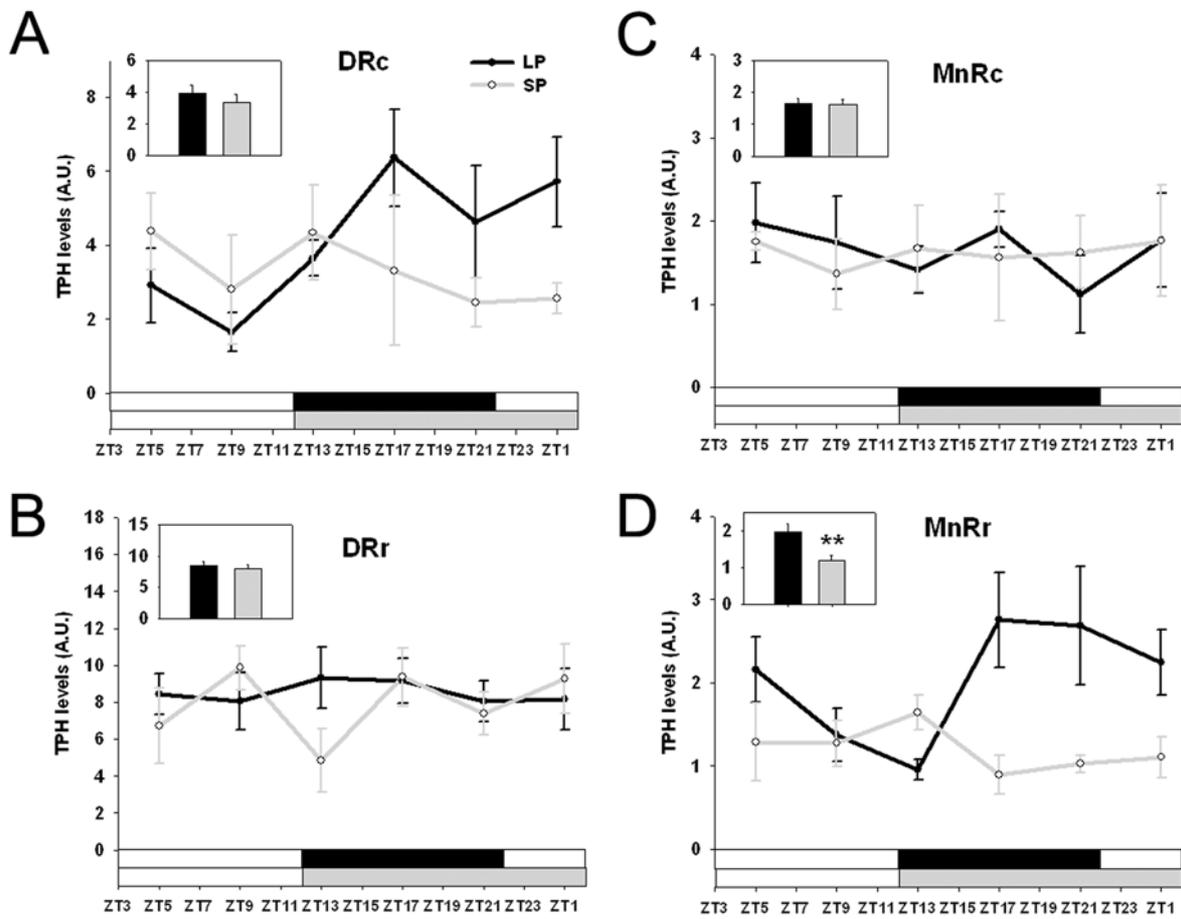


Fig. 7. TPH protein daily profiles in LP (black) and SP (grey) were assessed by western-blot in the DRc (A), DRr (B), MnRc (C) and MnRr (D). Horizontal bars symbolize the light (blank) and dark (solid) periods in LP (black bars) and in SP (grey bars). Significant TPH daily variations were found in LP in the DRc and MnRr (ANOVA I). Framed boxes (D) represent the mean daily levels of TPH in LP (black histogram) and SP (grey histogram). Significance was determined by *t*-test; two stars symbolize $P < 0.01$.

SCN 5-HT/5-HIAA ratio in both photoperiods

There was no significant difference between LP and SP in the mean daily amounts of 5-HIAA (50 ± 3 fmol/ μ g and 53 ± 2 fmol/ μ g respectively) and 5-HT (115 ± 4 fmol/ μ g and 113 ± 5 fmol/ μ g respectively) in the SCN (data not shown). The daily 5-HT/5-HIAA ratio was time-dependant in LP (ANOVA I, effect of time, $F_{5,21} = 4.74$, $P = 0.004$) but not in SP. The LP ratio profile exhibited higher values during the dark period (ANOVA I, Newman-Keuls post-hoc analysis, ZT17 and ZT21 different from ZT9 and ZT1, $P < 0.05$). Moreover, there was a significant difference in the temporal distribution of 5-HT/5-HIAA ratios between LP and SP (ANOVA II, main effect of photoperiod, $F_{1,39} = 4.21$, $P = 0.047$).

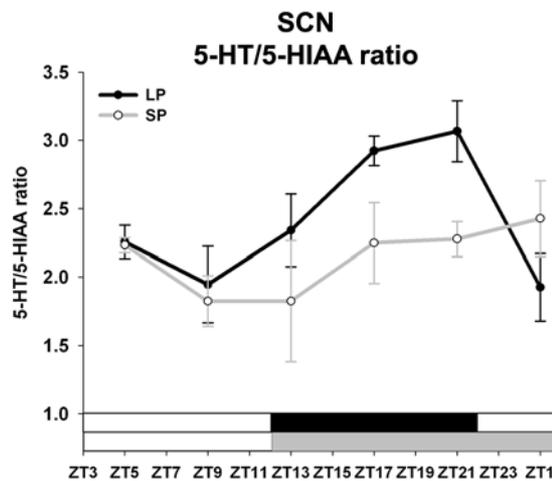


Fig. 8. SCN daily 5-HT/5-HIAA ratio in LP (black) and in SP (grey).

Discussion

The present work provides new insights on the serotonergic system of the DR and MnR in the photoperiodic species the Syrian hamster. Our results support the idea that both these nuclei display a complex internal organization: 1) anatomically, along the caudo-rostral axis and at a given anatomical level, the raphé tissue and cellular organization indicates the existence of several regions and sub-regions within each of the nuclei; and 2) functionally, several parameters of 5-HT synthesis are differentially influenced by photoperiod within the different anatomical divisions.

Anatomical regionalization of the DR and MnR nuclei

The DR and MnR give rise to the vast majority of 5-HT neurons innervating forebrain structures (Morin & Meyer-Bernstein, 1999). Underlying the diversity of the serotonergic targets, neuroanatomical studies in the rat have shown that specific regions and sub-regions of the DR and MnR project to different forebrain structures (Imai *et al.*, 1986a; Imai *et al.*, 1986b; Jacobs & Azmitia, 1992; Kazakov *et al.*, 1993; Hensler *et al.*, 1994).

In Syrian hamster, the DR and MnR are separated into rostral and caudal regions according to their projection targets (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998). Based on serotonergic cell distribution, we divided the DR into three regions, caudal, middle and rostral, in accordance with that described for rats and mice (Abrams *et al.*, 2004). More recently, Cooper *et al.* (2009) chose to delineate four regions for the DR, which also stereotaxically fits our data. The authors separated the rostral DR into two regions according to the presence or absence of the lateral sub-divisions, whereas in our study we have grouped both rostral regions. For the MnR, we have identified two morphologically distinct regions, caudal and rostral, the limit between them being the decussation of the cerebellar peduncles. Several lines of evidence justify the neuroanatomical separation of the MnR into two. By close examination of the projections to the SCN, Meyer-Bernstein *et al.* (1996) showed that most of the retrogradely labeled serotonergic cells were located within the caudal part of the nucleus. This was later confirmed by Leander *et al.* (1998). Furthermore, our observations concerning cellular morphology revealed that the DR consists of a morphologically heterogeneous population of serotonergic neurons, grouped in particular sub-regions. We

identified two paired lateral (dorsolateral, lateral) and three median (ventromedian, dorsomedian, infrafascicular) sub-regions, such structures being seen in most mammalian species (Tork, 1990; Botchkina & Morin, 1993; Bjarkam *et al.*, 1997; Charara & Parent, 1998).

In the present study we did not find any anatomical changes in SP-acclimated hamsters, neither in the distribution nor in the morphological aspect of serotonergic cells along the rostro-caudal axis of the DR and MnR.

Daily regulation of tryptophan hydroxylase in LP

The SCN, the master biological clock, receive both a direct serotonergic innervation from the MnR and an indirect input from the DR (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998; Tischler & Morin, 2003). Within the SCN, 5-HT plays an important role in circadian synchronization. In the present work, we showed for the first time that the expression of tryptophan hydroxylase in these raphé nuclei displays daily variations in LP Syrian hamsters. Except for the caudal MnR, every region of the DR and MnR exhibited significant LP daily variations of *tph2*-mRNA levels, characterized by a decrease at the light-dark transition and increasing values at the end of the dark period. These variations seem to be due to intracellular modifications of *tph2* transcript concentrations, as the number of *tph2*-mRNA-positive cells did not differ between the two time points corresponding to maximum and minimum mRNA concentration.

The LP *tph2*-mRNA profiles were correlated with daily variations of TPH protein in the same regions, except for the rostral part of the DR. An explanation for this local absence of a TPH daily rhythm may reside in the global approach used in this experiment, namely the micropunch dissection of the whole rostral DR, which might have masked fine daily variations of TPH content within the constitutive sub-regions of the DRr. The detailed resolution obtained after ISH enabled us to quantify very precisely *tph2*-mRNA levels in each of these sub-regions. The LP *tph2*-mRNA daily profile in the VM was significantly different from the DM daily pattern, particularly in the second half of the dark phase, when TPH daily levels reach their maximum in the other regions of the raphé (rostral MnR and caudal DR). Therefore, sub-regional daily regulation of *tph2* expression seems to exist within the rostral DR. A local differential control of translational or post-translational events could then explain the fact that TPH profiles do not reflect *tph2*-mRNA profiles when measured in the entire

rostral part of the DR. A more precise micro-dissection technique for sub-regional TPH protein quantification will be necessary to address this hypothesis.

The functional relevance of daily regulation of TPH levels in LP could be a rhythmic control of 5-HT synthesis. In the rat, circadian variations of *tph2*-mRNA levels in the DR and MnR (Malek *et al.*, 2005) are correlated with circadian variations of TPH protein in the raphé (Malek *et al.*, 2004) and the SCN nerve endings (Barassin *et al.*, 2002). 5-HT content is also rhythmic in the raphé (Pinato *et al.*, 2004) and the SCN (Cuesta *et al.*, 2009). Notably, all the mentioned rhythmic profiles have different phases, which can be explained by the time required for translational, post-translational and transport events, and the latency for 5-HT synthesis. It has been proposed that all parameters of 5-HT synthesis are rhythmically regulated at the level of *tph2* expression (Malek *et al.*, 2005). In the present work, the LP *tph2*-mRNA and TPH daily variations we described in the Syrian hamster DR and MnR have the same profile, that is to say minima at the light-dark transition and maxima at the end of the dark period. Thus parameters other than *tph2*-mRNA and TPH levels, such as translational and post-translational rates or mRNA stability, have to be investigated in order to establish a clear correlation between mRNA and protein daily variations. In the SCN, the 5-HT/5-HIAA ratio, commonly used as an index of 5-HT metabolism, also displays significant daily fluctuations in LP, with higher values during the dark period similar to the known pattern of 5-HT release in the SCN (Dudley *et al.*, 1998). A measure of both TPH protein levels and enzymatic activity will be necessary to establish a definitive link between 5-HT metabolism in the SCN and TPH daily variations in LP.

SP-induced modifications of tryptophan hydroxylase levels

A second major finding of the present study is the abolition of *tph2*-mRNA and TPH daily rhythms in the raphé of SP-acclimated hamsters. One could postulate that this photoperiodic information would be transmitted to the targets of 5-HT neurons. In this regard, the SCN are particularly interesting, as they receive both a direct serotonergic innervation from the MnR and an indirect input from the DR (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998; Morin & Meyer-Bernstein, 1999). We show that in SP the 5-HT/5-HIAA ratio in the SCN no longer exhibits daily variations as seen in LP, which indicates a constant turnover of the neurotransmitter throughout the day. In final, the abolition of the 5-HT/5-HIAA ratio daily rhythm could be correlated with an alteration of the rhythm of 5-HT release in the SCN.

The physiological consequences of SP-induced abolition of serotonergic rhythmicity are unknown. In the SCN, the time-dependent release of 5-HT contributes to the photic and non-photic synchronization of the clock (Challet & Pevet, 2003). If the clock does not receive a rhythmic serotonergic input from the raphé, its synchronization may be modified accordingly. One of the clearer actions of 5-HT and serotonergic agonists on the clock is to inhibit the light-induced synchronization (Rea *et al.*, 1994). The lesion of serotonergic neurons of the MnR leads to modifications of the circadian patterns of locomotor activity and increases the sensitivity of circadian rhythm responses to light (Morin, 1999; Muscat *et al.*, 2005). Moreover both light-induced phase delays and advances of locomotor activity are significantly larger in SP than in LP animals (Evans *et al.*, 2004), indicating a photoperiod-dependent increase of SCN sensitivity to light. All these elements are strong arguments to speculate that SP-induced abolition of 5-HT system rhythmicity, together with putative changes in 5-HT receptor expression and affinity, would modify greatly the global synchronization of the clock. This question will have to be investigated in future studies.

In addition to its effect on daily rhythms, SP induced a decrease of mean *tph2*-mRNA and TPH levels in the rostral MnR, as well as local decreases of *tph2*-mRNA in the DRm and in two sub-regions of the DRr, the Lat and VM. Such a SP-induced decrease of mean tryptophan hydroxylase levels could reflect changes in 5-HT synthesis. In the SCN, no photoperiodic difference in the mean total amounts of 5-HT and 5-HIAA was detected. However, there was a difference in the temporal distribution of 5-HT/5-HIAA ratios between LP and SP, indicating a photoperiod-dependent differential regulation of 5-HT metabolism. The exact mechanisms inducing such modifications are unknown. However, the 5-HT system is known to be regulated by photoperiod-dependent physiological factors which could participate in the SP-associated changes observed in the present study. For instance, behavioral locomotor activity is greatly modified in SP (Evans *et al.*, 2004), and its induction has been linked to increased 5-HT release in the SCN and intergeniculate leaflets of the thalamus in LP (Dudley *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2004). The reproductive axis, of which quiescence in SP is associated with an almost complete inhibition of testosterone secretion (Otteweller *et al.*, 1987), might also contribute to the photoperiod-associated changes in 5-HT system function, since sexual hormones are known modulators of 5-HT neuronal electrical activity and neurotransmitter release in the rat (Knoll *et al.*, 2000; Robichaud & Debonnel, 2005). Furthermore, glucocorticoids and stress are known regulators of *tph2*-mRNA and TPH levels in rodents (Chamas *et al.*, 2004; Malek *et al.*, 2007; Clark *et al.*, 2008), and alterations of

tryptophan hydroxylase expression levels have been associated with depressive-like symptoms in rodents (Dygalo *et al.*, 2006; Abumaria *et al.*, 2007; Shishkina *et al.*, 2007) and major depressive disorders in humans (Boldrini *et al.*, 2005; Bach-Mizrachi *et al.*, 2006; Bonkale *et al.*, 2006). Both glucocorticoids found in the Syrian hamster, cortisol and corticosterone, have their daily secretion rhythm abolished in SP (Ottenweller *et al.*, 1987). All three photoperiod-dependent physiological parameters could then contribute to the SP-associated alterations of tryptophan hydroxylase levels and 5-HT metabolism described in the present study. Such alterations may in turn modify the entire serotonergic system of the DR and MnR, and affect the functions and behaviours with which the raphé nuclei are associated. It is noteworthy that the quantitative photoperiod-dependent changes in *tph2*-mRNA and TPH protein have been detected in specific regions and sub-regions of the MnR and DR. Considering the complex anatomical and functional organization of the DR and MnR, all the terminal fields and related functions associated with the two nuclei may not be equally affected by a change of photoperiod.

In summary the present article underlines the complex regional influence of photoperiod on both the nycthemeral regulation and the mean levels of tryptophan hydroxylase in the DR and MnR. We emphasize the fact that this photoperiodic message could be relayed through changes in 5-HT synthesis to targets like the SCN. How the photoperiodic information reaches the DR and MnR remains to be investigated.

Données complémentaires

Afin d'établir une corrélation entre les taux journaliers de TPH et le **métabolisme de la 5-HT** dans les différentes régions du DR et MnR et dans les deux photopériodes, les concentrations en 5-HT et 5-HIAA des échantillons ayant servi à la quantification TPH par western-blot ont été déterminées par HPLC (selon une méthode d'analyse similaire à celle employée pour les échantillons SCN, se référer au Matériel et méthodes du présent article).

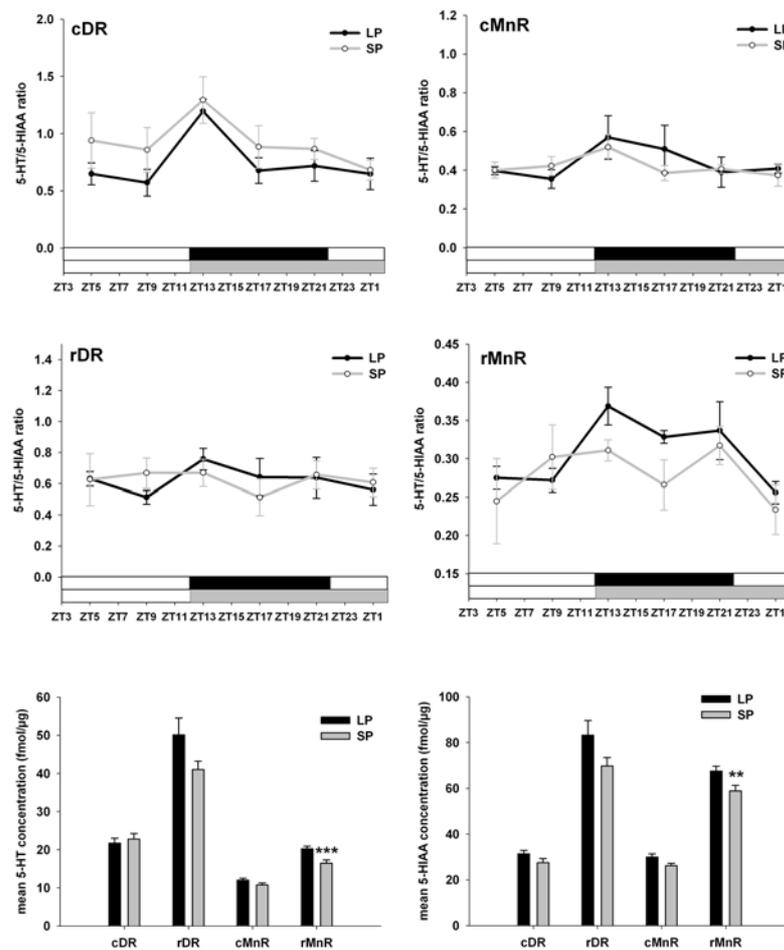


Fig. S. A-D : Ratios journaliers 5-HT/5-HIAA dans le DR caudal (A), le DR rostral (B), le MnR caudal (C) et le MnR rostral (D) en PL (noir) et en PC (gris). **E-F :** Concentrations moyennes de 5-HT (E) et 5-HIAA (F) dans les différentes régions du DR et du MnR dans les deux photopériodes. Les astérisques indiquent des différences significatives entre PL et PC au sein d'une même structure (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Résultats

En LP, le ratio 5-HT/5-HIAA présente des variations significatives sur 24h dans le DRc (Fig. S. A, $p < 0.05$) et le MnRr (Fig. S. D, $p < 0.01$). Dans chacune de ces deux régions, le ratio est maximal à ZT13 (DRc : ZT13 différent des autres ZT, $p < 0.05$; MnRr : ZT13 différent des valeurs de jour, $p < 0.05$; analyse post-hoc Newman-Keuls). Les variations journalières mesurées dans le DRr (Fig. S. B) et le MnRc (Fig. S. C) ne sont pas significatives ($p = 0.5$ et $p = 0.4$ respectivement). En SP, aucune variation significative des ratio journaliers 5-HT/5-HIAA n'est mesurée dans aucune structure.

Dans le MnRr, les taux moyens de 5-HT (Fig. S. E) et 5-HIAA (Fig. S. F) sont significativement diminués en SP. La même tendance est à noter dans le DRr, qui n'est pas significative (5-HT : $p = 0.06$; 5-HIAA : $p = 0.07$).

Discussion

Ces résultats confirment en premier lieu que l'effet principal de la photopériode courte sur les neurones 5-HT est d'abolir leur fonctionnement rythmique. Dans cette expérience, le métabolisme journalier de la 5-HT a été évalué par le rapport entre les taux de 5-HT et ceux de son produit de dégradation le 5-HIAA. En PL, ce rapport fluctue sur 24h dans le DRc et le MnRr. En PC, ces variations sont abolies.

Il est intéressant de constater que les variations journalières de 5-HT/5-HIAA se retrouvent dans les mêmes régions qui expriment des taux de TPH variables sur 24h (Fig. 7). Toutefois, les profils de TPH et de 5-HT/5-HIAA ne sont pas en phase, ce qui laisse soupçonner que d'autres processus rythmiques impliqués dans le métabolisme de la 5-HT entrent en jeu, tels que l'activité de la TPH ou des enzymes de dégradation.

Enfin, on peut noter une dernière corrélation entre les taux moyens de TPH et ceux de 5-HT et 5-HIAA synthétisés dans les deux photopériodes. La PC induit une baisse significative des taux de 5-HT et 5-HIAA dans le MnRr seulement, la seule région dans laquelle une baisse des taux de TPH avait été mesurée en PC.

En conclusion, si les variations journalières de TPH n'expliquent qu'en partie la régulation journalière de la disponibilité en 5-HT, les taux moyens de l'enzyme semblent mieux corrélés aux modifications photopériodiques de la quantité de 5-HT synthétisée.

Chapitre II

**Implication des glucocorticoïdes et de la testostérone dans la
régulation nycthémérale et photopériodique de l'expression de
*tph2***

Après avoir démontré que le fonctionnement des neurones 5-HT était rythmique en PL, et que la PC avait pour effet principal d'abolir la rythmicité, nous avons cherché à déterminer l'origine de la rythmicité et de son abolition photopériodique.

Les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone) et la testostérone apparaissaient comme des messagers ayant trois caractéristiques intéressantes pour justifier un rôle de donneur de temps aux neurones 5-HT : 1) la sécrétion de chacune de ces hormones est rythmique en PL, 2) leur sécrétion rythmique est abolie ou fortement atténuée en PC, et 3) toutes sont capables de moduler différents paramètres du fonctionnement du système sérotoninergique.

Leur rôle respectif a été étudié dans deux études séparées, chez des hamsters soit castrés soit surrénalectomisés.

Endocrine mediation of nycthemeral and photoperiodic messages for the daily regulation of tryptophan hydroxylase 2 expression in the Syrian hamster

Laurent NEXON, Dominique Sage, Paul PÉVET, and Sylvie RAISON

Abstract

In the Syrian hamster dorsal and median raphé nuclei, tryptophan hydroxylase 2 gene (*tph2*), which codes the rate-limiting enzyme of serotonin synthesis, displays daily variations in its expression in long (LP) but not in short photoperiod (SP). The present study aimed to assess the role of glucocorticoids and testosterone in the nycthemeral and photoperiodic regulation of the daily *tph2* expression. In LP hamsters, after suppression of the glucocorticoids peak, which mimics a SP glucocorticoids status, the daily variations of *tph2*-mRNA concentrations were abolished, the amplitude of body temperature rhythm decreased and the testosterone secretion rhythm modified. All these effects were reversed after experimental restoration of a glucocorticoids peak. Suppression of testosterone secretion by castration, which establishes a SP-like testosterone status, also abolishes daily variations of *tph2* expression. Glucocorticoids and testosterone thus appear as nycthemeral messengers, necessary to promote a daily regulation of *tph2* expression. Because SP-like hormonal levels in LP hamsters induce SP-like changes of *tph2* expression, glucocorticoids and testosterone are likely to distribute as well photoperiodic messages to the raphé nuclei.

Introduction

Photoperiod (daylength) is a seasonal information which influences the functioning of the master circadian clock, located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) (Mrugala *et al.*, 2000; Tournier *et al.*, 2003; Tournier *et al.*, 2009). As a consequence, the response of the clock to environmental synchronizing cues such as light pulses and behavioral stimuli is different between long (LP) and short photoperiods (SP) (Vuillez *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2004; vanderLeest *et al.*, 2009). Among its major synchronizing afferences, the SCN receive a dense direct serotonergic innervation from the median raphé (MnR) and an indirect input from the dorsal raphé (DR) (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998). The daily rhythms of 5-HT synthesis within serotonergic neurons (Cagampang *et al.*, 1993; Malek *et al.*, 2004; Malek *et al.*, 2005) and of 5-HT release in the SCN (Dudley *et al.*, 1998; Barassin *et al.*, 2002) are key components for the clock synchronization. During the night, serotonergic agonists modulate light-induced resetting, and during the day, 5-HT relays non-photoc synchronizing informations (Challet & Pevet, 2003). Synthesis of this neurotransmitter is rate-limited by tryptophan hydroxylase (TPH). In the photoperiodic species Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) held in LP 14:10 (14 hours light, 10 hours dark), *tph2*-mRNA and TPH protein levels display daily fluctuations in the DR and MnR, whereas in SP 10:14, these variations are abolished (Nexon *et al.*, 2009).

The question is thus to identify how the SCN do relay nycthemeral and photoperiodic informations to the DR and MnR. The involvement of two hormonal cues has been investigated: 1) Glucocorticoids (corticosterone and cortisol) seemed appropriate messengers, since their rhythmic secretion is under the control of the SCN (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999), their secretion is modified by photoperiod (de Souza & Meier, 1987; Ottenweller *et al.*, 1987), and, in the rat, the circadian variations of *tph2* expression are driven by the corticosterone daily rhythm (Malek *et al.*, 2007). 2) Testosterone was considered as another potential time messenger, since reproductive function and testosterone release are inhibited in SP (Reiter, 1972; Ottenweller *et al.*, 1987), androgens and estrogens receptors are present in the hamster MnR (Dimeo & Wood, 2006) and sexual steroids strongly modulate 5-HT neurons activity in rats (McQueen *et al.*, 1999; Robichaud & Debonnel, 2005) and *tph2* expression in monkeys (Bethea *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2005). The study of these hormones was furthermore

justified by the fact that they reciprocally modulate their secretion (Joshi *et al.*, 1985; Pieper & Loboeki, 2000).

With respect to the differential daily hormonal profiles in LP and SP hamsters, we evaluated in LP animals the consequences of the establishment of SP-like glucocorticoids and testosterone daily levels on the daily expression of *tph2*. In addition, we assessed the effect of hormonal modifications on a physiological output of the circadian clock, the body temperature rhythm.

Materials and methods

Animals

Male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*, Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) were housed in groups of 4 to 5 in transparent plastic cages under a 14 h-light, 10 h-dark cycle (long photoperiod LP) with constant dim red light (<2 lux) and food and drinks *ad libitum*. At the age of three months, all hamsters were individually housed. 25 of them were transferred in a room with a 10 h-light, 14 h-dark cycle for 10 weeks and constituted the short photoperiod group (SP experimental group), while the others were maintained in LP. Those LP hamsters constituted both hormonal experiments: adrenalectomy (n=110) and gonadectomy (n=24). Referential zeitgeber time ZT12 was defined as the beginning of the dark period. All experiments were performed in accordance with National Institutes of Health Guidelines regarding the care and use of animals for experimental procedures, with the European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/6.9/EEC) and French Laws.

Surgery and hormonal replacement

Two groups of hamsters constituted the gonadectomy experiment, GDX and SHAM. The GDX group was orchidectomized under 1.5% gas anesthesia (Isoflurane, Nicholas Piramal (I) Limited, London, UK) with a ventral approach; SHAM hamsters were similarly operated without testis removal.

The adrenalectomy experiment consisted of four groups: CONTROL (no surgery), SHAM (sham-operated with cholesterol pellets), ADX (adrenalectomized with low levels glucocorticoids pellets), ADX-G (adrenalectomized with low levels glucocorticoids pellets and artificial restoration of a nocturnal glucocorticoids peak). Adrenalectomy was performed with a lateral approach under deep anesthesia (Zoletil 20mg/mL, 0.6mL/100g; Rompun 0.5%, 0.25mL/100g). Both ADX and ADX-G groups were i.p.-implanted with cholesterol pellets containing 1% cortisol and 2% corticosterone (Sigma), to provide a constant diffusion of diurnal levels of both corticoids. SHAM hamsters were implanted with 100% cholesterol pellets. Pellets (6mm long, 6mm wide, 4mm diameter, 120-150mg weight) were prepared as described in a previous report (Maurel *et al.*, 2000).

During the first two weeks post-surgery, SHAM hamsters were given normal water, ADX and ADX-G hamsters a 0.9% NaCl-containing drinking solution. The third week, ADX-G hamsters were given a 0.9% NaCl and 0.15% ethanol solution containing 50µg/mL

corticosterone and cortisol, only during the night (ZT12 to ZT22), in order to reinstate a nocturnal peak of glucocorticoids. ADX-G diurnal drink and ADX day/night drink consisted of a 0.15% ethanol and 0.9% NaCl solution. The SHAM group was given water with 0.15% ethanol.

Body temperature was continuously recorded in randomly selected hamsters of the adrenalectomy experiment (SHAM, ADX and ADX-G groups) by i.p.-implanted DS1922L/T temperature loggers iButton (Maxim-Dallas, CA, US), with a sampling rate of 30min.

Sacrifice and hormonal assay

At the end of the experiments, hamsters were rapidly killed by decapitation at the following time points: ZT7, ZT11, ZT13, ZT17, ZT23 for the SP and adrenalectomy experiments (5 to 6 hamsters per ZT); ZT7, ZT10, ZT13 for the castration experiment (4 hamsters per ZT). Trunk blood was collected onto 4% EDTA-containing tubes and centrifuged (4000rpm, 4°C). Plasma was stored at -20°C. Brains were quickly removed, frozen in cold isopentane and stored at -80°C until section preparation.

Cortisol and corticosterone plasma concentrations were assessed using protocols adapted from commercially available RIA kits (MP Biomedicals, Illkirch, France). Lower sensitivity limit was 0.6 ng/ml for corticosterone and 1 ng/mL for cortisol; inter and intra-assay coefficients of variation averaged <10%. Testosterone plasma concentrations were assessed using RIA kit following the manufacturer's instructions (MP Biomedicals, Illkirch, France). Lower sensitivity limit for testosterone was 0.1 ng/mL.

***In situ* hybridization**

Brains were cut in serial 20 µm thick coronal sections across the rostral region of the DR (-5.6 to -5.1 mm bregma; Morin and Wood, 2001) and MnR (-5.5 to -5 mm bregma), regions which have been shown to display great photoperiodic differences in *tph2* expression (Nexon *et al.*, 2009). Sections were collected on SuperFrost Plus slides (VWR) and stored at -20°C. *In situ* hybridization (ISH) was performed as previously described (Malek *et al.*, 2005). Sections were fixed 10 min in 4% paraformaldehyde, and acetylated (0.5% acetic anhydrous in 0.1 M triethanolamine). Hamster-specific *tph2* riboprobes were obtained as described elsewhere (Nexon *et al.*, 2009). Riboprobes were transcribed from linearized plasmids using T7 polymerase (MAXI script; Ambion, Austin, TX) in the presence of [³⁵S]UTP (462.5 kBq/µL, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Sections were incubated overnight at 54°C with 400pM of riboprobe diluted in a hybridization buffer containing 50% deionized formamide,

2X sodium saline citrate (SSC), 1X Denhardt's solution, 0.25 mg/mL yeast tRNA, 1 mg/mL salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate, and 10 mM dithiothreitol. After hybridization, sections were treated with 0.2 µg/mL ribonuclease A (Sigma) for 30 min at 37°C. After several stringency washes in 0.5 X (53°C) and 0.2 X SSC (62°C), sections were dehydrated through a series of graded alcohol rinses containing 300 mM ammonium acetate. Processed slides together with ¹⁴C-plastic standards were exposed to autoradiographic films (Kodak BioMax; Kodak, Rochester, NY).

Data analysis and statistics

For ISH, quantitative analysis of the autoradiograms was performed as previously described (Nexon *et al.*, 2009) using an image analysis software (ImageJ 1.37v; National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov>). Briefly, each film was scanned at 1200dpi resolution, standardized with ¹⁴C-plastic standards and thresholded at the level of maximum non-specific binding value. The significance of the effect of time on hormones and mRNA concentrations was assessed by one-way ANOVA. Inter-group comparisons were analyzed by one and two-way ANOVAs and Newman-Keuls post-hoc analysis. Significance was set at $p < 0.05$.

For each hamster, the synchronization of body temperature rhythm to the light-dark cycle was analyzed by the acrophase value obtained after cosinor regression (Refinetti, 1992) of 7-day time series. Amplitude of the body temperature rhythm was assessed by two methods, by cosinor regression and by the ratio between the average nocturnal and diurnal temperatures. Effects of time and group on the acrophase and amplitude values were evaluated by ANOVA I and II.

Results

Pattern of glucocorticoids and testosterone secretion in LP and SP

In LP, there were significant variations in the daily plasma concentrations of cortisol (Fig. 1 A, main effect of ZT, $p < 0.001$), corticosterone (Fig. 1 A, $p < 0.001$) and testosterone (Fig. 1 B, $p < 0.05$). Glucocorticoids daily profiles (Fig. 1 A) were characterized by a sharp 4-fold increase of both cortisol and corticosterone levels at the light-dark transition, with maximal values at ZT13 (24h-average amounts: 19.7 ± 3.9 ng/mL for cortisol, 12.48 ± 2.1 ng/mL for corticosterone). Testosterone profile (Fig. 1 B) was characterized by maximal levels during the second half of the dark and at the beginning of the light period (Newman-Keuls post-hoc test, ZT17 and ZT23 different from ZT7, $p < 0.05$).

In SP (Fig. 1 C), daily cortisol variations were still significant ($p = 0.03$) despite a 4-fold decrease of the amplitude of the rhythm when compared to LP. Maximal values were measured at ZT17 (average 5.43 ± 1.3 ng/mL). There were no more significant variations of daily corticosterone levels ($p = 0.06$). Daily mean levels of cortisol and corticosterone were 3.5 ± 0.4 ng/mL and 2.13 ± 0.2 ng/mL respectively. Testosterone secretion in SP (Fig. 1 D) was inhibited. Most of testosterone plasma concentrations were below detection level (< 0.1 ng/mL).

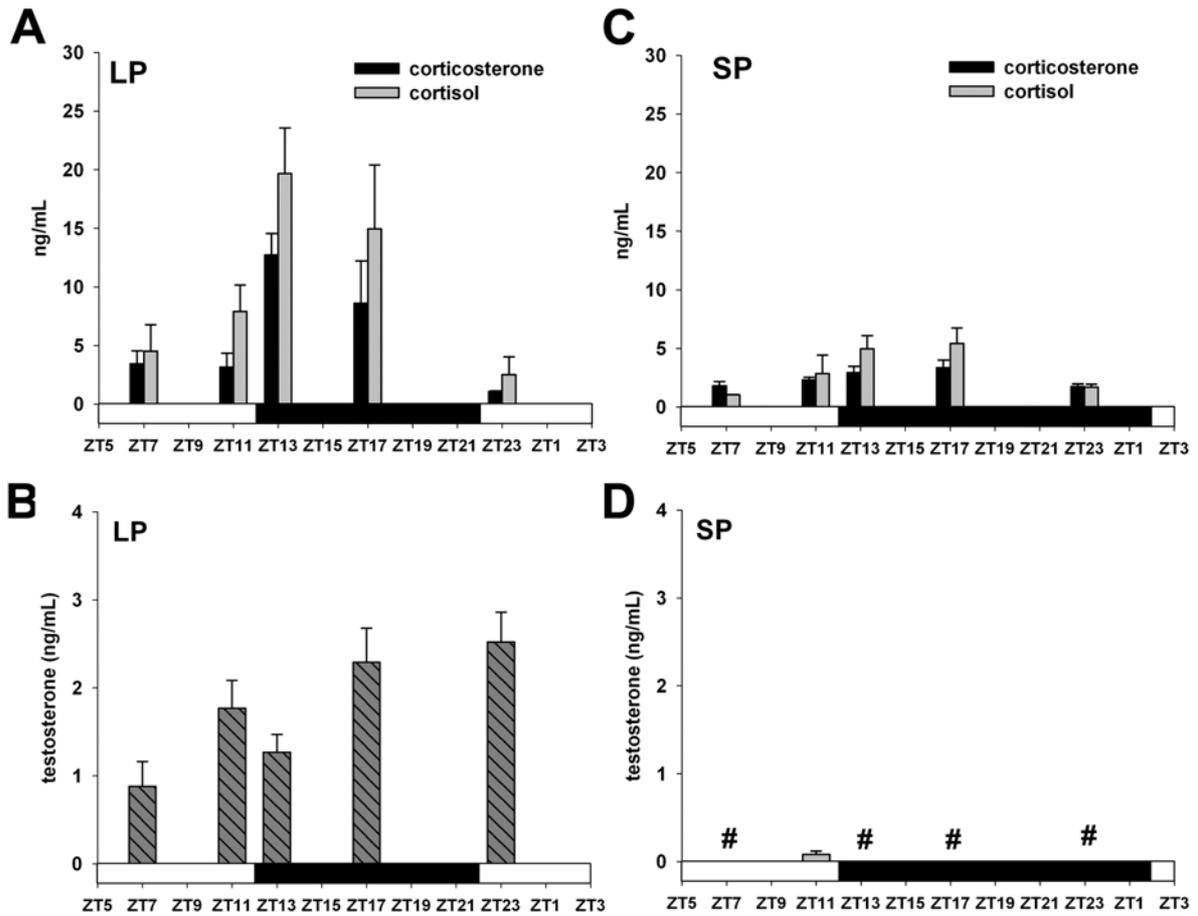


Fig. 1: Daily glucocorticoids and testosterone secretion in LP and SP. In LP, the secretion of corticosterone (**A**, black), cortisol (**A**, grey) and testosterone (**B**) is time-dependent. In SP, the peak of both glucocorticoids (**C**) and testosterone secretion (**D**) are abolished. Each bar represents the average \pm SEM of hormone plasma levels of four to five hamsters. Horizontal bars symbolize the dark (black) and light (white) periods of the day. Testosterone plasma levels under the limit of detection are indicated by #.

Experimental abolition of the glucocorticoids rhythm affects several physiological parameters in LP hamsters

Daily hormonal variations

Hamsters of the CONTROL (Fig. 2 A) and SHAM (Fig. 2 B) groups had significant daily variations of both cortisol (main effect of ZT, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively) and corticosterone concentrations ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively). In the SHAM group, ZT7 and ZT11 cortisol values were higher than those of the CONTROL group, but these differences were not significant (ANOVA II, interactions of ZT and group, Newman-Keuls post-hoc test). In the ADX group (Fig. 2 C), glucocorticoids pellets provided the expected diffusion of constant diurnal levels of both cortisol and corticosterone, which averaged 2.9 ± 0.5 ng/mL and 3.2 ± 0.5 ng/mL respectively. In the ADX-G group (Fig. 2 D), the glucocorticoids night drinking restored significant daily variations of both cortisol (ANOVA I, main effect of ZT, $p < 0.001$) and corticosterone ($p < 0.05$) plasma concentrations, with maximal values at ZT17.

Daily fluctuations of testosterone plasmatic levels (Fig. 2 E-H) were significant in the CONTROL, SHAM and ADX group (CONTROL: $p < 0.05$; SHAM: $p < 0.01$; ADX: $p < 0.01$), but not in the ADX-G group.

Daily profiles of plasma testosterone levels of both CONTROL (Fig. 2 E) and SHAM (Fig. 2 F) groups were not statistically different (ANOVA II, interactions of ZT and group, $p > 0.05$). In the ADX group (Fig. 2 G), there was a significant increase of hormone levels at ZT11 (ANOVA II, Newman-Keuls post-hoc analysis, ZT11 ADX vs. ZT11 SHAM and ZT11 CONTROL, $p < 0.05$) and ZT13 (ZT11 ADX vs. ZT11 SHAM and ZT11 CONTROL, $p < 0.001$), but not at any other time point compared to control and sham groups. In addition, mean daily levels of testosterone were higher in the ADX group than in all the other groups (ANOVA II, main effect of group, $p < 0.001$; Newman-Keuls post-hoc test, ADX different from the other groups, $p < 0.001$). In the ADX-G group (Fig. 2 H), daily testosterone levels were not significantly different from those of the CONTROL and SHAM groups (ANOVA II, interactions of ZT and group, $p > 0.05$).

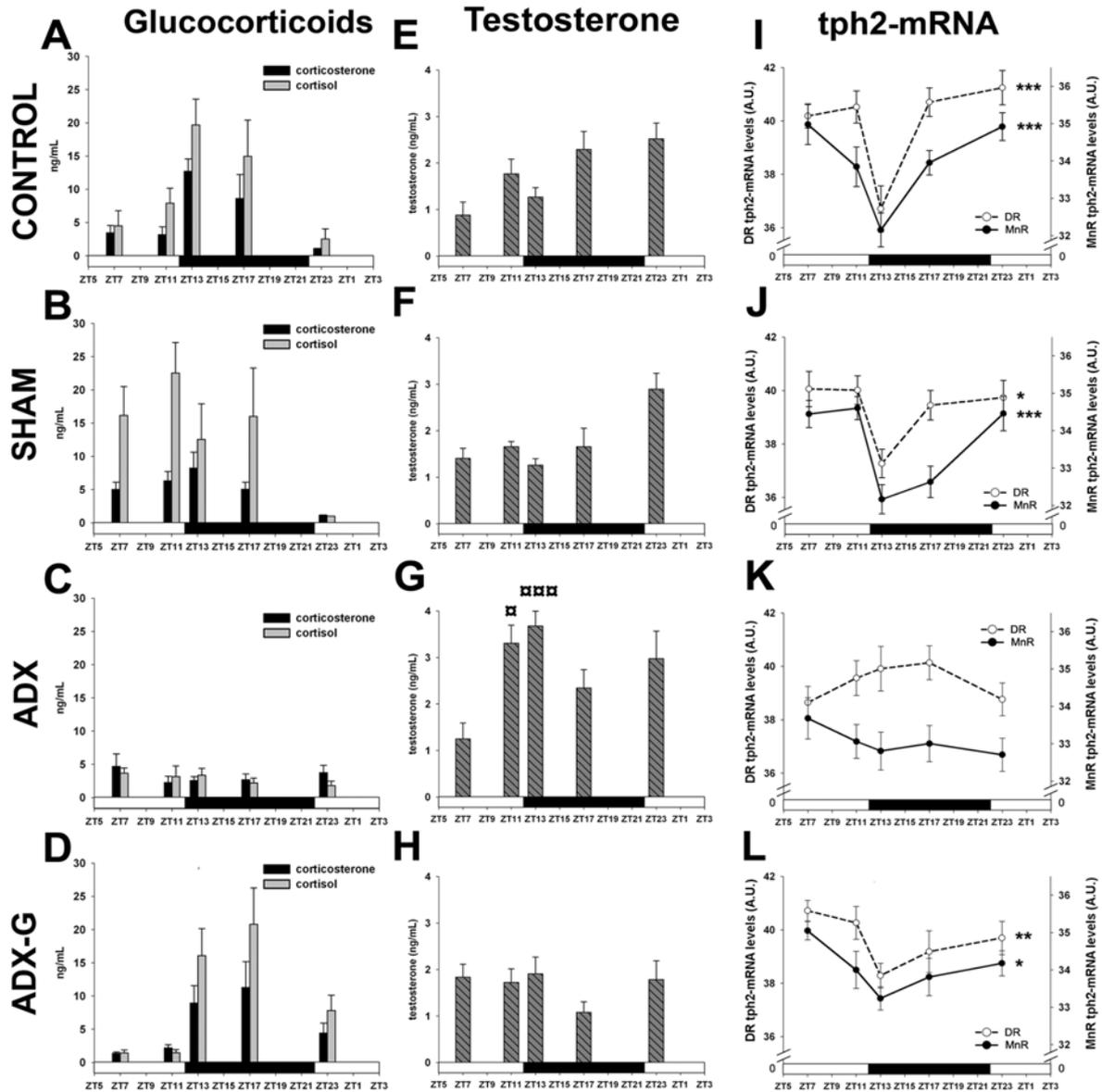


Fig. 2: Modulation of daily *tph2*-mRNA and testosterone levels after experimental suppression and restoration of the glucocorticoids rhythm. Glucocorticoids (A-D) and testosterone (E-H) plasma concentrations were assessed by RIA. Daily *tph2*-mRNA content (I-L) of the DR (dashed lines) and MnR (solid lines) were quantified by ISH. The experiment included four groups of hamsters, receiving no surgery (CONTROL A, E, I), sham-operated (SHAM B, F, J), adrenalectomized (ADX C, G, K) and adrenalectomized treated with glucocorticoids (ADX-G D, H, L). See text for more details about groups. Each bar (A-H) and data point (I-L) is the average \pm SEM of hormone plasma concentrations and *tph2*-mRNA relative levels respectively (n = 4 to 5). The CONTROL glucocorticoids profile (A) is the same as the one presented in Fig. 1. Horizontal bars symbolize the dark (black) and light (white) periods of the day. Stars symbolize a significant effect of time on *tph2*-mRNA levels (* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001). The α sign indicates an inter-group difference of testosterone concentration at the same ZT (α p<0.05; $\alpha\alpha$ p<0.001).

Daily tph2-mRNA variations in the DR and MnR

DR and MnR daily variations of *tph2*-mRNA levels were significant in both the CONTROL (Fig. 2 I; main effect of ZT, DR: $p < 0.001$, MnR: $p < 0.001$) and the SHAM hamsters (Fig. 2 J; DR: $p < 0.05$, MnR: $p < 0.001$). In both CONTROL and SHAM groups, daily *tph2*-mRNA profiles were similar to those described in a previous experiment (Nexon *et al.*, 2009), characterized by decreasing values at the light-dark transition and increasing values at the end of the night. In the ADX group (Fig. 2 K), the daily *tph2*-mRNA variations were abolished in both the DR and the MnR (main effect of ZT, $p > 0.05$). In the ADX-G hamsters (Fig. 2 L), restoration of the glucocorticoids peak re-established significant variations of *tph2*-mRNA levels in both the DR ($p < 0.01$) and MnR ($p < 0.05$). The profiles were identical to those of the CONTROL and SHAM control groups (ANOVA II, interactions of group and ZT, ADX-G vs. CONTROL: $p > 0.05$; ADX-G and SHAM: $p > 0.05$, either in the DR or in the MnR).

Amplitude of body temperature rhythm

During the three weeks post-surgery (Fig. 3 A-C), all hamsters of the SHAM, ADX and ADX-G groups displayed a robust temperature rhythm characterized by basal values during the light period, maximal values after the light-dark transition and high values during the rest of the dark. As assessed by cosinor analysis, the rhythms were perfectly synchronized to the light/dark cycle. However, both the cosinor and the night/day ratio analysis showed that the amplitude was affected by both the duration of the experiment (ANOVA II, main effect of week, $p < 0.001$) and the experimental treatment (main effect of group, $p < 0.001$). Interactions of week and group were also significant ($p < 0.001$).

In the SHAM group, the night/day ratio was similar during the three weeks (Fig. 3 D) indicating that surgery in itself did not affect this parameter. During the first week post-surgery, the value of the ratio was not statistically different between the three experimental groups (Fig. 3 D), which showed that the effect of adrenalectomy on the ratio was not immediate. From the first week to the third (Fig. 3 A to D), the ADX group displayed a progressive increase of the average diurnal temperatures (week 1: 36.6°C, week 2: 36.7°C, week 3: 36.8°C) whereas the average nocturnal temperatures remained constant (37.4°C during the three weeks). As a result, there was a progressive and significant decrease of the night/day temperature ratio (Fig. 3 D, ANOVA II, interactions of week and group; week 1 vs. week 2: $p < 0.001$; week 2 vs. week 3: $p < 0.05$; Newman-Keuls post-hoc test). The ADX-G group displayed the same decrease in the night/day ratio between the first two weeks of experiment (Fig. 3 D, week 1 vs. week 2: $p < 0.001$), when hamsters were not given nocturnal

glucocorticoids-containing drinks. The third week, the glucocorticoids drinking reversed in part the night/day ratio decrease (Fig. 3 D, week 2 vs. week 3: $p < 0.05$; week 1 vs. week 3: $p < 0.01$).

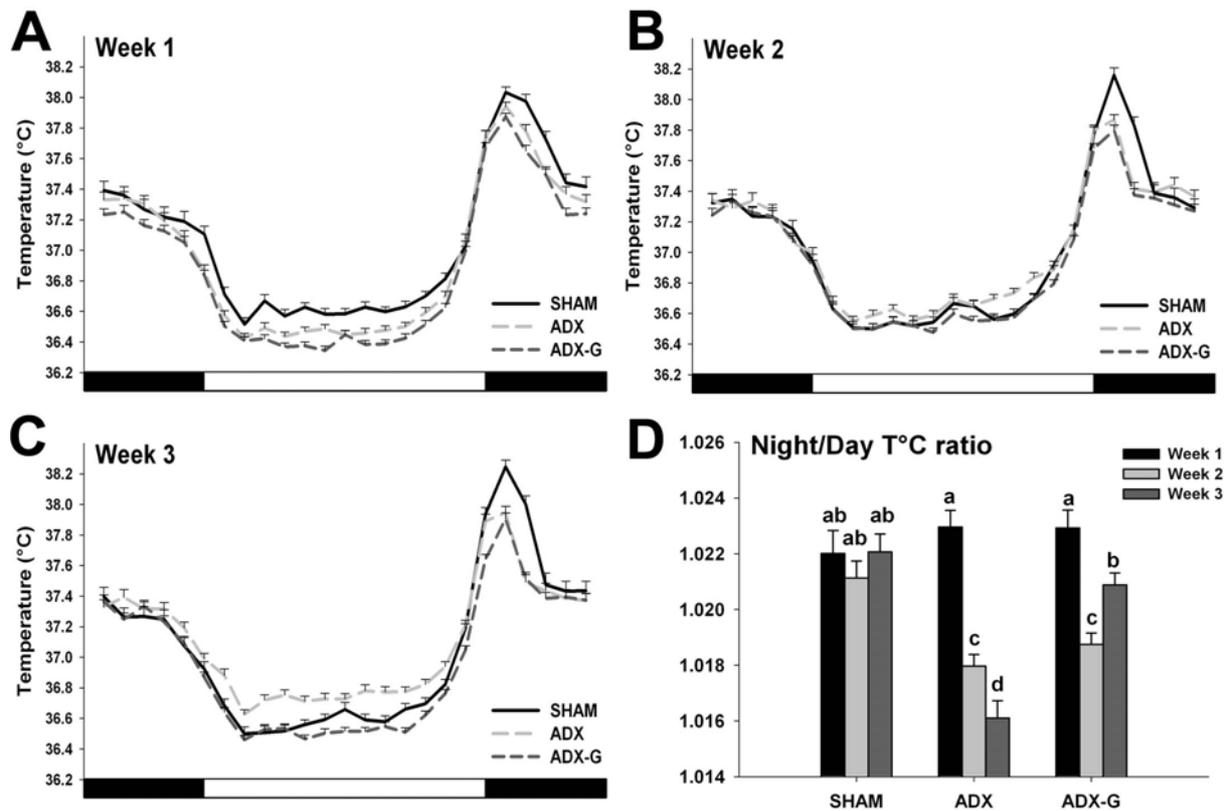


Fig. 3: Modulation of the amplitude of body temperature rhythm following adrenalectomy. Body temperature was continuously recorded after surgery during the three weeks of experiment (A-C) in the SHAM (black solid line), ADX (grey long dash) and ADX-G (black short dash) groups. On the third week, ADX-G hamsters were given night-time glucocorticoids in their drinking water. Each point is the mean \pm SEM of the body temperature measured at a given time point during 7 days in all hamsters of a given group (SHAM: $n = 10$; ADX: $n = 17$; ADX-G: $n = 22$). Horizontal bars symbolize the dark (black) and light (white) periods of the day. The amplitude of the rhythm was calculated for each hamster as the ratio between the average nocturnal and the average diurnal body temperature (D). Each bar is the mean \pm SEM of the ratios of all hamsters within a given group. Ratio values which have no letter in common are significantly different. Differences were considered at $p < 0.05$.

Effects of surgical castration on *tph2*-mRNA and glucocorticoids levels

SHAM gonadectomy group displayed classical LP levels of testosterone (Fig. 4 A) at the three investigated time points (average 1.9 ± 0.1 ng/mL), whereas no trace of plasma testosterone was detected in the GDX hamsters (Fig. 4 B).

Of the three investigated time points, glucocorticoids levels were the highest at ZT10 in the SHAM hamsters (Fig. 4 C). The differences of cortisol levels between the three time points was significant (ANOVA I, main effect of ZT, $p < 0.01$), which was not seen for corticosterone (main effect of ZT, $p > 0.05$). Castration suppressed the time-dependent variations of cortisol concentrations, and there was no significant effect of time on corticosterone concentrations (Fig. 4 D).

Tph2-mRNA levels of the SHAM hamsters (Fig. 4 E) were significantly different between the three time points in both the DR and MnR (ANOVA I, main effect of ZT, $p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively). ZT13 *tph2*-mRNA values were significantly lower than those at the other time points, both in the DR (ANOVA I, Newman-Keuls post-hoc test, $p < 0.001$), and in the MnR (ZT13 vs. ZT7, $p < 0.05$; ZT13 vs. ZT10, $p < 0.01$). Following castration (Fig. 4 F), no more significant difference of *tph2*-mRNA levels was measured between the three time points.

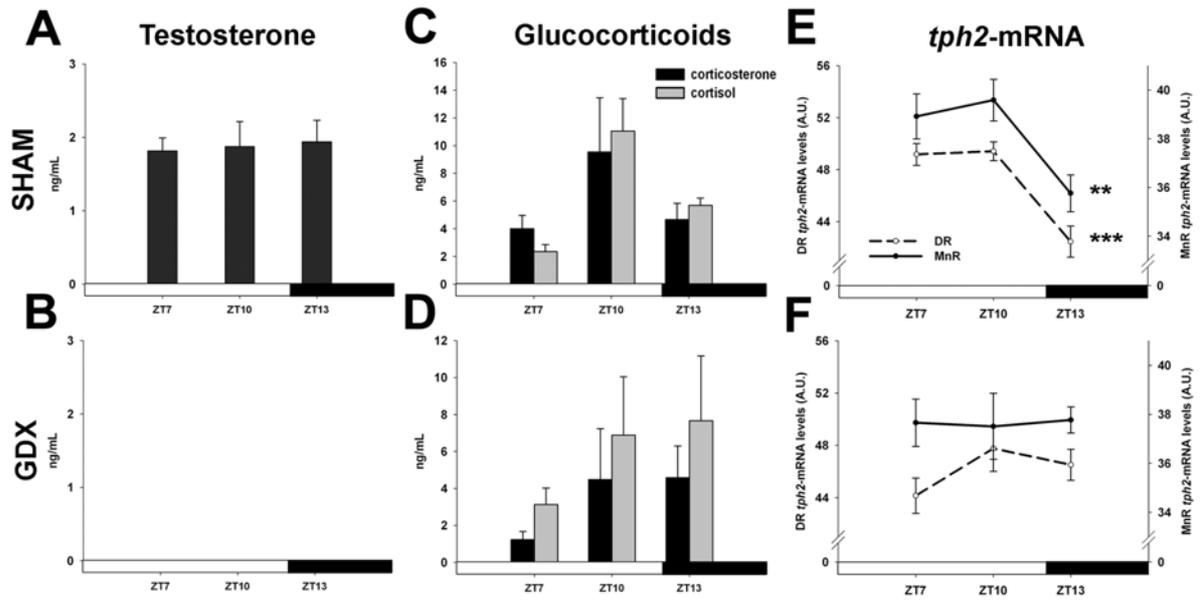


Fig. 4: Abolition of *tph2*-mRNA variations after surgical castration. Four sham-operated hamsters (A, C, E) were compared to four castrated hamsters (B, D, F). Testosterone (A and B) and glucocorticoids plasma concentrations (C and D) were measured by RIA. Daily *tph2*-mRNA content (E and F) of the DR (dashed lines) and MnR (solid lines) were quantified by ISH. Each vertical bar and data point is the average \pm SEM of hormone plasma concentrations and *tph2*-mRNA relative levels. Horizontal bars symbolize the dark (black) and light (white) periods of the day. Stars symbolize a significant effect of time on *tph2*-mRNA levels (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Discussion

To approach the question of the origin of the nycthemeral and photoperiodic variations of *tph2* expression in the Syrian hamster DR and MnR, described in our previous experiment (Nexon *et al.*, 2009), we evaluated the involvement of two rhythmic hormonal cues, glucocorticoids and testosterone.

Glucocorticoids rhythm is critical for the daily expression of *tph2*

The photoperiodic variations of both *tph2*-mRNA and glucocorticoids observed in Syrian hamsters have a close relationship: in LP, both parameters display nycthemeral variations (Albers *et al.*, 1985), Nexon *et al.* 2009, present study) which are abolished or greatly attenuated in SP (Ottenweller *et al.*, 1987, Nexon *et al.*, 2009, present study). To further characterize the correlation between corticosterone/cortisol and *tph2* expression, we demonstrate that the suppression of both these hormones' rhythm abolishes the daily *tph2*-mRNA variations, which can be re-induced after restoration of an artificial plasmatic hormonal peak. Moreover, the glucocorticoids status we have established in LP hamsters mimics the one measured in SP. Notably, this SP-like glucocorticoids status induces the same abolition of daily *tph2*-mRNA variations as in SP-acclimated hamsters (Nexon *et al.*, 2009). Hence, glucocorticoids appear to convey both a nycthemeral and a photoperiodic message to the DR and MnR in the Syrian hamster.

The role of time messenger for glucocorticoids is consistent with data obtained in the rat, showing that the rhythm of corticosterone is a key temporal signal able to promote the rhythmic expression of various genes, both in the central nervous system and in periphery (Holmes *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 1998; Balsalobre *et al.*, 2000; Amir *et al.*, 2004; Segall *et al.*, 2006). In the DR and MnR specifically, the corticosterone rhythm drives the rhythmic expression of *tph2* (Malek *et al.*, 2007). However, daily *tph2*-mRNA variations exhibit different profiles in the rat and the hamster, suggesting a differential regulation of *tph2* expression between both species. To date, the exact mechanism by which glucocorticoids regulate *tph2* expression is not known. In the rat, the expression of glucocorticoids receptors in 5-HT-containing neurons (Harfstrand *et al.*, 1986) suggests a possible direct control of *tph2* gene expression. In the Syrian hamster, the presence of glucocorticoids and/or mineralocorticoids receptors in the raphé nuclei remains to be confirmed, as well as the

presence of Glucocorticoids Response Element sequences in the promoting region of *tph2*, for a putative direct modulation of the gene transcription. In this hypothesis, glucocorticoids action on *tph2* transcription would be inhibitory, as indicates the fact that the increase of glucocorticoids levels at the end of the light period is followed by the ZT13 decrease in *tph2*-mRNA levels.

If glucocorticoids do inhibit *tph2* expression, the *tph2*-mRNA trough is a causal consequence of the glucocorticoids peak. Therefore, an increase of glucocorticoids levels at any time of the day would in theory inhibit *tph2* expression thereafter. In the sham group, we measured an unexpected increase of cortisol levels compared to the control group in the second half of the light period, which was not seen for corticosterone. The cause of this increase is not known, although it could be linked to an up-regulation of cortisol biosynthesis due to the supplementation of cholesterol, the glucocorticoids precursor. Interestingly, this early increase of cortisol levels did not significantly modify the daily profile of *tph2*-mRNA levels in the DR and MnR of sham hamsters. This result may indicate either the existence of a window of sensitivity, or a differential effect of cortisol and corticosterone on the regulation of *tph2* expression.

Although significant, the variations of daily *tph2*-mRNA levels re-induced by the artificial glucocorticoids peak in the ADX-G group were weaker in amplitude than those measured in the control hamsters. This result suggests that other factors might intervene to modulate the daily profiles of *tph2*-mRNA levels.

A role for testosterone in the modulation of the daily *tph2* expression

Several cues indicate that testosterone might be involved in the modulation of daily *tph2* expression. As for glucocorticoids and *tph2*-mRNA, daily testosterone levels are rhythmic in LP but not in SP (Ottenweller *et al.*, 1987; present study). Furthermore, several studies have demonstrated a direct action of testosterone on 5-HT neurons functioning in many species. In the rat, sexual steroids have a stimulatory action on serotonin transporter expression and density in several structures including the MnR (McQueen *et al.*, 1999) and on 5-HT neurons electrical activity in the DR (Robichaud & Debonnel, 2005). In both the DR and MnR, sexual steroids modulate 5-HT synthesis through the regulation of *tph2* expression in monkeys (Betha *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2005) and of TPH protein levels in monkeys and guinea

pigs (Lu *et al.*, 1999). In the Syrian hamster, both androgens and estrogens receptors are expressed in the MnR (Dimeo & Wood, 2006).

Thus, the increase in testosterone concentrations which was measured in adrenalectomized hamsters might be involved, at least in part, in the abolition of the daily variations of *tph2* expression. This testosterone increase observed at ZT11 and ZT13, at the time corresponding to the abolished glucocorticoids peak, is consistent with the known inhibitory action of glucocorticoids on testosterone release (Tsuchiya & Horii, 1995a; 1996). To assess the possibility that testosterone levels were somewhat implicated in the ZT13 *tph2*-mRNA trough abolition in the ADX hamsters, we quantified *tph2*-mRNA concentrations at three time points framing the light-dark decrease of *tph2* expression in gonadectomized (GDX) animals. Castration induced the same abolition of the ZT13 *tph2*-mRNA decrease as adrenalectomy had done. From this second experiment, it appeared unlikely that the daily *tph2*-mRNA variations were directly driven by the testosterone rhythm, since two opposite patterns of testosterone secretion, rhythmic in the adrenalectomized experiment and non rhythmic in the castration experiment, led to a similar abolition of daily *tph2*-mRNA variations.

Nevertheless, it was clear that the presence or absence of testosterone did modulate *tph2*-mRNA daily expression. This is consistent with the fact that in SP, there is a concomitant inhibition of testosterone secretion (Ottenweller *et al.*, 1987, present study) and an abolition of daily *tph2*-mRNA variations (Nexon *et al.* 2009). The drastic fall of testosterone plasmatic levels, as well as the diminished amplitude of glucocorticoids rhythm, could then stand for two photoperiodic messages able to suppress the daily variations of *tph2* expression.

Through the activation of androgen or estrogen receptors, testosterone would directly regulate *tph2* expression. However, until now no Androgen or Estrogen Response Element sequence has been described in the *tph2* gene promoter of the Syrian hamster. Indirectly, testosterone is susceptible to act on *tph2* expression *via* a modulation of glucocorticoids secretion. In the rat, a treatment with high levels of testosterone increases the response to stress (Viau & Meaney, 1996; Viau *et al.*, 1999; Viau & Meaney, 2004), whereas castration enhances hypothalamic-pituitary-adrenals axis activity and corticosterone secretion (Seale *et al.*, 2004a; Seale *et al.*, 2004b). On the other hand, castration in the Syrian hamster provokes an important decrease in the amplitude of both cortisol and corticosterone peaks (Pieper & Loboeki, 2000). Considering data from the adrenalectomy experiment, such decrease would constitute a diminished nycthemeral signal which would no longer be able to drive the daily variations of *tph2* expression.

In the present study, the decrease of glucocorticoids levels we measured after gonadectomy was not significant at the three investigated time points. However, the effect of time on cortisol levels was significant in sham but not in GDX hamsters, indicating a possible modification of cortisol rhythm after testosterone suppression. As glucocorticoids rhythm is critical for the daily regulation of *tph2* expression, an alteration of its profile at the light-dark transition may have explained the abolition of the ZT13 *tph2*-mRNA trough in GDX hamsters.

Glucocorticoids and testosterone modulation of the circadian clock: role of 5-HT system

In Syrian hamsters, the DR and MnR daily *tph2*-mRNA variations are associated with daily variations of TPH protein content (Nexon *et al.*, 2009), and of 5-HT content (Ozaki *et al.*, 1993) and release in the SCN (Dudley *et al.*, 1998). The rhythmic functioning of 5-HT neurons is critical for a harmonious functioning of the clock, since the destruction of the SCN serotonergic innervation impairs both the photic (Morin & Blanchard, 1991; Bradbury *et al.*, 1997; Muscat *et al.*, 2005) and non photic synchronization (Cutrera *et al.*, 1994; Challet *et al.*, 1997; Edgar *et al.*, 1997; Marchant *et al.*, 1997). Thus the glucocorticoids- and testosterone-mediated abolition of daily *tph2*-mRNA variations would be susceptible to alter both the rhythmic synthesis of 5-HT in the raphé nuclei and the daily variations of 5-HT metabolism in the SCN, since a correlation exists between all these variations in LP (Nexon *et al.*, 2009).

Whether the endocrine-dependent abolition of *tph2*-mRNA variations in the raphé nuclei impairs 5-HT release in the SCN is not known. However, several studies indicate that glucocorticoids and/or testosterone would be susceptible to indirectly target the clock *via* the serotonergic system. First, in the rat, the abolition of corticosterone rhythm, or the inverted artificial restoration of a corticosterone peak at the beginning of the light period, accelerates re-entrainment of locomotor activity rhythm after a shift of the light-dark cycle (Sage *et al.*, 2004). This effect of corticosterone on the clock is not direct, since glucocorticoids receptors are not significantly expressed in the rat SCN (Rosenfeld *et al.*, 1988; Balsalobre *et al.*, 2000), but rather seems to involve the serotonergic system, since the acceleration of photic entrainment is suppressed after destruction of the SCN serotonergic innervation (Sage *et al.*, 2004).

Secondly, in SP Syrian hamsters, the modifications of glucocorticoids and testosterone status are associated with an abolition of both the daily variations of *tph2*-mRNA in the DR/MnR

and 5-HT metabolism in the SCN (Nexon *et al.*, 2009). In this photoperiod, the hamsters' circadian clock is also more sensitive to photic stimulations, as indicated by the potentiation of light-induced phase-shifts (Pittendrigh *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 2004). Such a potentiation can be obtained in LP hamsters after selective destruction of 5-HT fibers in the SCN (Morin & Blanchard, 1991; Muscat *et al.*, 2005), suggesting that the rhythm of 5-HT release is greatly modified in SP. The regulation of *tph2* expression by glucocorticoids and testosterone could then be involved in the SP-induced modifications of the clock photic synchronization *via* the raphé-SCN serotonergic pathway.

To assess the possibility that the glucocorticoids rhythm modification would in parallel modulate the clock functioning, we measured in sham and adrenalectomized hamsters the core body temperature rhythm, a physiological output of the clock (Refinetti *et al.*, 1994; Osborne & Refinetti, 1995; Refinetti, 1995), for the whole duration of the experiment. ADX hamsters were well synchronized to the light-dark cycle, indicating that the abolition of daily *tph2* variations did not impair the photic synchronization of the clock to a 14:10 lighting schedule. However, contrary to the sham, the amplitude of body temperature of ADX hamsters progressively decreased during the three weeks of experiment, due to a selective increase of diurnal temperatures. Notably, the rhythm flattening was partially reversed on the third week after glucocorticoids treatment. Such drastic changes in the amplitude of body temperature rhythm have already been described in the rat after i.c.v. infusions of corticotropin-releasing hormone (Linthorst *et al.*, 1997). The mediators of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis may thus be critical for the maintenance of robust oscillations of body temperature. Future studies will be necessary to assess whether the serotonergic system of the DR and MnR is involved in the process.

In conclusion, we demonstrate that both the glucocorticoids rhythm and testosterone secretion regulate the daily expression of *tph2* in LP, the exact targets of the steroid hormones remaining to be determined. In addition, the experimental modulation of glucocorticoids and testosterone plasmatic concentrations so as to create an experimental SP-like hormonal status mimics the abolition of the daily *tph2* expression previously described in SP-acclimated animals. Glucocorticoids and testosterone thus appear to convey nycthemeral and photoperiodic messages to the serotonergic neurons of the DR and MnR, messages which could in turn be relayed to the circadian clock within the raphé-SCN nervous pathway.

Discussion

I. Organisation régionale des neurones 5-HT au sein du DR et du MnR

Le DR et le MnR sont les plus volumineux des noyaux du raphé (Morin & Wood, 2001) ; chez les mammifères, ils présentent une organisation structurelle complexe et sont divisés en différentes régions et sous-régions. Chez le hamster doré, l'organisation du système sérotoninergique du DR et du MnR n'avait jamais été analysée en détail. Pour aborder la problématique de l'influence de la photopériode sur le système sérotoninergique, nous avons donc commencé par l'étude de la distribution des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR à différents niveaux anatomiques dans toute leur extension caudo-rostrale, à la fois en PL et en PC.

Le long de l'axe postéro-antérieur

Chez toutes les espèces mammifères étudiées, DR et MnR sont divisés en différentes régions sur le plan caudo-rostral. Cette régionalisation est justifiée par plusieurs arguments : morphologiques (Tork, 1990; Bjarkam *et al.*, 1997; Abrams *et al.*, 2004) ; anatomiques (Azmitia & Segal, 1978; Kohler & Steinbusch, 1982; Vertes & Crane, 1997) ; fonctionnels, toutes les régions ne répondent pas de la même manière à un stimulus donné comme le stress ou l'activité physique prolongée (Greenwood *et al.*, 2005; Staub *et al.*, 2005; Staub *et al.*, 2006).

Grâce à une analyse immunocytochimique niveau à niveau de la disposition des cellules 5-HT et des neurones TPH dans toute l'extension caudo-rostrale du DR, nous avons déterminé chez le hamster doré trois régions présentant des différences morphologiques marquées, une caudale (DRc), une intermédiaire (DRm) et une rostrale (DRr).

La régionalisation du DR chez le hamster doré trouve un support anatomique dans la littérature, l'analyse des projections sérotoninergiques du DR vers les IGL et la glande pinéale profonde suggère l'existence d'une séparation anatomique caudal/rostral. Les corps cellulaires des neurones projetant vers les IGL sont en effet localisés en majorité dans la partie rostrale du DR (Meyer-Bernstein & Morin, 1996), tandis que ceux projetant vers la glande pinéale sont localisés dans la partie caudale (Leander *et al.*, 1998).

Plus récemment, Cooper *et al.* (2009) ont analysé l'effet d'un stress comportemental de défaite sociale sur l'activation des cellules 5-HT dans le DR. Les auteurs ont mesuré chez les

hamsters vaincus une activation spécifique des cellules 5-HT dans la région rostrale du DR, selon un découpage régional dont les limites stéréotaxiques correspondent à celles déterminées dans notre étude.

Pour le MnR, notre analyse morphologique de la disposition des neurones sérotoninergiques a conduit à distinguer précisément une région caudale (MnRc) et une région rostrale (MnRr). Peu de données sont disponibles chez le hamster pour justifier une régionalisation du MnR, ce qui s'explique sans doute par une absence de consensus quant à l'étendue de ce noyau (Botchkina & Morin, 1993; Mintz *et al.*, 2001). Il apparaît tout de même que le MnR puisse être séparé en une région caudale et une région rostrale, car les neurones sérotoninergiques projetant vers les SCN semblent majoritairement se situer dans la région caudale du MnR (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998).

A un même niveau anatomique

Au sein d'une région donnée, plusieurs subdivisions ont été décrites dans le DR chez de nombreuses espèces mammifères. Les mêmes subdivisions (ventrale, dorsale, latérale) sont retrouvées d'une espèce à l'autre, plus ou moins facilement mises en évidence selon la densité et/ou la forme des cellules sérotoninergiques (Baker *et al.*, 1990; Tork, 1990; Bjarkam *et al.*, 1997; Charara & Parent, 1998; Abrams *et al.*, 2004). Ces subdivisions sont également distinguées sur des bases à la fois anatomiques, telles que des afférences et des efférences topographiquement organisées (Peyron *et al.*, 1998; Commons *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003) ou l'expression localisée de neurotransmetteur et de neuropeptides (Smith *et al.*, 1994; Xu & Hokfelt, 1997; Kirby *et al.*, 2000; Valentino *et al.*, 2001) et fonctionnelles, telles que la mise en évidence de populations de neurones 5-HT avec un pattern d'activité électrique spécifique (Rasmussen *et al.*, 1984; Sakai & Crochet, 2000) ou l'activation cellulaire régionalisée suite à l'injection d'un agoniste des récepteurs CRF2 (Staub *et al.*, 2005; Staub *et al.*, 2006).

Chez le hamster doré, Botchkina *et al.* (1993) ont les premiers mentionné la présence de subdivisions dans le DR, sans toutefois les délimiter de façon claire ni caractériser leur évolution le long de l'axe caudo-rostral.

Dans notre étude, en fonction du regroupement et de la forme des cellules 5-HT, quatre subdivisions principales ont été délimitées dans le DRr et le DRm, une ventrolatérale, une dorsomédiane et deux latérales.

Dans deux photopériodes

Il était important de déterminer si la régionalisation et la morphologie des neurones sérotoninergiques étaient affectées par la PC. Aucune différence significative n'est ressortie de la comparaison de la distribution spatiale et de la forme des neurones 5-HT entre PL et PC.

La division anatomique du DR et MnR en régions et sous-régions nous a par la suite servi de base pour l'analyse de l'influence de la photopériode sur le fonctionnement des neurones sérotoninergiques.

II. Fonctionnement photopériodique des neurones sérotoninergiques

Dans la littérature, il est établi que la libération de 5-HT dans les SCN et les IGL du hamster doré est rythmique en PL14:10 (Dudley *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2004). Pour aborder la problématique de l'influence de la photopériode sur le fonctionnement des neurones 5-HT, nous avons donc cherché à répondre à deux questions : 1) La libération journalière de 5-HT est-elle régulée de manière locale, ou est-elle soutenue par un fonctionnement rythmique global des neurones 5-HT, depuis les corps cellulaires jusqu'aux terminaisons ? 2) La photopériode modifie-t-elle le fonctionnement journalier des neurones 5-HT ?

Les deux questions ont été abordées par l'étude sur 24h du métabolisme de la 5-HT dans les SCN et le DR/MnR, et de l'expression de la tryptophane hydroxylase dans le DR/MnR, chez deux groupes de hamsters acclimatés à une PL14:10 et une PC10:14.

1. Photopériode longue

Dans les SCN, la libération de 5-HT est maximale pendant les deux premières heures d'obscurité ; le reste de la nuit, la libération reste soutenue et décroît progressivement jusqu'au niveau des valeurs basales diurnes (Dudley *et al.*, 1998). Ce profil est corrélé au rôle que possède la 5-HT sur l'horloge circadienne : modulation de la synchronisation photique et relais de facteurs non photiques.

Pendant le jour subjectif, certains zeitgeber non photiques, par l'intermédiaire d'une augmentation transitoire de la libération de 5-HT, peuvent décaler la phase de l'horloge (Cutrera *et al.*, 1994; Grossman *et al.*, 2000; Challet & Pevet, 2003). Une telle augmentation de la libération de 5-HT semble exclusivement restreinte à la partie diurne du nyctémère (Dudley *et al.*, 1998). **La libération basale de 5-HT pendant le jour subjectif faciliterait donc la synchronisation de l'horloge par certains facteurs non photiques.**

Pendant la nuit subjective, la 5-HT inhibe les déphasages induits par la lumière (Morin, 1999), aussi bien en début qu'en fin de nuit subjective. Or, l'amplitude des déphasages induits par des stimuli lumineux est faible en début de nuit, lorsque la libération de 5-HT est maximale, et augmente lorsque la libération de 5-HT est moins intense. En d'autres termes, **la libération nocturne de 5-HT régulerait l'intensité de la synchronisation de l'horloge par la lumière au cours de la nuit.** Cette hypothèse est confortée par le fait que la destruction de l'innervation sérotoninergique des SCN, augmente l'amplitude des retards de phase induits

par la lumière en début de nuit subjective, précisément lorsque la libération de 5-HT est maximale chez les animaux contrôles (Morin & Blanchard, 1991).

Nous avons cherché à déterminer si l'aspect rythmique de la libération de 5-HT dans les SCN était supporté par des variations journalières du métabolisme du neurotransmetteur, non seulement au niveau des terminaisons des SCN, mais aussi dans les corps cellulaires des neurones 5-HT du DR et du MnR.

Ratio journalier 5-HT/5-HIAA dans les SCN

Nos travaux montrent l'existence de variations journalières du contenu global en 5-HT et 5-HIAA des SCN. Ceci avait déjà été décrit pour la 5-HT (Ozaki *et al.*, 1993) mais pas pour le 5-HIAA. Les seules concentrations en 5-HT ne nous renseignent pas directement sur l'évolution journalière du métabolisme du neurotransmetteur. En effet, le contenu intra et extraneuronal de 5-HT dépend non seulement de sa synthèse, limitée par les niveaux et l'activité de TPH, mais aussi de sa dégradation en 5-HIAA par les MAO-A mitochondriales, après libération puis recapture par les transporteurs SERT. On évalue donc généralement le métabolisme de la sérotonine en rapportant les concentrations de 5-HT à celles de 5-HIAA.

Dans les SCN, le rapport 5-HT/5-HIAA présente des variations significatives sur 24h, dont les valeurs les plus hautes se situent en fin de nuit et les plus basses en fin de jour. **L'augmentation du ratio 5-HT/5-HIAA pendant la nuit vient donc compenser la libération nocturne de 5-HT.**

Deux hypothèses peuvent expliquer l'augmentation nocturne du rapport 5-HT/5-HIAA : un anabolisme accru (par une augmentation des taux et/ou de l'activité de la TPH), et un catabolisme diminué (par une diminution des taux et/ou de l'activité de la MAO-A).

La TPH est transportée depuis les somas vers les terminaisons axonales des neurones sérotoninergiques (Meek & Neff, 1972) pour une synthèse locale de 5-HT. Chez le rat, les taux de TPH dans les SCN sont variables sur 24h (Barassin *et al.*, 2002), avec un pic en fin de jour qui anticipe l'augmentation du contenu en 5-HT des SCN (Cuesta *et al.*, 2009) et la libération du neurotransmetteur (Barassin *et al.*, 2002). L'activité de l'enzyme est également rythmique dans les SCN, maximale pendant la nuit (Poncet *et al.*, 1993), concourant certainement à l'augmentation nocturne du ratio 5-HT/5-HIAA. Quant à la MAO-A, son activité enzymatique est minimale pendant la nuit et maximale pendant le jour dans les SCN

(Kamase, 1980), ce qui aurait pour effet de diminuer le ratio 5-HT/5-HIAA pendant le jour. **Le ratio journalier 5-HT/5-HIAA suivrait ainsi le profil de libération de la 5-HT dans les SCN par une synthèse accrue pendant la nuit et décréue pendant le jour.** Toutes ces données sont connues chez le rat, et doivent être établies chez le hamster doré pour confirmer la corrélation entre la libération rythmique de 5-HT et le ratio journalier 5-HT/5-HIAA de notre étude.

Ces variations journalières du rapport 5-HT/5-HIAA dans les SCN sont-elles supportées par des variations journalières du métabolisme de la 5-HT au niveau des corps cellulaires des neurones sérotoninergiques ? Cette question a été abordée non seulement par la mesure du ratio 5-HT/5-HIAA, mais aussi par la quantification des niveaux journaliers de TPH et de l'ARNm-*tph2* dans le DR/MnR.

Ratio 5-HT/5-HIAA dans le DR et le MnR

Le ratio 5-HT/5-HIAA présente des variations journalières significatives dans le DRc et le MnRr, mais pas dans le DRr ni le MnRc. On peut tirer de ce résultat deux informations importantes : 1) Les variations du métabolisme de la 5-HT dans les corps cellulaires pourraient soutenir une régulation rythmique du contenu en 5-HT des régions de terminaison par un transport axonal du neurotransmetteur, et 2) Il y a une régionalisation marquée de la régulation journalière du métabolisme de la 5-HT au niveau du DR/MnR, ce qui suggère que les cibles de projection sont susceptibles d'être régulées de manière différentielle sur 24h.

L'existence d'une distribution régionalisée d'un rythme de 5-HT par le DR/MnR trouve un support dans la littérature. Des variations journalières du contenu en 5-HT ont été décrites dans de nombreuses structures et régions de l'encéphale innervées par le DR et le MnR : SCN (présente étude), PVN, aire préoptique médiane, noyau géniculé latéral ventral, hypothalamus (Ozaki *et al.*, 1993), hypothalamus médiobasal et hypothalamus antérieur (Ferraro & Steger, 1990). Certaines de ces régions sont spécifiquement innervées par le DR ou le MnR, par exemple les SCN par le MnR, ou le noyau géniculé latéral ventral par le DR (Morin & Meyer-Bernstein, 1999). De plus, certaines efférences sérotoninergiques du DR et du MnR partent de régions spécifiques au sein de chaque noyau ; par exemple les SCN sont innervés par le MnR caudal, les IGL par le DR rostral (Meyer-Bernstein & Morin, 1996). **La modulation**

régionale du métabolisme journalier de 5-HT est donc corrélée à une organisation régionalisée des efférences sérotoninergiques du DR et du MnR.

Concernant les SCN, il a été décrit que l'innervation sérotoninergique de ces noyaux provenait d'une faible population de neurones situés majoritairement dans la partie caudale du MnR (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Leander *et al.*, 1998). Pourtant, les variations journalières du ratio 5-HT/5-HIAA ne sont pas significatives dans le MnRc alors qu'elles le sont dans les SCN. L'absence apparente de lien rythmique entre les deux paramètres pourrait s'expliquer par la distinction d'une **sous-population de cellules sérotoninergiques à l'intérieur du MnRc** et dans la région limitrophe caudale/rostrale. La présence de cellules sérotoninergiques projetant vers les SCN a en effet été détectée à la fois dans la partie caudale et au niveau de la décussation des pédoncules cérébelleux supérieurs (Meyer-Bernstein & Morin, 1996), qui marque la limite entre MnRc et MnRr dans notre étude. De plus, ces cellules semblent disposées en majorité en position ventrale (Meyer-Bernstein & Morin, 1996), ce qui impliquerait l'existence d'une subdivision supplémentaire du MnR. L'existence d'une régionalisation morphologique dorsale/ventrale du MnR a déjà été évoquée chez le rat (Kohler & Steinbusch, 1982) et chez l'Homme (Baker *et al.*, 1991) mais n'a jamais été étudiée plus avant. Pour confirmer le lien entre les profils journaliers 5-HT/5-HIAA des SCN et du MnR, une analyse régionale du MnR à la lumière des travaux de Meyer-Bernstein & Morin (1996) s'impose.

TPH, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT

Les niveaux d'expression de la TPH sont un facteur limitant la synthèse du neurotransmetteur, susceptible de moduler les variations journalières du métabolisme de la 5-HT. Les variations journalières des concentrations de TPH mesurées dans les mêmes régions où le ratio 5-HT/5-HIAA fluctue sur 24h confirme que **l'enzyme est un paramètre critique au fonctionnement rythmique des neurones 5-HT**. Les valeurs de 5-HT/5-HIAA et les niveaux de TPH sont les plus hauts pendant la phase nocturne du nyctémère. Cependant, les deux profils ne sont pas superposables, par exemple dans le MnRr l'augmentation du ratio 5-HT/5-HIAA précède l'augmentation des niveaux de protéine TPH. L'augmentation de TPH entretiendrait donc plutôt qu'elle n'initierait un métabolisme élevé de 5-HT. Ce qui veut dire que d'autres acteurs entrent certainement en jeu dans la régulation du métabolisme journalier de la 5-HT.

De nombreux paramètres peuvent moduler les profils journaliers 5-HT/5-HIAA, tels que l'activité de la TPH, la libération et la recapture de 5-HT, l'activité des enzymes de dégradation... Peu de travaux sont disponibles chez le hamster doré, mais chez le rat les données fourmillent : des variations journalières de la densité en transporteur SERT ont été mesurées dans de nombreuses régions de l'encéphale incluant l'hypothalamus (Wirz-Justice *et al.*, 1983; Kraeuchi *et al.*, 1986), les SCN (Wirz-Justice *et al.*, 1983; Kraeuchi *et al.*, 1986; Krajnak *et al.*, 2003), les PVT (Krajnak *et al.*, 2003) et le DR et MnR (Kraeuchi *et al.*, 1986) ; toutes ces études montrent une augmentation de la densité en SERT pendant la nuit ; *in vitro*, la recapture de 5-HT mesurée dans des synaptosomes hypothalamiques et de la région des SCN confirme le caractère journalier du taux de recapture du neurotransmetteur (Meyer & Quay, 1976). Quant à la libération du neurotransmetteur, il est établi qu'elle est maximale pendant la nuit à la fois chez le rat (Barassin *et al.*, 2002) et chez le hamster doré (Dudley *et al.*, 1998). L'activité de la TPH est également variable sur 24h chez le rat, maximale en fin de nuit dans la région des noyaux du raphé (DiRaddo & Kellogg, 1975; Kan *et al.*, 1975; Natali *et al.*, 1980; Cahill & Ehret, 1981; Sinei & Redfern, 1993; 1994). L'expression de la MAO-A dans le striatum est rythmique et sous contrôle de gènes horloge (Hampp *et al.*, 2008) ; son activité est rythmique dans le striatum (Hampp *et al.*, 2008), les SCN (Kamase, 1980) et de nombreuses régions de l'encéphale dont le cortex cérébral, l'hypothalamus et le mésencéphale (Bhaskaran & Radha, 1984) ; l'activité est maximale pendant le jour, ce qui pourrait contribuer à un catabolisme accru et le maintien d'un ratio 5-HT/5-HIAA bas pendant le jour. En résumé, **les niveaux journaliers de TPH et tous les éléments précités concourent à une activité accrue des neurones sérotoninergiques pendant la nuit**, et donc à une modulation fine dans le temps du rapport 5-HT/5-HIAA.

ARNm-*tph2*

Enfin, nos résultats démontrent que les variations journalières de TPH sont elles-mêmes corrélées à une expression rythmique du gène *tph2*. En effet, **les niveaux d'ARNm-*tph2* fluctuent sur 24h dans toutes les régions où la protéine TPH et le ratio 5-HT/5-HIAA sont rythmiques.**

La corrélation n'est pas vérifiée dans le DRr : des variations d'ARNm-*tph2* y sont mesurées, mais pas de TPH ni de 5-HT/5-HIAA. L'absence de variation journalière de TPH dans le DRr pourrait résulter du fait que la structure a été analysée dans sa globalité : la quantification de

la protéine par western-blot après microdissection ne nous a pas permis de détecter d'éventuelles fluctuations journalières de TPH au sein de subdivisions particulières.

Malek *et al.* (2004) ont montré chez le rat que les variations des concentrations de protéine TPH n'étaient rythmiques que dans les subdivisions latérales du DR, alors que l'ARNm-*tph2* était rythmique dans chacune des trois subdivisions du DR (VM, DM et Lat). Il avait été avancé que la restriction de la rythmicité TPH dans les Lat pouvait être corrélée à une innervation privilégiée des IGL par cette subdivision (Pasquier & Villar, 1982; Villar *et al.*, 1988), d'autant plus que des variations journalières de la protéine TPH avaient pu être également mesurées dans les terminaisons sérotoninergiques des IGL (Malek *et al.*, 2004).

La technique d'hybridation *in situ* nous a permis une quantification subrégionale des niveaux d'ARNm-*tph2*. L'analyse a mis en évidence un profil journalier dans le VM différent de celui des autres subdivisions, la différence principale étant des valeurs plus élevées dans la seconde moitié de la période obscure dans le VM. S'appuyant sur cette particularité, on pourrait envisager que des régulations traductionnelles et post-traductionnelles spécifiques existent entre les trois subdivisions VM, DM et Lat, et soient à l'origine d'une régionalisation de l'expression journalière des taux de protéine TPH.

Malgré le fait que protéine et ARNm expriment des variations journalières, leurs profils d'expression ne suivent pas le décours temporel classiquement décrit entre le messenger d'un gène et la protéine traduite. Par exemple, dans le DRc l'augmentation des niveaux de la protéine précède de quelques heures l'augmentation des niveaux d'ARNm. Dans le MnRr, les profils de l'ARNm et de la protéine sont en phase, sans décalage correspondant au temps de traduction. De telles relations de phase entre les profils rythmiques d'ARNm et de protéine ont déjà été mesurées, par exemple pour certains gènes horloge de la glande pinéale de souris (Karolczak *et al.*, 2004) ; elles pourraient s'expliquer par des facteurs tels que la demi-vie, la stabilité ou la dégradation de l'ARNm et de la protéine.

En résumé, l'expression de *tph2*, de la protéine TPH et le ratio 5-HT/5-HIAA sont variables sur 24h chez le hamster doré en PL. Les variations journalières de ces paramètres (et d'autres qui restent à mesurer) concourent à un fonctionnement rythmique des neurones sérotoninergiques, dont l'aboutissement serait une libération rythmique de 5-HT dans les régions de terminaison, comme les SCN.

2. Photopériode courte

En PC 10:14, la synchronisation de l'horloge circadienne par la lumière est profondément modifiée. Précisément, les déphasages induits par un stimulus photique sont grandement augmentés en amplitude par rapport à ceux provoqués en PL avec le même stimulus (Pittendrigh *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 2004; vanderLeest *et al.*, 2009). Connaissant le rôle inhibiteur de la 5-HT sur la synchronisation photique de l'horloge, nous avons cherché à savoir si la photopériode courte induisait des modifications critiques du fonctionnement des neurones sérotoninergiques en quantifiant les mêmes paramètres que ceux précédemment étudiés en PL.

Ratio 5-HT/5-HIAA dans les SCN

Dans les SCN, aucune différence dans le contenu journalier moyen en 5-HT et 5-HIAA n'a été mesurée entre PC et PL. Par contre, les variations journalières du ratio 5-HT/5-HIAA sont abolies en PC. De plus, les valeurs nocturnes du ratio en PC sont inférieures à celles mesurées en PL. Il apparaît donc que **le métabolisme de la 5-HT dans les SCN est constant en PC, et à un niveau correspondant aux valeurs basales diurnes de PL.**

Il reste à déterminer si la libération de 5-HT en PC suit la même évolution, ce qui n'est connu chez aucune espèce. Néanmoins, plusieurs études supportent l'hypothèse d'une modification du profil nocturne de libération de 5-HT en PC : chez la souris, l'augmentation de l'amplitude des déphasages est particulièrement marquée en début de nuit subjective, précisément lorsque la libération de 5-HT est maximale en PL (vanderLeest *et al.*, 2009). Or, une courbe de réponse de phase similaire à celle mesurée en PC est obtenue chez le hamster doré dont les fibres sérotoninergiques ont été spécifiquement détruites, une telle lésion induisant une potentialisation des retards de phase induits par la lumière en début de nuit subjective (Morin & Blanchard, 1991). Ainsi, **l'augmentation de la sensibilité des SCN à la lumière en PC pourrait être due à une diminution nocturne de la libération de 5-HT, particulièrement en début de nuit.**

Dans le DR et le MnR

Chez le hamster, le système sérotoninergique du DR et du MnR est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques et comportementales dont l'expression rythmique est modulée par la photopériode. Par exemple, la 5-HT contribue à la

régulation de la sécrétion d'hormones telles que la prolactine (Freeman *et al.*, 2000; Jorgensen, 2007) et la LH (Vitale & Chiochio, 1993; Jorgensen, 2007), dont la sécrétion est inhibée en PC. Le neurotransmetteur peut activer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) pour stimuler la synthèse et la libération des glucocorticoïdes (Liposits *et al.*, 1987; Fuller, 1992; Bagdy & Makara, 1994; Fuller, 1996; Jorgensen, 2007), dont la sécrétion rythmique est également affectée en PC. Le comportement de prise alimentaire et le métabolisme lipidique sont également modulés à la fois par la 5-HT et la photopériode (Wade, 1983; Canguilhem *et al.*, 1988; Simansky, 1996; Schuhler *et al.*, 2005). La modulation photopériodique des fonctions et comportements photopériodiques devrait donc être sous-tendue par une modulation photopériodique du fonctionnement des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR.

La PC induit une diminution des concentrations de 5-HT et 5-HIAA dans le MnRr, ce qui est corrélé à une diminution des concentrations de TPH et d'ARNm-*tph2* dans la même région. Dans l'ensemble du DRr, les concentrations en 5-HT, 5-HIAA et TPH ne sont pas significativement modifiées en PC. Par contre, des différences photopériodiques des niveaux d'ARNm-*tph2* sont mesurées dans les subdivisions Lat et VM, ce qui confirme que la régulation des neurones 5-HT du DR est fortement régionalisée. Il reste à caractériser les cibles de projection privilégiées de chaque région et sous-région du DR et du MnR, de façon à corréler les changements photopériodiques survenant dans les corps cellulaires et dans les terminaisons des neurones 5-HT.

Concernant les SCN, l'abolition du rythme journalier du ratio 5-HT/5-HIAA est corrélée à une abolition des variations journalières de tous les paramètres sérotoninergiques étudiés dans les différentes régions et sous-régions du DR et du MnR : ARNm-*tph2*, protéine TPH et ratio 5-HT/5-HIAA. L'abolition d'un métabolisme rythmique en PC au niveau des SCN pourrait donc en partie résulter des changements photopériodiques survenant en amont, au niveau des corps cellulaires. En ce cas, **le système sérotoninergique du DR/MnR distribuerait de façon générale des messages photopériodiques non seulement aux SCN mais aussi à de nombreuses régions de l'encéphale.**

Le DRc, qui exprime des variations journalières d'ARNm-*tph2* très marquées, mais dont le profil est tout de même différent de celui mesuré en PL, fait exception. Cette région semble donc être influencée de manière particulière par la photopériode. Chez le rat, le DRc projette de manière préférentielle vers le noyau accumbens et le cortex préfrontal (Van Bockstaele *et*

al., 1993), deux régions impliquées dans la réponse au stress. De plus, les neurones sérotoninergiques de la région DRc sont spécifiquement activés par injection d'un agoniste des récepteurs CRF2 (Staub *et al.*, 2005; Staub *et al.*, 2006), ce qui confirme la sensibilité de cette région au stress. Chez le hamster, une étude récente a montré que les cellules 5-HT du DRc n'étaient pas activées par un stress de défaite sociale (Cooper *et al.*, 2009). La fonction spécifique de cette région du DR, de même que la signification du maintien de la rythmicité de l'expression de *tph2* en PC, sont donc pour l'instant inconnus chez le hamster doré.

Il faut noter que bien que l'expression de *tph2* soit rythmique dans le DRc, ni la protéine TPH ni le ratio 5-HT/5-HIAA ne présentent de variation journalière significative. Cela pourrait s'expliquer par l'existence d'une sous-régionalisation de cette partie du DR. Chez le rat, une division du DRc en une partie dorsale et une partie ventrale a déjà été justifiée (Staub *et al.*, 2005; Staub *et al.*, 2006). Une quantification séparée dorsal/ventral chez le hamster pourrait peut-être faire ressortir la présence de variations journalières de TPH et de 5-HT/5-HIAA.

Chez l'Homme

Chez les patients souffrant de dépression saisonnière (SAD, Seasonal Affective Disorder), la venue des saisons automne/hiver déclenche des symptômes tels que troubles alimentaires (bulimia nervosa), hypersomnie, fatigue chronique et troubles de l'humeur (Rosenthal *et al.*, 1984). Chez certains patients SAD, ces désordres sont liés à une désynchronisation des rythmes biologiques entre eux et par rapport à l'environnement (Lewy & Sack, 1988). Les symptômes sont alors traités par un stimulus photique à des moments critiques de la journée de manière à resynchroniser l'horloge circadienne (Lewy *et al.*, 1985; Lewy *et al.*, 1987). La désynchronisation, les troubles de l'humeur et de l'alimentation des patients SAD impliquent certainement une modification du fonctionnement du système sérotoninergique, car tous ces symptômes sont soulagés par un traitement aux antidépresseurs inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine (Ruhrmann *et al.*, 1998; Thorell *et al.*, 1999; Moscovitch *et al.*, 2004; Pjrek *et al.*, 2009). Ainsi chez l'Homme, comme chez le hamster doré, le système sérotoninergique apparaît comme un relais majeur de l'information photopériodique.

En résumé la synthèse et la libération rythmique de 5-HT en PL concourent à distribuer un message nyctéméral aux structures du système circadien, ce qui se traduit dans les SCN par une régulation journalière de la synchronisation photique et non photique.

L'hypothèse de la transmission du message nyctéméral à des structures de l'encéphale hors du système circadien reste à confirmer.

En PC, les différents paramètres sérotoninergiques mesurés perdent leur caractère rythmique, ce qui laisse supposer que le fonctionnement journalier des neurones 5-HT est profondément modifié. Une altération de la libération de 5-HT pourrait être à l'origine de la potentialisation des déphasages photiques constatée chez les animaux en PC. Le système sérotoninergique du DR et MnR apparaîtrait alors comme une structure capable de relayer des messages photopériodiques à l'ensemble de l'encéphale.

III. Régulation endocrinienne de l'expression journalière et photopériodique de *tph2*

L'expression journalière du gène *tph2* en PL est un pilier des variations rythmiques du métabolisme de la 5-HT. En PC, l'abolition des variations d'ARNm-*tph2* s'accompagne de l'abolition du caractère rythmique d'autres paramètres de la synthèse de 5-HT.

Ces faits mènent à deux questions complémentaires : quelle est l'origine des variations journalières de l'expression de *tph2* en PL, et par quel biais sont-elles abolies en PC ?

Nous montrons dans le présent travail de thèse que **les variations journalières des taux d'ARNm-*tph2* chez le hamster doré dépendent d'au moins deux classes de médiateurs endocriniens, les glucocorticoïdes et les stéroïdes sexuels, dont la sécrétion rythmique en PL est fortement modifiée en PC.** Cortisol, corticostérone et testostérone sont tous trois impliqués dans la régulation journalière de l'expression de *tph2*. Cependant, les trois hormones modulent de façon réciproque leur propre sécrétion, ce qui rend le rôle exact de chacune dans la régulation de l'expression de *tph2* difficile à appréhender. C'est pourquoi, dans un premier temps, sera abordée la question des interactions entre l'axe surrénalien (HPA) et l'axe gonadique (HPG).

1. Modulation réciproque de la sécrétion de glucocorticoïdes et de testostérone

Modulation du rythme de testostérone par le rythme de glucocorticoïdes

Chez le rat, l'effet inhibiteur du stress et des glucocorticoïdes sur la sécrétion de testostérone est bien établi dans la littérature (Feek *et al.*, 1989; Orr & Mann, 1992; Monder *et al.*, 1994; Calogero *et al.*, 1999). Des taux élevés de corticostérone lors de stress chroniques tels qu'immobilisation (Orr & Mann, 1992) ou défaite sociale (Monder *et al.*, 1994) sont associés à une diminution des taux plasmatiques de testostérone, et cette diminution peut être partiellement contrée par injection de RU486, un antagoniste des GR, avant exposition au stimulus stressant (Orr & Mann, 1992). L'action des glucocorticoïdes semble dirigée sur plusieurs niveaux de l'axe HPG : inhibition directe de la production de testostérone par les cellules de Leydig (Hu *et al.*, 2008), inhibition de la libération de LH par l'hypophyse

antérieure (Feek *et al.*, 1989), inhibition de la libération de GnRH dans l'hypothalamus (Calogero *et al.*, 1999).

Chez le hamster doré, les glucocorticoïdes sont également inhibiteurs de l'axe HPG. L'injection de cortisol induit une diminution de la masse des testicules (Teodoru & Shwartzman, 1954), des vésicules séminales (Joshi *et al.*, 1985), des taux plasmatiques de LH (Joshi *et al.*, 1985), tandis que l'immobilisation chronique selon un protocole qui augmente spécifiquement les taux plasmatiques de cortisol induit une diminution des taux plasmatiques de testostérone (Tsuchiya & Horii, 1995b; a; 1996).

Dans notre étude, l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes s'est avéré restreint à une courte fenêtre temporelle. Précisément, la suppression du pic de glucocorticoïdes des temps ZT11 et ZT13 chez les hamsters ADX augmente la sécrétion de testostérone à ces mêmes points horaires, et seulement à ces points horaires. En conséquence, le profil rythmique de testostérone des hamsters ADX devient biphasique, caractérisé par des valeurs maximales à chacune des transitions lumineuses. Il semble donc que **le profil du rythme journalier de sécrétion des glucocorticoïdes module le rythme journalier de testostérone**. Plusieurs données dans la littérature confirment cette hypothèse, chez le rat comme chez le hamster. Chez le rat, si le fait que les concentrations plasmatiques de testostérone sont variables sur 24h est bien établi, il existe cependant une grande variabilité dans les profils décrits d'une étude à l'autre. Les profils journaliers sont soit unimodaux (Kinson & Liu, 1973; Wilson *et al.*, 1976; Kalra & Kalra, 1977; Simpkins *et al.*, 1981; Miller & Riegle, 1982), soit bimodaux (Keating & Tcholakian, 1979; Poland *et al.*, 1980; Waite *et al.*, 2009), voire trimodaux (Mock *et al.*, 1978). Cette variabilité chez une même espèce pourrait s'expliquer par le fait que le rythme de testostérone est modulé par un facteur indépendant de l'axe gonadique. Ce facteur pourrait être la corticostérone, car l'administration d'un glucocorticoïde de synthèse, le méthylprednisolone, dans l'eau de boisson des animaux supprime le caractère bimodal du rythme de testostérone (Waite *et al.*, 2009).

Chez le hamster doré, le stress est un facteur qui semble moduler le rythme de sécrétion de testostérone. Tsuchiya & Horii (1995a) ont décrit chez des hamsters dorés en 12:12 un rythme de testostérone similaire à celui de nos hamsters intacts, avec des valeurs maximales en fin de nuit. Les auteurs montrent que ce pic nocturne est supprimé par une exposition chronique à un stress d'immobilisation (Tsuchiya & Horii, 1995a).

Dans une autre étude, Ottenweller *et al.* (1987) ont décrit chez le hamster doré en PL 14:10 des variations journalières des taux plasmatiques de testostérone de type biphasique, avec un pic à chaque transition, profil similaire à celui des hamsters ADX de notre étude. De manière intéressante, les rythmes de cortisol et de corticostérone des hamsters de l'étude d'Ottenweller *et al.* montraient une amplitude singulièrement faible (valeurs basales vs valeurs du pic : x 5 pour cortisol, x 2 pour corticostérone) par rapport aux hamsters de la présente étude (x 10 pour cortisol, x 4 pour corticostérone). Un différentiel faible entre les valeurs basales et les valeurs de pic de glucocorticoïdes pourrait donc n'avoir qu'une incidence inhibitrice faible sur la sécrétion de testostérone, et pourrait expliquer le pic supplémentaire de l'étude d'Ottenweller *et al.* à la transition jour/nuit.

Comme argument final, chez les hamsters surrénalectomisés de notre étude, l'augmentation des concentrations plasmatiques de testostérone à la transition jour-nuit est supprimée après restauration du pic de glucocorticoïdes. **Une augmentation transitoire des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes serait ainsi en mesure d'inhiber de façon concomitante la sécrétion de testostérone.** Cependant, selon cette hypothèse l'augmentation des concentrations de glucocorticoïdes en n'importe quel point du nyctémère serait susceptible de provoquer une baisse des niveaux plasmatiques de testostérone. Pourtant, chez les hamsters sham, les concentrations de cortisol augmentent précocement en début de jour sans que le profil de testostérone n'en soit affecté. Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat : 1) le cortisol n'est pas le glucocorticoïde prépondérant dans l'inhibition de la sécrétion de testostérone, hypothèse qui va à l'encontre des données de la littérature, ou bien 2) l'inhibition de l'axe HPG par les glucocorticoïdes n'est possible que dans des fenêtres temporelles bien précises du nyctémère.

Modulation de l'activité de l'axe HPA par les taux circulants de testostérone

Chez le rat, la testostérone a un effet inhibiteur sur l'activité de l'axe HPA. Après castration, la sécrétion journalière de corticostérone augmente ; de plus, la sécrétion de corticostérone induite par un stress auditif ou l'injection de lipopolysaccharide est potentialisée chez les castrés par rapport à des témoins non castrés ; ces effets sont inversés par implantation de capsules de testostérone (Seale *et al.*, 2004a; Seale *et al.*, 2004b). Inversement, la diffusion de concentrations élevées de testostérone inhibe la sécrétion d'ACTH et de corticostérone, à la

fois en condition basale et après un stress de contention (Viau & Meaney, 1996; Viau *et al.*, 1999; McCormick *et al.*, 2002; Viau & Meaney, 2004).

Chez le hamster doré, une étude montre que l'effet de la testostérone sur la sécrétion de glucocorticoïdes est inverse de celui mesuré chez le rat. Après castration, l'amplitude du rythme de corticostérone et de cortisol diminue, un effet particulièrement marqué pour la corticostérone (Pieper & Loboeki, 2000). Les niveaux sont normalisés après implantation d'une capsule de testostérone, ce qui suggère que cette hormone potentialise le pic de glucocorticoïdes.

Dans notre étude, nous n'avons pas constaté d'effet aussi marqué chez nos hamsters castrés, la diminution des taux plasmatiques de corticostérone et de cortisol à ZT10 n'étant pas significative. Notre protocole ne permet cependant pas d'être catégorique quant à l'absence d'effet de la castration : aux trois points horaires étudiés, les variations des concentrations plasmatiques de cortisol perdent leur significativité après orchidectomie. La question de l'influence de la testostérone sur l'axe HPA mérite donc d'être approfondie chez le hamster doré.

2. Régulation différentielle de l'expression de *tph2* en photopériode longue et courte

Nos résultats montrent l'implication des glucocorticoïdes et de la testostérone dans la régulation de l'expression journalière de *tph2*, deux hormones dont la sécrétion rythmique en PL est modifiée par la PC.

a) Rythme de glucocorticoïdes et variations journalières d'ARNm-*tph2*

Notre protocole visait à supprimer le facteur démontré critique chez le rat pour l'établissement des variations journalières de l'expression de *tph2* : le pic de glucocorticoïdes. Ce faisant, la suppression du pic de glucocorticoïdes par surrénalectomie et implantation de gélules de glucocorticoïdes chez le hamster conduit à un statut hormonal relativement comparable à celui des hamsters en PC, c'est-à-dire des taux plasmatiques diurnes constants de cortisol et

de corticostérone. Ce statut a été qualifié selon l'anglicisme « PC-like ». Ainsi, **une telle modulation expérimentale du statut hormonal supprime un éventuel message nyctéméral et établit un message de type photopériode courte.**

Régulation des variations journalières d'ARNm-*tph2*

La suppression du pic de glucocorticoïdes en PL abolit les variations journalières de l'expression de *tph2*, tandis que la restauration artificielle du pic de glucocorticoïdes les rétablit. De ces seuls résultats, on peut établir deux conclusions : le rythme de glucocorticoïdes est nécessaire à l'établissement des variations journalières de l'expression de *tph2*, et l'abolition PC-like du rythme de glucocorticoïdes induit des modifications de l'expression journalière de *tph2* similaires à celles mesurées en PC. En d'autres termes, les glucocorticoïdes transmettraient un message à la fois nyctéméral et photopériodique au DR et MnR. **En PL, le rythme de glucocorticoïdes serait le message nyctéméral prépondérant**, car sa suppression abolit les variations d'expression de *tph2*. **En PC, la forte atténuation du pic de cortisol et l'abolition du rythme de corticostérone induirait la perte de la transmission de l'information nyctémérale aux neurones sérotoninergiques**, et l'abolition des variations journalières de l'expression de *tph2*. Ceci reste à confirmer chez des hamsters en PC ; selon cette hypothèse, l'instauration d'un pic de glucocorticoïdes chez des hamsters acclimatés à la PC serait suffisante pour établir *de novo* des variations journalières d'ARNm-*tph2* similaires à celles mesurées en PL.

Quelle est l'influence du rythme de glucocorticoïdes sur l'expression de *tph2* ? Chez le rat, le pic de corticostérone est temporellement concordant avec le pic d'ARNm-*tph2*, ce qui laisse à penser que la corticostérone active l'expression de *tph2*. Chez le hamster doré, le pic de glucocorticoïdes est concomitant avec une diminution des taux d'ARNm-*tph2*, ce qui fait pencher pour l'hypothèse inverse, **les glucocorticoïdes inhibiteurs de la transcription de *tph2***. Le pic de glucocorticoïdes serait le facteur déclencheur de la diminution brutale des taux d'ARNm-*tph2* constatée à ZT13. Selon cette hypothèse, la restauration d'un pic diurne de glucocorticoïdes devrait induire une diminution des taux d'ARNm-*tph2* pendant le jour. L'idée est séduisante, mais la causalité entre les deux phénomènes est loin d'être évidente. La suppression du pic de glucocorticoïdes devrait en effet théoriquement lever l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes et normaliser les taux d'ARNm-*tph2* à un niveau constant correspondant aux taux les plus élevés. C'est ce qui se passe dans le DR chez les hamsters ADX, pour

lesquels les variations journalières sont abolies et les taux moyens sont équivalents à ceux des autres groupes. Ce n'est pas le cas dans le MnR, où la suppression du pic de glucocorticoïdes induit à la fois une abolition des variations journalières et une diminution des taux moyens d'ARNm-*tph2*. Ceci amène à conclure que la régulation de l'expression de *tph2* par les glucocorticoïdes est différente entre le DR et le MnR. L'une des pistes à explorer pour expliquer cette différence serait l'étude de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes sur 24h.

GR et MR

Comment les glucocorticoïdes pourraient-ils réguler l'expression de *tph2* dans le raphé ? Les récepteurs aux glucocorticoïdes, GR et MR, sont capables de trans-activer ou de trans-réprimer la transcription de gènes par l'intermédiaire de séquences GRE situées au niveau des promoteurs. Chez la souris, le rôle de messenger temporel de la corticostérone est dépendant de la présence des GR. Chez des souris témoin, le rythme de corticostérone entraîne le rythme d'expression de *Per2* dans le noyau ovale du noyau du lit de la strie terminale et dans l'amygdale centrale (Segall *et al.*, 2006). De même, chez des souris mutantes n'exprimant pas GR spécifiquement dans les tissus neuronaux, la rythmicité de l'expression de *Per2* est abolie (Segall *et al.*, 2009). Chez le rat, les GR sont exprimés dans les cellules sérotoninergiques du DR et MnR (Malek 2007), mais la présence de séquences GRE en amont du gène *tph2* n'a jusqu'à présent jamais été décrite.

Chez le hamster, il y a un vide bibliographique à ce sujet, l'expression de GR ou de MR dans le raphé n'a jamais été décrite, ce qui laisse la porte ouverte à toutes les hypothèses, dont celle d'une inhibition directe de l'expression du gène *tph2*. Il est peu probable que l'effet transcriptionnel passe par une activation du MR : ce récepteur possède *in vivo* une affinité bien plus grande pour les glucocorticoïdes que le GR (Reul & de Kloet, 1985; Sutanto & De Kloet, 1987; Sutanto *et al.*, 1988a), et il est quasiment activé en permanence, même lorsque les taux circulants de glucocorticoïdes sont au plus bas (Reul *et al.*, 1987; Conway-Campbell *et al.*, 2007). Au contraire, du fait de leur affinité plus faible, les GR sont à même d'être activés de façon rythmique par les variations circadiennes de sécrétion des glucocorticoïdes (Conway-Campbell *et al.*, 2007; Joels *et al.*, 2008).

La question de la différence de régulation de l'expression journalière de *tph2* par les glucocorticoïdes entre DR et MnR n'est pas résolue. Outre une éventuelle expression

différentielle de GR et de MR, d'autres facteurs pourraient moduler soit l'expression de *tph2* directement, soit l'action des glucocorticoïdes sur l'expression de *tph2*. La testostérone est susceptible de faire les deux.

b) Sécrétion de testostérone et rythme d'expression de *tph2*

Nous avons montré que la manipulation expérimentale des taux plasmatiques de glucocorticoïdes induisait des modifications de la sécrétion de testostérone. Dès lors, on ne peut plus rigoureusement distinguer l'effet des glucocorticoïdes d'un effet potentiel de la testostérone sur l'expression journalière de *tph2*, qu'il soit direct ou indirect.

Suite à une suppression des taux circulants de testostérone après castration, la diminution des taux d'ARNm-*tph2* classiquement mesurée à ZT13 chez des hamsters en PL disparaît, aussi bien dans le DR que dans le MnR. Force est de conclure que la testostérone est bien impliquée dans la régulation de l'expression journalière de *tph2*, et que la suppression de sa production en PC pourrait être un signal photopériodique transmis aux neurones 5-HT du DR et MnR.

Contrairement à ce qui a été décrit par Pieper & Loboeki en 2000, la castration n'induit pas de diminution significative des taux de glucocorticoïdes au moment du pic chez les hamsters de notre étude. Par contre, suite à la castration, les variations de cortisol ZT-dépendantes mesurées chez les sham sont supprimées. Au vu de ces résultats, il n'est pas exclu que la testostérone puisse avoir une double influence sur l'expression de *tph2*, directe par une modulation de sa transcription, indirecte par une modulation de la sécrétion des glucocorticoïdes (voire de leur action au niveau des neurones sérotoninergiques).

Action directe sur l'expression de *tph2*

Les stéroïdes sexuels ont été décrits dans la littérature comme capables de moduler le fonctionnement des neurones sérotoninergiques chez différentes espèces de mammifères. Chez le rat, la testostérone augmente l'activité électrique des neurones 5-HT du DR (Robichaud & Debonnel, 2005), tandis que la castration diminue le nombre de cellules exprimant SERT, effet inversé après traitement à la testostérone et à l'œstradiol (McQueen *et al.*, 1999). Chez le macaque rhésus femelle et le cochon d'Inde femelle, un traitement chronique aux œstrogènes augmente l'expression de *tph2* et de TPH dans le DR (Lu *et al.*, 1999; Bethea *et al.*, 2000; Sanchez *et al.*, 2005).

L'action des stéroïdes sexuels passe par l'activation des récepteurs aux androgènes (AR) et aux œstrogènes (ER), qui agissent comme des facteurs de transcription, capables d'activer ou

d'inhiber la transcription de gènes possédant des séquences ARE ou ERE. Chez le hamster doré mâle, la présence d'AR a été mentionnée dans le MnR mais pas dans le DR (Dimeo & Wood, 2006), ce qui constitue une piste pour expliquer la différence de niveaux moyens d'ARNm-*tph2* entre MnR et DR chez les hamsters ADX, chez qui les taux de testostérone sont supérieurs aux contrôles. D'autant que chez les hamsters castrés, qui n'ont plus de testostérone circulante détectable et dont les taux plasmatiques de glucocorticoïdes sont identiques à ceux des animaux sham, on ne mesure plus cette baisse des taux moyens d'ARNm-*tph2* dans le MnR. **Il semble donc que les taux de testostérone soient critiques au niveau d'expression moyen de *tph2***, et ce de façon différentielle entre DR et MnR.

L'hypothèse d'une régulation directe de l'expression journalière de *tph2* n'est pas l'hypothèse la plus simple à justifier lorsque l'on considère les résultats de l'expérience de surrénalectomie. Chez les ADX, il est en effet plus aisé de postuler que c'est l'absence de rythme de glucocorticoïdes qui fait disparaître les variations journalières de *tph2*, plutôt que la modification d'un rythme de testostérone toujours présent. Dans l'expérience de castration, la suppression de testostérone abolit sans équivoque la diminution d'ARNm-*tph2* à ZT13. Seulement on ne peut exclure que la castration n'induit une modification des profils de glucocorticoïdes, par exemple un décalage de phase du rythme de sécrétion, ce qui n'était pas vérifiable dans notre étude incluant seulement trois points horaires. Dans ce cas, ce serait par une modification du rythme de glucocorticoïdes que la suppression de testostérone affecterait l'expression journalière de *tph2*. Cette hypothèse reste à vérifier.

Action indirecte sur la sécrétion et l'action des glucocorticoïdes

L'influence de la testostérone sur l'axe HPA et la libération de corticostérone a déjà été discutée. Chez le hamster doré, la potentialisation de l'amplitude du rythme de glucocorticoïdes par la testostérone (Pieper & Loboeki, 2000) reste à confirmer, vu que nous ne mesurons pas de changement des taux de pic de glucocorticoïdes après castration.

De façon plus générale, la testostérone a été décrite chez le rat comme capable d'influencer l'action des glucocorticoïdes sur leurs cibles de différentes manières. Dans l'hypophyse, la diffusion de taux élevés de testostérone par des implants sous-cutanés diminue les taux de transcortine, la protéine de transport des glucocorticoïdes (Viau & Meaney, 2004). Il en résulte une plus grande disponibilité de corticostérone libre au sein de cette structure. De plus, des taux élevés de testostérone augmentent la translocation nucléaire de corticostérone marquée *in vitro* (Viau & Meaney, 2004), ce qui faciliterait l'action des complexes

corticostérone/récepteurs sur la transcription des gènes cibles. Des niveaux élevés de testostérone modifient également la densité des GR, la diminuent dans l'aire préoptique médiane (Viau & Meaney, 1996) et l'augmentent dans le foie (Viau & Meaney, 2004). **Les taux de testostérone sont donc critiques à l'efficacité de la réponse aux glucocorticoïdes.**

c) Autres pistes à explorer

D'autres médiateurs rythmiques sous contrôle des SCN pourraient être à l'origine, ou simplement moduler, l'expression nyctémérale et photopériodique de *tph2*.

Activité locomotrice

Chez le rat, plusieurs semaines d'activité de roue renforcent l'amplitude des variations journalières de *tph2*, un effet indépendant du rythme de corticostérone puisque l'activité de roue est à elle seule capable de ré-induire des variations d'expression de *tph2* abolies par surrénalectomie (Malek *et al.*, 2007). L'activité de roue soutenue modifie également l'expression des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} dans le DR et MnR (Greenwood *et al.*, 2005), et des récepteurs 5-HT_{1B} dans le cervelet et le cortex frontal (Chennaoui *et al.*, 2001). A court terme, quelques heures d'activité induites par la présence d'une roue provoquent la libération de 5-HT dans les SCN et les IGL chez le hamster doré en PL (Dudley *et al.*, 1998; Grossman *et al.*, 2004). **L'activité locomotrice est donc un facteur capable de modifier l'activité des neurones sérotoninergiques du DR et MnR.**

En PL 14:10, le pic journalier d'activité locomotrice du hamster doré se situe à ZT12-ZT13 (Ellis & Turek, 1979; Evans *et al.*, 2004). L'engagement soudain du comportement locomoteur à la transition jour-nuit correspond parfaitement dans le temps à la diminution brutale des taux d'ARNm-*tph2* à ZT13. On peut donc raisonnablement penser qu'il pourrait exister une causalité entre les deux phénomènes. Plusieurs arguments maintiennent cette hypothèse plausible. Dans l'expérience de surrénalectomie, après suppression du pic de glucocorticoïdes, les variations de l'expression de *tph2* sont abolies, et l'amplitude du rythme de température corporelle est atténuée. Le rythme de température peut nous renseigner sur les profils journaliers d'activité locomotrice, étant donné que les deux rythmes sont bien corrélés en cycle lumière/obscurité (Refinetti, 1997; 1999). La diminution de l'amplitude du rythme de température est essentiellement due à une augmentation des températures de jour, mais on constate également que le pic de température à la transition jour-nuit est moins élevé que celui

des hamsters sham. On pourrait donc supposer que l'activité locomotrice des hamsters ADX soit moins intense à la transition et que le rythme activité/repos soit moins prononcé que chez les animaux contrôles. C'est le cas chez la souris, chez qui une diminution de l'amplitude du rythme de corticostérone est associée à une diminution de l'amplitude du rythme d'activité locomotrice en DD (Son *et al.*, 2008). Une atténuation de l'amplitude du pic d'activité locomotrice pourrait donc expliquer l'abolition des variations journalières d'ARNm-*tph2* après surrénalectomie. Après restauration d'un pic artificiel de glucocorticoïdes, l'amplitude du rythme de température est partiellement rétablie à son niveau initial, ce qui est coïncident avec une restauration de variations d'ARNm-*tph2* significatives mais d'amplitude inférieure à celles des contrôles.

Dans l'expérience de castration, la suppression de testostérone circulante abolit la diminution des taux d'ARNm-*tph2* à ZT13. Dans cette expérience, nous n'avons mesuré ni l'activité locomotrice ni la température corporelle. Cependant, des études chez la souris montrent que la castration induit une perturbation du rythme d'activité locomotrice de roue en DD : allongement de la période, modification de phase, diminution de durée, diminution du pic d'activité, diminution de l'activité totale. Ces effets sont totalement ou partiellement inversés chez des souris implantées avec des capsules de testostérone ou de DHT (Daan *et al.*, 1975; Karatsoreos *et al.*, 2007). Chez le hamster doré, Morin & Cummings (1981) ont montré que la castration induit une fragmentation et une diminution de l'intensité de l'activité locomotrice de roue, effets également inversés par traitement à la testostérone (Morin & Cummings, 1981). En résumé la castration chirurgicale perturbe le rythme activité-repos, ce qui pourrait être à l'origine de la disparition de la chute des taux d'ARNm-*tph2* à ZT13 chez les hamsters GDX.

Comme argument final, notons que le rythme d'activité locomotrice est également modifié en PC, notamment le pic d'activité à la transition jour-nuit est très fortement atténué, pour ne pas dire qu'il est complètement supprimé (Ellis & Turek, 1979; Evans *et al.*, 2004, données personnelles). L'activité locomotrice pourrait donc à la fois induire un rythme journalier d'expression de *tph2* en PL et être à l'origine des modifications photopériodiques de ce rythme en PC. Selon cette hypothèse, une induction transitoire d'activité pendant le jour devrait induire une diminution des taux d'ARNm-*tph2* pendant le jour, autant en PL qu'en PC.

Mélatonine

Il est enfin nécessaire de spéculer autour du rôle de la mélatonine dans l'expression journalière et photopériodique de *tph2*. Une action directe de l'hormone au niveau des noyaux du raphé apparaît peu probable du fait de l'absence de récepteurs mélatoninergiques dans cette région (Masson-Pevet *et al.*, 1994). La mélatonine pourrait cependant être un facteur régulateur indirect nécessaire à l'établissement des variations photopériodiques d'expression de *tph2*, par son rôle démontré ou potentiel dans la régulation photopériodique des axes endocriniens.

La mélatonine intervient en tant que régulateur de l'activité photopériodique de l'axe HPG. La question reste posée de savoir si l'entrée en quiescence de l'axe HPG en PC, provoquée par la mélatonine, est nécessaire à l'abolition des variations journalières d'ARNm-*tph2*. La suppression concomitante de la testostérone circulante et des variations d'expression de *tph2* chez les hamsters GDX suggère que oui, mais l'expérience de surrénalectomie prouve que la présence de testostérone n'empêche pas une abolition expérimentale de l'expression journalière de *tph2*. Le rôle de messenger nyctéméral et photopériodique de la testostérone paraît donc moins évident que celui des glucocorticoïdes.

La mélatonine intervient-elle dans le contrôle photopériodique du rythme de sécrétion des glucocorticoïdes ? La voie de contrôle circadien de la sécrétion des glucocorticoïdes par les SCN est *a priori* indépendante d'un contrôle mélatoninergique (Buijs *et al.*, 1999). L'horloge intègre la photopériode, et transmet le message photopériodique à plusieurs de ses sorties, dont l'AVP, qui voit son pic d'expression diminuer en amplitude et en durée en PC (Tournier *et al.*, 2009). Il a été dit que l'AVP inhibe l'axe HPA *via* le DMH et les PVN, et que sa libération rythmique maximale pendant le jour participe au rythme de sécrétion de corticostérone (Kalsbeek *et al.*, 1996a; Kalsbeek *et al.*, 1996c). Il est donc probable que les SCN contrôlent la sécrétion photopériodique de glucocorticoïdes par l'intermédiaire du rythme photopériodique d'AVP.

Cependant, une influence de la mélatonine sur l'expression photopériodique d'AVP n'est pas à exclure. Chez le hamster sibérien, deux études contradictoires venant de la même équipe ont étudié les conséquences d'une pinéalectomie sur les taux d'ARNm-*AVP* dans les SCN en PL et en PC à un point horaire, montrant tantôt une modulation photopériodique indépendante de la présence de mélatonine (Duncan, 1998), tantôt une absence de variation photopériodique

après pinéalectomie (Freeman *et al.*, 2002). Les auteurs justifient leurs résultats en apparence contradictoires par le choix équivoque du point horaire comparatif entre PL et PC.

De manière plus convaincante, il est établi que chez le rat et le hamster d'Europe, la mélatonine contrôle l'expression photopériodique d'AVP dans de nombreuses structures de l'encéphale par l'intermédiaire des taux circulants de testostérone (de Vries *et al.*, 1984; DeVries *et al.*, 1985; Buijs *et al.*, 1986). Chez le hamster doré, PC et castration induisent une diminution de la densité des récepteurs Avpr1a dans l'hypothalamus (Johnson *et al.*, 1995; Caldwell *et al.*, 2008). Une modulation photopériodique des taux d'AVP par la mélatonine et/ou les stéroïdes sexuels dans les SCN, les PVN et le DMH est de ce fait envisageable. **Mélatonine et stéroïdes sexuels pourraient par ce biais participer au contrôle photopériodique de la sécrétion des glucocorticoïdes.** L'hypothèse est renforcée par le fait que des implants de testostérone chez des hamsters dorés en PC induisent un renforcement de l'amplitude du rythme de sécrétion de cortisol et une réinduction de celui de corticostérone (données personnelles).

En résumé, la régulation de l'expression photopériodique de *tph2* résulte de l'action conjuguée des glucocorticoïdes et de la testostérone sur les neurones sérotoninergiques, les cibles précises de ces hormones restant à déterminer. Le pic de sécrétion des glucocorticoïdes semble être le messager nycthéral prépondérant, et la diminution de son amplitude en PC pourrait être à l'origine de l'abolition des variations journalières d'ARNm-*tph2*. La testostérone semble moduler les niveaux d'expression moyens de *tph2*, effet qui pourrait passer par des interactions avec la sécrétion circadienne des glucocorticoïdes et/ou par une modulation directe de la transcription de *tph2*. Pour finir, deux facteurs supplémentaires seraient susceptibles de participer à la régulation nycthérale et photopériodique de l'expression de *tph2*, l'activité locomotrice et la mélatonine.

Perspectives

1) A la lumière des travaux de la présente thèse, il est bien établi que le fonctionnement des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR est modulé par la photopériode. Une question majeure découle de ce résultat : **le DR et MnR distribuent-ils les messages nycthémeraux et photopériodiques dans et en-dehors du système circadien ?**

Cette question est en fait double, puisqu'elle aborde le versant nycthémera du fonctionnement photopériodique des neurones 5-HT. La méthodologie pour y répondre serait la suivante : étudier à la fois en PL et en PC l'expression journalière de différents paramètres sérotoninergiques au niveau des structures cibles principales du DR et du MnR.

Les paramètres sérotoninergiques

La mesure de la libération journalière de 5-HT est dans l'absolu le premier des paramètres à déterminer pour estimer les variations journalières et photopériodiques de l'action du neurotransmetteur sur ses cibles. La microdialyse *in vivo* est jusqu'à présent la meilleure technique de mesure de la libération du neurotransmetteur, mais la technique est exigeante en terme de temps et de mise au point. La mesure du ratio 5-HT/5-HIAA, ainsi que l'expression des facteurs susceptibles de moduler ce ratio (expression et activité de la TPH, de la MAO-A, expression de SERT) peuvent compléter l'étude de la libération. Enfin, l'étude de l'affinité et de la densité des récepteurs sérotoninergiques pourrait permettre de caractériser plus avant une éventuelle rythmicité dans la réponse des cibles de la 5-HT.

Les cibles

Dans le contexte circadien, les SCN et les IGL seraient bien entendu les premières des structures à étudier. Si le rythme de libération de la 5-HT dans ces structures est connu en PL, il est déterminant de le mesurer en PC pour comprendre les changements photopériodiques de synchronisation de l'horloge circadienne.

Les autres structures à étudier seraient : toutes les régions de l'encéphale impliquées dans la régulation de fonctions et de comportements circadiens et photopériodiques, ce qui équivaut à l'ensemble du cerveau. En particulier, hippocampe, cortex préfrontal et amygdale, structures impliquées chez l'Homme dans la régulation de l'humeur, ont fait l'objet de nombreux travaux dans le cadre de la réponse au stress. Le système sérotoninergique y joue un rôle modulateur important, mais le caractère journalier et photopériodique de sa libération a très peu été étudié.

2) Nous avons clairement démontré que le fonctionnement journalier et photopériodique des neurones 5-HT implique à la fois les glucocorticoïdes et la testostérone, sans toutefois avoir caractérisé le rôle exact de chacune des hormones. **Comment les glucocorticoïdes et la testostérone régulent-ils l'expression journalière et photopériodique de *tph2* ?**

Il est nécessaire d'établir un protocole expérimental grâce auquel l'action de chaque type d'hormone sera spécifiquement distingué, chez un groupe dans lequel les interactions ne sont plus possibles, c'est-à-dire un groupe à la fois castré et surrénalectomisé. Après avoir caractérisé l'effet de la double chirurgie sur l'expression journalière de *tph2*, des traitements hormonaux croisés (implants de cortisol, corticostérone, testostérone de différentes concentrations, injections, hormones dans l'eau de boisson...) pourront permettre de mieux caractériser l'influence de chaque hormone, cortisol, corticostérone et testostérone. Les mêmes expériences pourront être réalisées chez des hamsters en PL et en PC pour répondre au versant photopériodique de la question.

En parallèle, pour savoir si le DR et/ou le MnR sont une cible directe de l'action des glucocorticoïdes et de la testostérone, il sera nécessaire d'étudier l'expression immunocytochimique des différentes classes de récepteurs, GR, MR, AR, ER, et de double-marquer les neurones TPH-positifs, pour détecter une éventuelle expression de récepteurs stéroïdiens par les neurones sérotoninergiques.

Enfin, l'influence de la mélatonine et de l'activité locomotrice sur l'expression de *tph2* pourrait être étudiée chez des hamsters ADX/GDX : quelles sont, par exemple, les conséquences d'une induction transitoire d'activité ou d'une pinéalectomie/injection de mélatonine sur l'expression de *tph2* ?

Bibliographie

A

- Abrams, J.K., Johnson, P.L., Hollis, J.H. & Lowry, C.A. (2004) Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci*, 1018, 46-57.
- Abumaria, N., Rygula, R., Hiemke, C., Fuchs, E., Havemann-Reinecke, U., Ruther, E. & Flugge, G. (2007) Effect of chronic citalopram on serotonin-related and stress-regulated genes in the dorsal raphe nucleus of the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*, 17, 417-429.
- Ahima, R.S. & Harlan, R.E. (1990) Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 39, 579-604.
- Ahima, R., Krozowski, Z. & Harlan, R. (1991) Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol*, 313, 522-538.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Shibata, S. (1999) Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci*, 19, 1115-1121.
- Albers, H.E., Yorgev, L., Todd, R.B. & Goldman, B.D. (1985) Adrenal corticoids in hamsters: role in circadian timing. *Am J Physiol*, 248, R434-438.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G. & Lee, C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*, 91, 1055-1064.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z.S. & Lee, C.C. (2001) MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms*, 16, 100-104.
- Alexiuk, N.A. & Vriend, J. (2007) Melatonin: effects on dopaminergic and serotonergic neurons of the caudate nucleus of the striatum of male Syrian hamsters. *J Neural Transm*, 114, 549-554.
- Amir, S., Lamont, E.W., Robinson, B. & Stewart, J. (2004) A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci*, 24, 781-790.
- Amore, M., Scarlatti, F., Quarta, A.L. & Tagariello, P. (2009) Partial androgen deficiency, depression and testosterone treatment in aging men. *Aging Clin Exp Res*, 21, 1-8.
- Ansari, N., Agathagelidis, M., Lee, C., Korf, H.W. & von Gall, C. (2009) Differential maturation of circadian rhythms in clock gene proteins in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis during mouse ontogeny. *Eur J Neurosci*, 29, 477-489.
- Antle, M.C. & Mistlberger, R.E. (2000) Circadian clock resetting by sleep deprivation without exercise in the Syrian hamster. *J Neurosci*, 20, 9326-9332.
- Aronin, N., Sagar, S.M., Sharp, F.R. & Schwartz, W.J. (1990) Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5959-5962.
- Aronsson, M., Fuxe, K., Dong, Y., Agnati, L.F., Okret, S. & Gustafsson, J.A. (1988) Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9331-9335.

Ashcroft, G.W., Eccleston, D. & Crawford, T.B. (1965) 5-hydroxyindole metabolism in rat brain. A study of intermediate metabolism using the technique of tryptophan loading. I. Methods. *J Neurochem*, 12, 483-492.

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

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

B

Bach-Mizrachi, H., Underwood, M.D., Kassir, S.A., Bakalian, M.J., Sibille, E., Tamir, H., Mann, J.J. & Arango, V. (2006) Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology*, 31, 814-824.

Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, 30, 525-536.

Bae, K. & Weaver, D.R. (2003) Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2. *J Biol Rhythms*, 18, 123-133.

Bagdy, G. & Makara, G.B. (1994) Hypothalamic paraventricular nucleus lesions differentially affect serotonin-1A (5-HT_{1A}) and 5-HT₂ receptor agonist-induced oxytocin, prolactin, and corticosterone responses. *Endocrinology*, 134, 1127-1131.

Baker, K.G., Halliday, G.M. & Tork, I. (1990) Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, 301, 147-161.

Baker, K.G., Halliday, G.M., Halasz, P., Hornung, J.P., Geffen, L.B., Cotton, R.G. & Tork, I. (1991) Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain. *Synapse*, 7, 301-320.

Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G. & Schibler, U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289, 2344-2347.

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

Barry, L. & Dubois, M.P. (1976) Immunoreactive LRF neurosecretory pathways in mammals. *Acta Anat (Basel)*, 94, 497-503.

Bartke, A., Klemcke, H.G., Amador, A. & Van Sickle, M. (1982) Photoperiod and regulation of gonadotropin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 383, 122-134.

Bartke, A. (1985) Male hamster reproductive endocrinology. In Siegel, H.I. (ed.) *The hamster: reproduction and behavior*. Plenum Press, New York / London, pp. 73-98.

Bartness, T.J. & Wade, G.N. (1985) Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters. *Neurosci Biobehav Rev*, 9, 599-612.

- Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L. & 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, 161-190.
- Berton, O., Aguerre, S., Sarrieau, A., Mormede, P. & Chaouloff, F. (1998) Differential effects of social stress on central serotonergic activity and emotional reactivity in Lewis and spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 82, 147-159.
- Bethea, C.L., Gundlach, C. & Mirkes, S.J. (2000) Ovarian steroid action in the serotonin neural system of macaques. *Novartis Found Symp*, 230, 112-130; discussion 130-113.
- Bhaskaran, D. & Radha, E. (1984) Circadian variations in the monoamine levels and monoamine oxidase activity in different regions of the rat brain as a function of age. *Exp Gerontol*, 19, 153-170.
- Biello, S.M., Janik, D. & Mrosovsky, N. (1994) Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*, 62, 273-279.
- Bjarkam, C.R., Sorensen, J.C. & Geneser, F.A. (1997) Distribution and morphology of serotonin-immunoreactive neurons in the brainstem of the New Zealand white rabbit. *J Comp Neurol*, 380, 507-519.
- Black, B.E. & Paschal, B.M. (2004) Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 15, 411-417.
- Boldrini, M., Underwood, M.D., Mann, J.J. & Arango, V. (2005) More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Res*, 1041, 19-28.
- Bonkale, W.L., Turecki, G. & Austin, M.C. (2006) Increased tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe nucleus of alcohol-dependent, depressed suicide subjects is restricted to the dorsal subnucleus. *Synapse*, 60, 81-85.
- Botchkina, G.I. & Morin, L.P. (1993) Development of the hamster serotonergic system: cell groups and diencephalic projections. *J Comp Neurol*, 338, 405-431.
- Bradbury, M.J., Dement, W.C. & Edgar, D.M. (1997) Serotonin-containing fibers in the suprachiasmatic hypothalamus attenuate light-induced phase delays in mice. *Brain Res*, 768, 125-134.
- Brown, D.I., Garyfallou, V.T. & Urbanski, H.F. (2001) Photoperiodic modulation of GnRH mRNA in the male Syrian hamster. *Brain Res Mol Brain Res*, 89, 119-125.
- Buijs, R.M., Pevet, P., Masson-Pevet, M., Pool, C.W., de Vries, G.J., Canguilhem, B. & Vivien-Roels, B. (1986) Seasonal variation in vasopressin innervation in the brain of the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Brain Res*, 371, 193-196.
- Buijs, R.M., Wortel, J., Van Heerikhuize, J.J. & Kalsbeek, A. (1997) Novel environment induced inhibition of corticosterone secretion: physiological evidence for a suprachiasmatic nucleus mediated neuronal hypothalamo-adrenal cortex pathway. *Brain Res*, 758, 229-236.
- Buijs, R.M., Wortel, J., Van Heerikhuize, J.J., Feenstra, M.G., Ter Horst, G.J., Romijn, H.J. & Kalsbeek, A. (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*, 11, 1535-1544.
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S. & Bradfield, C.A. (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103, 1009-1017.

C

- Cagampang, F.R., Yamazaki, S., Otori, Y. & Inouye, S.I. (1993) Serotonin in the raphe nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Neuroreport*, 5, 49-52.
- Cahill, A.L. & Ehret, C.F. (1981) Circadian variations in the activity of tyrosine hydroxylase, tyrosine aminotransferase, and tryptophan hydroxylase: relationship to catecholamine metabolism. *J Neurochem*, 37, 1109-1115.
- Caldelas, I., Poirel, V.J., Sicard, B., Pevet, P. & Challet, E. (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience*, 116, 583-591.
- Caldelas, I., Challet, E., Saboureau, M. & Pevet, P. (2005) Light and melatonin inhibit in vivo serotonergic phase advances without altering serotonergic-induced decrease of per expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Mol Neurosci*, 25, 53-63.
- Caldwell, H.K., Smith, D.A. & Albers, H.E. (2008) Photoperiodic mechanisms controlling scent marking: interactions of vasopressin and gonadal steroids. *Eur J Neurosci*, 27, 1189-1196.
- Callard, G.V., Mak, P. & Solomon, D.J. (1986) Effects of short days on aromatization and accumulation of nuclear estrogen receptors in the hamster brain. *Biol Reprod*, 35, 282-291.
- Calogero, A.E., Burrello, N., Bosboom, A.M., Garofalo, M.R., Weber, R.F. & D'Agata, R. (1999) Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level. *J Endocrinol Invest*, 22, 666-670.
- Canguilhem, B., Vaultier, J.P., Pevet, P., Coumaros, G., Masson-Pevet, M. & Bentz, I. (1988) Photoperiodic regulation of body mass, food intake, hibernation, and reproduction in intact and castrated male European hamsters, *Cricetus cricetus*. *J Comp Physiol A*, 163, 549-557.
- Cardinali, D.P., Nagle, C.A., Freire, F. & Rosner, J.M. (1975) Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 18, 72-85.
- Carr, A.J., Johnston, J.D., Semikhodskii, A.G., Nolan, T., Cagampang, F.R., Stirling, J.A. & Loudon, A.S. (2003) Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr Biol*, 13, 1543-1548.
- Cermakian, N., Monaco, L., Pando, M.P., Dierich, A. & Sassone-Corsi, P. (2001) Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J*, 20, 3967-3974.
- Challet, E., Pevet, P. & Malan, A. (1997) Lesion of the serotonergic terminals in the suprachiasmatic nuclei limits the phase advance of body temperature rhythm in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms*, 12, 235-244.
- Challet, E., Scarbrough, K., Penev, P.D. & Turek, F.W. (1998) Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J Biol Rhythms*, 13, 410-421.

- Challet, E. & Pevet, P. (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci*, 8, s246-257.
- Chamas, F.M., Underwood, M.D., Arango, V., Serova, L., Kassir, S.A., Mann, J.J. & Sabban, E.L. (2004) Immobilization stress elevates tryptophan hydroxylase mRNA and protein in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry*, 55, 278-283.
- Charara, A. & Parent, A. (1998) Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat*, 15, 111-127.
- Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M. & Zhou, Q.Y. (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417, 405-410.
- Chennaoui, M., Drogou, C., Gomez-Merino, D., Grimaldi, B., Fillion, G. & Guezenec, C.Y. (2001) Endurance training effects on 5-HT(1B) receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosci Lett*, 307, 33-36.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Clark, A.S. & Henderson, L.P. (2003) Behavioral and physiological responses to anabolic-androgenic steroids. *Neurosci Biobehav Rev*, 27, 413-436.
- Clark, J.A., Pai, L.Y., Flick, R.B. & Rohrer, S.P. (2005) Differential hormonal regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the murine dorsal raphe nucleus. *Biol Psychiatry*, 57, 943-946.
- Clark, J.A., Flick, R.B., Pai, L.Y., Szalayova, I., Key, S., Conley, R.K., Deutch, A.Y., Hutson, P.H. & Mezey, E. (2008) Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol Psychiatry*, 13, 498-506.
- Clark, M.S. & Russo, A.F. (1997) Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels. *Brain Res Mol Brain Res*, 48, 346-354.
- Coccaro, E.F., Kavoussi, R.J., Trestman, R.L., Gabriel, S.M., Cooper, T.B. & Siever, L.J. (1997) Serotonin function in human subjects: intercorrelations among central 5-HT indices and aggressiveness. *Psychiatry Res*, 73, 1-14.
- Colwell, C.S., Ralph, M.R. & Menaker, M. (1990) Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Res*, 523, 117-120.
- Commons, K.G., Connolley, K.R. & Valentino, R.J. (2003) A neurochemically distinct dorsal raphe- limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology*, 28, 206-215.
- Conway-Campbell, B.L., McKenna, M.A., Wiles, C.C., Atkinson, H.C., de Kloet, E.R. & Lightman, S.L. (2007) Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone. *Endocrinology*, 148, 5470-5477.
- Cooper, K.E., Kasting, N.W., Lederis, K. & Veale, W.L. (1979) Evidence supporting a role for endogenous vasopressin in natural suppression of fever in the sheep. *J Physiol*, 295, 33-45.
- Cooper, M.A., Grober, M.S., Nicholas, C.R. & Huhman, K.L. (2009) Aggressive encounters alter the activation of serotonergic neurons and the expression of 5-HT1A mRNA in the hamster dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 161, 680-690.

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

Craft, R.M. (2007) Modulation of pain by estrogens. *Pain*, 132 Suppl 1, S3-12.

Cuesta, M., Clesse, D., Pevet, P. & Challet, E. (2009) New light on the serotonergic paradox in the rat circadian system. *J Neurochem*.

Cutrera, R.A., Kalsbeek, A. & Pevet, P. (1993) No triazolam-induced expression of Fos protein in raphe nuclei of the male Syrian hamster. *Brain Res*, 602, 14-20.

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

Cutrera, R.A., Saboureau, M. & Pevet, P. (1996) Phase-shifting effect of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor agonist, on locomotor activity in golden hamster in constant darkness. *Neurosci Lett*, 210, 1-4.

D

Daan, S., Damassa, D., Pittendrigh, C.S. & Smith, E.R. (1975) An effect of castration and testosterone replacement on a circadian pacemaker in mice (*Mus musculus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3744-3747.

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

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

de Kloet, E.R., Kovacs, G.L., Szabo, G., Telegdy, G., Bohus, B. & Versteeg, D.H. (1982) Decreased serotonin turnover in the dorsal hippocampus of rat brain shortly after adrenalectomy: selective normalization after corticosterone substitution. *Brain Res*, 239, 659-663.

de Kloet, E.R., Sybesma, H. & Reul, H.M. (1986) Selective control by corticosterone of serotonin₁ receptor capacity in raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology*, 42, 513-521.

de Kloet, E.R. (2000) Stress in the brain. *Eur J Pharmacol*, 405, 187-198.

de Souza, C.J. & Meier, A.H. (1987) Circadian and seasonal variations of plasma insulin and cortisol concentrations in the Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*. *Chronobiol Int*, 4, 141-151.

de Vries, G.J., Buijs, R.M. & Sluiter, A.A. (1984) Gonadal hormone actions on the morphology of the vasopressinergic innervation of the adult rat brain. *Brain Res*, 298, 141-145.

Deboer, T., Vansteensel, M.J., Detari, L. & Meijer, J.H. (2003) Sleep states alter activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci*, 6, 1086-1090.

- Del Rio, M.J., Velez-Pardo, C., Ebinger, G. & Vauquelin, G. (1995) Serotonin binding proteins "SBP": target proteins and tool for in vitro neurotoxicity studies. *Gen Pharmacol*, 26, 1633-1641.
- Desjardins, C., Ewing, L.L. & Johnson, B.H. (1971) Effects of light deprivation upon the spermatogenic and steroidogenic elements of hamster testes. *Endocrinology*, 89, 791-800.
- DeVries, G.J., Buijs, R.M., Van Leeuwen, F.W., Caffè, A.R. & Swaab, D.F. (1985) The vasopressinergic innervation of the brain in normal and castrated rats. *J Comp Neurol*, 233, 236-254.
- Dimeo, A.N. & Wood, R.I. (2006) ICV testosterone induces Fos in male Syrian hamster brain. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 237-249.
- DiRaddo, J. & Kellogg, C. (1975) In vivo rates of tyrosine and tryptophan hydroxylation in regions of rat brain at four times during the light-dark cycle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 286, 389-400.
- Dudley, T.E., DiNardo, L.A. & Glass, J.D. (1998) Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 18, 5045-5052.
- Dudley, T.E., Dinardo, L.A. & Glass, J.D. (1999) In vivo assessment of the midbrain raphe nuclear regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*, 81, 1469-1477.
- Duncan, M.J. (1998) Photoperiodic regulation of hypothalamic neuropeptide messenger RNA expression: effect of pinealectomy and neuroanatomical location. *Brain Res Mol Brain Res*, 57, 142-148.
- Duncan, M.J., Cheng, X. & Heller, K.S. (1995) Photoperiodic exposure and time of day modulate the expression of arginine vasopressin mRNA and vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nuclei of Siberian hamsters. *Brain Res Mol Brain Res*, 32, 181-186.
- Duncan, M.J., Short, J. & Wheeler, D.L. (1999) Comparison of the effects of aging on 5-HT₇ and 5-HT_{1A} receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain Res*, 829, 39-45.
- Duncan, M.J., Herron, J.M. & 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, 196-203.
- Dygalov, N.N., Shishkina, G.T., Kalinina, T.S., Yudina, A.M. & Ovchinnikova, E.S. (2006) Effect of repeated treatment with fluoxetine on tryptophan hydroxylase-2 gene expression in the rat brainstem. *Pharmacol Biochem Behav*, 85, 220-227.

E

- Earnest, D.J., Iadarola, M., Yeh, H.H. & Olschowka, J.A. (1990) Photic regulation of c-fos expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms. *Exp Neurol*, 109, 353-361.
- Ebinger, M., Sievers, C., Ivan, D., Schneider, H.J. & Stalla, G.K. (2008) Is there a neuroendocrinological rationale for testosterone as a therapeutic option in depression? *J Psychopharmacol.*, 23, 841-853.
- Edelstein, K. & Amir, S. (1995) Non-photic manipulations induce expression of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the rat. *Brain Res*, 690, 254-258.

Edgar, D.M., Reid, M.S. & Dement, W.C. (1997) Serotonergic afferents mediate activity-dependent entrainment of the mouse circadian clock. *Am J Physiol*, 273, R265-269.

Ehlen, J.C., Grossman, G.H. & Glass, J.D. (2001) In vivo resetting of the hamster circadian clock by 5-HT₇ receptors in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 21, 5351-5357.

Elliott, J.A. & Tamarkin, L. (1994) Complex circadian regulation of pineal melatonin and wheel-running in Syrian hamsters. *J Comp Physiol A*, 174, 469-484.

Ellis, G.B. & Turek, F.W. (1979) Changes in Locomotor-Activity Associated with the Photoperiodic Response of the Testes in Male Golden-Hamsters. *Journal of Comparative Physiology*, 132, 277-284.

Ellis, G.B. & Turek, F.W. (1983) Testosterone and photoperiod interact to regulate locomotor activity in male hamsters. *Horm Behav*, 17, 66-75.

Evans, J.A., Elliott, J.A. & Gorman, M.R. (2004) Photoperiod differentially modulates photic and nonphotic phase response curves of hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, R539-546.

F

Fairchild, G., Leitch, M.M. & Ingram, C.D. (2003) Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 45, 925-934.

Feek, C.M., Tuzi, N.L. & Edwards, C.R. (1989) The adrenal gland and progesterone stimulates testicular steroidogenesis in the rat in vivo. *J Steroid Biochem*, 32, 573-579.

Ferraro, J.S. & Steger, R.W. (1990) Diurnal variations in brain serotonin are driven by the photic cycle and are not circadian in nature. *Brain Res*, 512, 121-124.

Fischman, A.J., Kastin, A.J., Graf, M.V. & Moldow, R.L. (1988) Constant light and dark affect the circadian rhythm of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrinology*, 47, 309-316.

Foster, M.T., Solomon, M.B., Huhman, K.L. & Bartness, T.J. (2006) Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R1284-1293.

Foy, M.R., Baudry, M., Diaz Brinton, R. & Thompson, R.F. (2008) Estrogen and hippocampal plasticity in rodent models. *J Alzheimers Dis*, 15, 589-603.

Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A. & Nagy, G. (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80, 1523-1631.

Freeman, D.A., Herron, J.M. & Duncan, M.J. (2002) Absence of pineal-independent mediation of seasonal differences in suprachiasmatic nucleus AVP and VIP mRNA expression in Siberian hamsters. *Brain Res Mol Brain Res*, 101, 33-38.

Fuller, P.J. & Young, M.J. (2005) Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*, 46, 1227-1235.

Fuller, R.W. (1992) The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front Neuroendocrinol*, 13, 250-270.

Fuller, R.W. (1996) Serotonin receptors involved in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats. *Behav Brain Res*, 73, 215-219.

G

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

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

Gauer, F., Masson-Pevet, M. & Pevet, P. (1994) Seasonal regulation of melatonin receptors in rodent pars tuberalis: correlation with reproductive state. *J Neural Transm Gen Sect*, 96, 187-195.

Gillespie, C.F., Huhman, K.L., Babagbemi, T.O. & Albers, H.E. (1996) Bicuculline increases and muscimol reduces the phase-delaying effects of light and VIP/PHI/GRP in the suprachiasmatic region. *J Biol Rhythms*, 11, 137-144.

Gillespie, C.F., Mintz, E.M., Marvel, C.L., Huhman, K.L. & Albers, H.E. (1997) GABA(A) and GABA(B) agonists and antagonists alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the suprachiasmatic region. *Brain Res*, 759, 181-189.

Glass, J.D. (1986) Short photoperiod-induced gonadal regression: effects on the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system of the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Biol Reprod*, 35, 733-743.

Glass, J.D., DiNardo, L.A. & Ehlen, J.C. (2000) Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin release and circadian phase-resetting. *Brain Res*, 859, 224-232.

Glass, J.D., Grossman, G.H., Farnbauch, L. & DiNardo, L. (2003) Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 23, 7451-7460.

Gorman, M.R., Goldman, B.D. & Zucker I. (2001) Mammalian photoperiodism. In Takahashi, J.S., Turek, F.W., Moore, R.Y. (eds.) *Circadian Clocks*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp. 481-508.

Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2004) A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*, 145, 4073-4077.

Greenwood, B.N., Foley, T.E., Day, H.E., Burhans, D., Brooks, L., Campeau, S. & Fleshner, M. (2005) Wheel running alters serotonin (5-HT) transporter, 5-HT1A, 5-HT1B, and alpha 1b-adrenergic receptor mRNA in the rat raphe nuclei. *Biol Psychiatry*, 57, 559-568.

Grimes, J.M. & Melloni, R.H., Jr. (2002) Serotonin modulates offensive attack in adolescent anabolic steroid-treated hamsters. *Pharmacol Biochem Behav*, 73, 713-721.

Grossman, G.H., Mistlberger, R.E., Antle, M.C., Ehlen, J.C. & Glass, J.D. (2000) Sleep deprivation stimulates serotonin release in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*, 11, 1929-1932.

Grossman, G.H., Farnbauch, L. & Glass, J.D. (2004) Regulation of serotonin release in the Syrian hamster intergeniculate leaflet region. *Neuroreport*, 15, 103-106.

Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V. & Cermakian, N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20, 391-403.

Gundlach, C., Lu, N.Z. & Bethea, C.L. (2002) Ovarian steroid regulation of monoamine oxidase-A and -B mRNAs in the macaque dorsal raphe and hypothalamic nuclei. *Psychopharmacology (Berl)*, 160, 271-282.

H

Hahn, J.D. & Coen, C.W. (2006) Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats. *J Comp Neurol*, 494, 190-214.

Hampp, G., Ripperger, J.A., Houben, T., Schmutz, I., Blex, C., Perreau-Lenz, S., Brunk, I., Spanagel, R., Ahnert-Hilger, G., Meijer, J.H. & Albrecht, U. (2008) Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood. *Curr Biol*, 18, 678-683.

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

Harper, D.G., Tornatzky, W. & Miczek, K.A. (1996) Stress induced disorganization of circadian and ultradian rhythms: comparisons of effects of surgery and social stress. *Physiol Behav*, 59, 409-419.

Hastings, M.H., Walker, A.P. & Herbert, J. (1987) Effect of asymmetrical reductions of photoperiod on pineal melatonin, locomotor activity and gonadal condition of male Syrian hamsters. *J Endocrinol*, 114, 221-229.

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

Heinlein, C.A. & Chang, C. (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*, 16, 2181-2187.

Heitzer, M.D., Wolf, I.M., Sanchez, E.R., Witchel, S.F. & DeFranco, D.B. (2007) Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord*, 8, 321-330.

Hensler, J.G., Ferry, R.C., Labow, D.M., Kovachich, G.B. & Frazer, A. (1994) Quantitative autoradiography of the serotonin transporter to assess the distribution of serotonergic projections from the dorsal raphe nucleus. *Synapse*, 17, 1-15.

Herman, J.P. (1993) Regulation of Adrenocorticosteroid Receptor Messenger-Rna Expression in the Central-Nervous-System. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 13, 349-372.

Herman, J.P., Watson, S.J., Chao, H.M., Coirini, H. & McEwen, B.S. (1993) Diurnal Regulation of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor Messenger-Rnas in Rat Hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 4, 181-190.

Hermes, M.L., Buijs, R.M., Masson-Pevet, M., van der Woude, T.P., Pevet, P., Brenkle, R. & Kirsch, R. (1989) Central vasopressin infusion prevents hibernation in the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6408-6411.

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

Hirayama, J. & Sassone-Corsi, P. (2005) Structural and functional features of transcription factors controlling the circadian clock. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 548-556.

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

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

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

Hsiao, P.W., Thin, T.H., Lin, D.L. & Chang, C. (2000) Differential regulation of testosterone vs. 5 α -dihydrotestosterone by selective androgen response elements. *Mol Cell Biochem*, 206, 169-175.

Hu, G.X., Lian, Q.Q., Lin, H., Latif, S.A., Morris, D.J., Hardy, M.P. & Ge, R.S. (2008) Rapid mechanisms of glucocorticoid signaling in the Leydig cell. *Steroids*, 73, 1018-1024.

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

Hui, Y., Hastings, M.H., Maywood, E.S. & Ebling, F.J. (1992) Photoperiodic regulation of glutamatergic stimulation of secretion of luteinizing hormone in male Syrian hamsters. *J Reprod Fertil*, 95, 935-946.

Hutchison, R.E., Hutchison, J.B., Steimer, T., Steel, E., Powers, J.B., Walker, A.P., Herbert, J. & Hastings, M.H. (1991) Brain aromatization of testosterone in the male Syrian hamster: effects of androgen and photoperiod. *Neuroendocrinology*, 53, 194-203.

I / J

Imai, H., Park, M.R., Steindler, D.A. & Kitai, S.T. (1986a) The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat. *Brain Dev*, 8, 343-354.

Imai, H., Steindler, D.A. & Kitai, S.T. (1986b) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 243, 363-380.

Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2004) Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of *KiSS-1* mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80, 264-272.

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

Jacob, N., Vuillez, P. & Pevet, P. (1997) Photoperiod does not act on the suprachiasmatic nucleus photosensitive phase through the endogenous melatonin, in the Syrian hamster. *Neurosci Lett*, 229, 117-120.

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

Jacobs, B.L. & Fornal, C.A. (1991) Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev*, 43, 563-578.

Jagota, A., de la Iglesia, H.O. & Schwartz, W.J. (2000) Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat Neurosci*, 3, 372-376.

Jasper, M.S. & Engeland, W.C. (1994) Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. *Neuroendocrinology*, 59, 97-109.

Jequier, E., Robinson, D.S., Lovenberg, W. & Sjoerdsma, A. (1969) Further studies on tryptophan hydroxylase in rat brainstem and beef pineal. *Biochem Pharmacol*, 18, 1071-1081.

Ji, Y. & Li, X. (2009) Cloning and developmental expression analysis of prokineticin 2 and its receptor PKR2 in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 1271, 18-26.

Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., de Vries, G.J. & Reppert, S.M. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96, 57-68.

Joels, M., Karst, H., DeRijk, R. & de Kloet, E.R. (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci*, 31, 1-7.

Johnson, A.E., Barberis, C. & Albers, H.E. (1995) Castration reduces vasopressin receptor binding in the hamster hypothalamus. *Brain Res*, 674, 153-158.

Johnston, J.D. (2005) Measuring seasonal time within the circadian system: regulation of the suprachiasmatic nuclei by photoperiod. *J Neuroendocrinol*, 17, 459-465.

Jordan, L.M., Liu, J., Hedlund, P.B., Akay, T. & Pearson, K.G. (2008) Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Res Rev*, 57, 183-191.

Jorgensen, H.S. (2007) Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Dan Med Bull*, 54, 266-288.

Joshi, B.N., Vaughan, M.K., Nurnberger, F. & Reiter, R.J. (1985) Diurnal sensitivity of the neuroendocrine-reproductive axis to the antigonadotrophic influence of melatonin in male Syrian hamsters with experimentally altered cortisol rhythms. *Chronobiol Int*, 2, 47-54.

K

Kalra, P.S. & Kalra, S.P. (1977) Circadian periodicities of serum androgens, progesterone, gonadotropins and luteinizing hormone-releasing hormone in male rats: the effects of hypothalamic deafferentation, castration and adrenalectomy. *Endocrinology*, 101, 1821-1827.

- Kalsbeek, A., Buijs, R.M., van Heerikhuize, J.J., Arts, M. & van der Woude, T.P. (1992) Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res*, 580, 62-67.
- Kalsbeek, A., Teclemariam-Mesbah, R. & Pevet, P. (1993) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol*, 332, 293-314.
- Kalsbeek, A., Buijs, R.M., Engelmann, M., Wotjak, C.T. & Landgraf, R. (1995) In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 682, 75-82.
- Kalsbeek, A. & Buijs, R.M. (1996) Rhythms of inhibitory and excitatory output from the circadian timing system as revealed by in vivo microdialysis. *Prog Brain Res*, 111, 273-293.
- Kalsbeek, A., Drijfhout, W.J., Westerink, B.H., van Heerikhuize, J.J., van der Woude, T.P., van der Vliet, J. & Buijs, R.M. (1996a) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release. *Neuroendocrinology*, 63, 69-78.
- Kalsbeek, A., van der Vliet, J. & Buijs, R.M. (1996b) Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol*, 8, 299-307.
- Kalsbeek, A., van Heerikhuize, J.J., Wortel, J. & Buijs, R.M. (1996c) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J Neurosci*, 16, 5555-5565.
- Kalsbeek, A., Garidou, M.L., Palm, I.F., Van Der Vliet, J., Simonneaux, V., Pevet, P. & 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, 3146-3154.
- Kalsbeek, A. & Buijs, R.M. (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res*, 309, 109-118.
- Kamase, H. (1980) The diurnal variations of monoamine oxidase activity in discrete nuclei of rat brain. *Folia Psychiatr Neurol Jpn*, 34, 481-492.
- Kan, J.P., Buda, M. & Pujol, J.F. (1975) Tryptophan-5-hydroxylase activity in the raphe system of the rat brain stem. *Brain Res*, 93, 353-357.
- Karatsoreos, I.N., Wang, A., Sasanian, J. & Silver, R. (2007) A role for androgens in regulating circadian behavior and the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, 148, 5487-5495.
- Karolczak, M., Burbach, G.J., Sties, G., Korf, H.W. & Stehle, J.H. (2004) Clock gene mRNA and protein rhythms in the pineal gland of mice. *Eur J Neurosci*, 19, 3382-3388.
- Kazakov, V.N., Kravtsov, P., Krakhotkina, E.D. & Maisky, V.A. (1993) Sources of cortical, hypothalamic and spinal serotonergic projections: topical organization within the nucleus raphe dorsalis. *Neuroscience*, 56, 157-164.
- Keating, R.J. & Tcholakian, R.K. (1979) In vivo patterns of circulating steroids in adult male rats. I. Variations in testosterone during 24- and 48-hour standard and reverse light/dark cycles. *Endocrinology*, 104, 184-188.
- Keeney, A., Jessop, D.S., Harbuz, M.S., Marsden, C.A., Hogg, S. & Blackburn-Munro, R.E. (2006) Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol*, 18, 330-338.

- Kinson, G.A. & Liu, C.C. (1973) Diurnal variation in plasma testosterone of the male laboratory rat. *Horm Metab Res*, 5, 233-234.
- Kirby, L.G., Rice, K.C. & Valentino, R.J. (2000) Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*, 22, 148-162.
- Klein, D.C. & Moore, R.Y. (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 174, 245-262.
- Knoll, J., Miklya, I., Knoll, B. & Dallo, J. (2000) Sexual hormones terminate in the rat: the significantly enhanced catecholaminergic/serotonergic tone in the brain characteristic to the post-weaning period. *Life Sci*, 67, 765-773.
- Ko, C.H. & Takahashi, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R271-277.
- Kohler, C. & Steinbusch, H. (1982) Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, 7, 951-975.
- Kollack-Walker, S., Watson, S.J. & Akil, H. (1997) Social stress in hamsters: defeat activates specific neurocircuits within the brain. *J Neurosci*, 17, 8842-8855.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E. & Takahashi, J.S. (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, 5, 127-134.
- Korte-Bouws, G.A., Korte, S.M., De Kloet, E.R. & Bohus, B. (1996) Blockade of corticosterone synthesis reduces serotonin turnover in the dorsal hippocampus of the rat as measured by microdialysis. *J Neuroendocrinol*, 8, 877-881.
- Kraeuchi, K., Wirz-Justice, A., Morimasa, T., Suetterlin-Willener, R. & Feer, H. (1986) Temporal distribution of [3H]-imipramine binding in rat brain regions is not changed by chronic methamphetamine. *Chronobiol Int*, 3, 127-133.
- Krajnak, K., Rosewell, K.L., Duncan, M.J. & Wise, P.M. (2003) Aging, estradiol and time of day differentially affect serotonin transporter binding in the central nervous system of female rats. *Brain Res*, 990, 87-94.
- Kramer, A., Yang, F.C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C. & Weitz, C.J. (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, 294, 2511-2515.
- Kraves, S. & Weitz, C.J. (2006) A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci*, 9, 212-219.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. & Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98, 193-205.

L

- Laaris, N., Haj-Dahmane, S., Hamon, M. & Lanfumey, L. (1995) Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT_{1A} autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*, 34, 1201-1210.
- Lall, G.S. & Biello, S.M. (2003a) Attenuation of circadian light induced phase advances and delays by neuropeptide Y and a neuropeptide Y Y₁/Y₅ receptor agonist. *Neuroscience*, 119, 611-618.
- Lall, G.S. & Biello, S.M. (2003b) Neuropeptide Y, GABA and circadian phase shifts to photic stimuli. *Neuroscience*, 120, 915-921.
- Lance, S.J., Miller, S.C., Holtsclaw, L.I. & Turner, B.B. (1998) Photoperiod regulation of mineralocorticoid receptor mRNA expression in hamster hippocampus. *Brain Res*, 780, 342-347.
- Larsen, P.J. (1999) Tracing autonomic innervation of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Microsc Res Tech*, 46, 296-304.
- Leander, P., Vrang, N. & Moller, M. (1998) Neuronal projections from the mesencephalic raphe nuclear complex to the suprachiasmatic nucleus and the deep pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Comp Neurol*, 399, 73-93.
- Lee, C., Bae, K. & Edery, I. (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/DBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol*, 19, 5316-5325.
- Lee, H.S., Kim, M.A., Valentino, R.J. & Waterhouse, B.D. (2003) Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*, 963, 57-71.
- Lewy, A.J., Sack, R.L. & Singer, C.M. (1985) Immediate and delayed effects of bright light on human melatonin production: shifting "dawn" and "dusk" shifts the dim light melatonin onset (DLMO). *Ann N Y Acad Sci*, 453, 253-259.
- Lewy, A.J., Sack, R.L., Singer, C.M. & White, D.M. (1987) The phase shift hypothesis for bright light's therapeutic mechanism of action: theoretical considerations and experimental evidence. *Psychopharmacol Bull*, 23, 349-353.
- Lewy, A.J. & Sack, R.L. (1988) The Phase-Shift Hypothesis of Seasonal Affective-Disorder. *American Journal of Psychiatry*, 145, 1041-1042.
- Li, J.D., Hu, W.P., Boehmer, L., Cheng, M.Y., Lee, A.G., Jilek, A., Siegel, J.M. & Zhou, Q.Y. (2006) Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci*, 26, 11615-11623.
- Li, J.D., Burton, K.J., Zhang, C., Hu, S.B. & Zhou, Q.Y. (2009) Vasopressin receptor V_{1a} regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296, R824-830.
- Lightman, S.L. (2008) The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol*, 20, 880-884.
- Lincoln, G., Messenger, S., Andersson, H. & Hazlerigg, D. (2002) Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13890-13895.

Linthorst, A.C., Flachskamm, C., Hopkins, S.J., Hoadley, M.E., Labeur, M.S., Holsboer, F. & Reul, J.M. (1997) Long-term intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing hormone alters neuroendocrine, neurochemical, autonomic, behavioral, and cytokine responses to a systemic inflammatory challenge. *J Neurosci*, 17, 4448-4460.

Liposits, Z., Phelix, C. & Paull, W.K. (1987) Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Histochemistry*, 86, 541-549.

Lisk, R.D. (1985) The estrous cycle. In Siegel, H.I. (ed.) *The hamster: reproduction and behavior*. Plenum Press, New York / London, pp. 23-51.

Liu, A.C., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Welsh, D.K. & Kay, S.A. (2008) Redundant function of REV-ERB α and β and non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genet*, 4, e1000023.

Lovenberg, W., Jequier, E. & Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 155, 217-219.

Lu, N.Z., Shlaes, T.A., Gundlach, C., Dziennis, S.E., Lyle, R.E. & Bethea, C.L. (1999) Ovarian steroid action on tryptophan hydroxylase protein and serotonin compared to localization of ovarian steroid receptors in midbrain of guinea pigs. *Endocrine*, 11, 257-267.

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

M

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

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

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

Malek, Z.S. (2007) Régulation circadienne de la tryptophane hydroxylase dans les neurones sérotoninergiques du Raphé dorsal et médian chez le Rat. Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Malkinson, T.J., Bridges, T.E., Lederis, K. & Veale, W.L. (1987) Perfusion of the septum of the rabbit with vasopressin antiserum enhances endotoxin fever. *Peptides*, 8, 385-389.

Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H. & Chemineau, P. (2001) Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms*, 16, 336-347.

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

- Marchant, E.G., Watson, N.V. & Mistlberger, R.E. (1997) Both neuropeptide Y and serotonin are necessary for entrainment of circadian rhythms in mice by daily treadmill running schedules. *J Neurosci*, 17, 7974-7987.
- Martini, L., Celotti, F., Lechuga, M.J., Melcangi, R.C., Motta, M., Negri-Cesi, P., Poletti, A. & Zoppi, S. (1990) Androgen metabolism in different target tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 595, 184-198.
- Masson-Pevet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N. & Pevet, P. (1994) An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res*, 278, 97-106.
- Matsuda, K., Sakamoto, H. & Kawata, M. (2008) Androgen action in the brain and spinal cord for the regulation of male sexual behaviors. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 747-751.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. & Ohtaki, T. (2004) Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 320, 383-388.
- Matthews, J. & Gustafsson, J.A. (2003) Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 3, 281-292.
- Maurel, D., Sage, D., Mekaouche, M. & Bosler, O. (2000) Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia*, 29, 212-221.
- Maywood, E.S., Mrosovsky, N., Field, M.D. & Hastings, M.H. (1999) Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 15211-15216.
- Maywood, E.S. & Mrosovsky, N. (2001) A molecular explanation of interactions between photic and non-photoc circadian clock-resetting stimuli. *Brain Res Gene Expr Patterns*, 1, 27-31.
- Maywood, E.S., Okamura, H. & Hastings, M.H. (2002) Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci*, 15, 216-220.
- Maywood, E.S., O'Brien, J.A. & Hastings, M.H. (2003) Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol*, 15, 329-334.
- McCormick, C.M., Linkroum, W., Sallinen, B.J. & Miller, N.W. (2002) Peripheral and central sex steroids have differential effects on the HPA axis of male and female rats. *Stress*, 5, 235-247.
- McGuirk, J., Muscat, R. & Willner, P. (1992) Effects of chronically administered fluoxetine and fenfluramine on food intake, body weight and the behavioural satiety sequence. *Psychopharmacology (Berl)*, 106, 401-407.
- McKittrick, C.R., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., McEwen, B.S. & Sakai, R.R. (1995) Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. *Biol Psychiatry*, 37, 383-393.
- McQueen, J.K., Wilson, H., Sumner, B.E. & Fink, G. (1999) Serotonin transporter (SERT) mRNA and binding site densities in male rat brain affected by sex steroids. *Brain Res Mol Brain Res*, 63, 241-247.
- Mead, S., Ebling, F.J., Maywood, E.S., Humby, T., Herbert, J. & Hastings, M.H. (1992) A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the Syrian hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*, 12, 2516-2522.

- Meek, J.L. & Neff, N.H. (1972) Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *J Neurochem*, 19, 1519-1525.
- Meerlo, P., De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., Daan, S. & Van den Hoofdakker, R.H. (1996) Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiol Behav*, 59, 735-739.
- Meerlo, P., Sgoifo, A. & Turek, F.W. (2002) The effects of social defeat and other stressors on the expression of circadian rhythms. *Stress*, 5, 15-22.
- Meijer, J.H., Schaap, J., Watanabe, K. & Albus, H. (1997) Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Res*, 753, 322-327.
- Meijer, O.C., Kortekaas, R., Oitzl, M.S. & de Kloet, E.R. (1998) Acute rise in corticosterone facilitates 5-HT(1A) receptor-mediated behavioural responses. *Eur J Pharmacol*, 351, 7-14.
- Meltzer, H.Y. & Sumiyoshi, T. (2008) Does stimulation of 5-HT(1A) receptors improve cognition in schizophrenia? *Behav Brain Res*, 195, 98-102.
- Mendoza, J., Pevet, P. & Challet, E. (2007) Circadian and photic regulation of clock and clock-controlled proteins in the suprachiasmatic nuclei of calorie-restricted mice. *Eur J Neurosci*, 25, 3691-3701.
- Meredith, J.M., Turek, F.W. & Levine, J.E. (1991) Pulsatile luteinizing hormone responses to intermittent N-methyl-D,L-aspartate administration in hamsters exposed to long- and short-day photoperiods. *Endocrinology*, 129, 1714-1720.
- Messenger, S., Hazlerigg, D.G., Mercer, J.G. & 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, 2865-2870.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A. & Aparicio, S.A. (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1761-1766.
- Meyer-Bernstein, E.L. & Morin, L.P. (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci*, 16, 2097-2111.
- Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S.I., Markuns, J.F., Lehman, M.N. & Bittman, E.L. (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*, 140, 207-218.
- Meyer-Bernstein, E.L. & Morin, L.P. (1999) Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience*, 92, 267-279.
- Meyer, D.C. & Quay, W.B. (1976) Hypothalamic and suprachiasmatic uptake of serotonin in vitro: twenty-four-hour changes in male and proestrous female rats. *Endocrinology*, 98, 1160-1165.
- Michels, G. & Hoppe, U.C. (2008) Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol*, 29, 182-198.

- Miguez, J., Martin, F., Miguez, I. & Aldegunde, M. (1991) Long-term pinealectomy alters hypothalamic serotonin metabolism in the rat. *J Pineal Res*, 11, 75-79.
- Miguez, J.M., Martin, F.J. & Aldegunde, M. (1994) Effects of single doses and daily melatonin treatments on serotonin metabolism in rat brain regions. *J Pineal Res*, 17, 170-176.
- Miguez, J.M., Martin, F.J. & Aldegunde, M. (1995) Effects of pinealectomy and melatonin treatments on serotonin uptake and release from synaptosomes of rat hypothalamic regions. *Neurochem Res*, 20, 1127-1132.
- Miller, A.E. & Riegle, G.D. (1982) Temporal patterns of serum luteinizing hormone and testosterone and endocrine response to luteinizing hormone releasing hormone in aging male rats. *J Gerontol*, 37, 522-528.
- Mintz, E.M., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Price, K.M. & Albers, H.E. (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci*, 19, 5124-5130.
- Mintz, E.M., van den Pol, A.N., Casano, A.A. & Albers, H.E. (2001) Distribution of hypocretin-(orexin) immunoreactivity in the central nervous system of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Chem Neuroanat*, 21, 225-238.
- Mintz, E.M., Jasnow, A.M., Gillespie, C.F., Huhman, K.L. & Albers, H.E. (2002) GABA interacts with photic signaling in the suprachiasmatic nucleus to regulate circadian phase shifts. *Neuroscience*, 109, 773-778.
- Miyamoto, Y. & Sancar, A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6097-6102.
- Mock, E.J., Norton, H.W. & Frankel, A.I. (1978) Daily rhythmicity of serum testosterone concentration in the male laboratory rat. *Endocrinology*, 103, 1111-1121.
- Monder, C., Sakai, R.R., Miroff, Y., Blanchard, D.C. & Blanchard, R.J. (1994) Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 134, 1193-1198.
- Mong, J.A. & Pfaff, D.W. (2003) Hormonal and genetic influences underlying arousal as it drives sex and aggression in animal and human brains. *Neurobiol Aging*, 24 Suppl 1, S83-88; discussion S91-82.
- Moore, R.Y. & Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42, 201-206.
- Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K. & Kawata, M. (1996) Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26, 235-269.
- Morin, L.P., Fitzgerald, K.M., Rusak, B. & Zucker, I. (1977) Circadian organization and neural mediation of hamster reproductive rhythms. *Psychoneuroendocrinology*, 2, 73-98.
- Morin, L.P. & Cummings, L.A. (1981) Effect of surgical or photoperiodic castration, testosterone replacement or pinealectomy on male hamster running rhythmicity. *Physiol Behav*, 26, 825-838.

- Morin, L.P. & Blanchard, J. (1991) Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Res*, 566, 173-185.
- Morin, L.P., Blanchard, J. & Moore, R.Y. (1992) Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci*, 8, 219-230.
- Morin, L.P. & Blanchard, J.H. (1998) Interconnections among nuclei of the subcortical visual shell: the intergeniculate leaflet is a major constituent of the hamster subcortical visual system. *J Comp Neurol*, 396, 288-309.
- Morin, L.P. (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann Med*, 31, 12-33.
- Morin, L.P. & Meyer-Bernstein, E.L. (1999) The ascending serotonergic system in the hamster: comparison with projections of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuroscience*, 91, 81-105.
- Morin, L.P. & Wood, R.I. (2001) *A Stereotaxic Atlas of the Golden Hamster Brain*. Academic Press, San Diego, CA.
- Morin, L.P. & Blanchard, J.H. (2001) Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol*, 437, 79-90.
- Morin, L.P., Blanchard, J.H. & Provencio, I. (2003) Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J Comp Neurol*, 465, 401-416.
- Morin, L.P. & Allen, C.N. (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 51, 1-60.
- Moriya, T., Horikawa, K., Akiyama, M. & Shibata, S. (2000a) Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters. *Mol Pharmacol*, 58, 1554-1562.
- Moriya, T., Takahashi, S., Ikeda, M., Suzuki-Yamashita, K., Asai, M., Kadotani, H., Okamura, H., Yoshioka, T. & Shibata, S. (2000b) N-methyl-D-aspartate receptor subtype 2C is not involved in circadian oscillation or photic entrainment of the biological clock in mice. *J Neurosci Res*, 61, 663-673.
- Moscovitch, A., Blashko, C.A., Eagles, J.M., Darcourt, G., Thompson, C., Kasper, S. & Lane, R.M. (2004) A placebo-controlled study of sertraline in the treatment of outpatients with seasonal affective disorder. *Psychopharmacology (Berl)*, 171, 390-397.
- Mrosovsky, N. (1991) Double-pulse experiments with nonphotic and photic phase-shifting stimuli. *J Biol Rhythms*, 6, 167-179.
- Mrugala, M., Zlomanczuk, P., Jagota, A. & Schwartz, W.J. (2000) Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 278, R987-994.
- Muscat, L., Tischler, R.C. & Morin, L.P. (2005) Functional analysis of the role of the median raphe as a regulator of hamster circadian system sensitivity to light. *Brain Res*, 1044, 59-66.

N

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

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2004) Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology*, 145, 4565-4574.

Negri-Cesi, P., Celotti, F., Melcangi, R.C. & Martini, L. (1987) Androgen metabolism in the male hamster--1. Metabolism of testosterone in the pituitary gland and in the brain of animals exposed to different photoperiods. *J Steroid Biochem*, 28, 179-184.

Negri-Cesi, P., Celotti, F. & Martini, L. (1989) Androgen metabolism in the male hamster--2. Aromatization of androstenedione in the hypothalamus and in the cerebral cortex; kinetic parameters and effect of exposure to different photoperiods. *J Steroid Biochem*, 32, 65-70.

Nexon, L., Poirel, V.J., Clesse, D., Pevet, P. & Raison, S. (2009) Complex regional influence of photoperiod on the nycthemeral functioning of the dorsal and median raphe serotonergic system in the Syrian hamster. *Eur J Neurosci.*, Oct 26, 1790-1801.

Nuesslein-Hildesheim, B., O'Brien, J.A., Ebling, F.J., Maywood, E.S. & 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, 2856-2864.

O

Oishi, K., Fukui, H. & Ishida, N. (2000) Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 268, 164-171.

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

Orr, T.E. & Mann, D.R. (1992) Role of glucocorticoids in the stress-induced suppression of testicular steroidogenesis in adult male rats. *Horm Behav*, 26, 350-363.

Osborne, A.R. & Refinetti, R. (1995) Effects of hypothalamic lesions on the body temperature rhythm of the golden hamster. *Neuroreport*, 6, 2187-2192.

Otteweller, J.E., Tapp, W.N., Pitman, D.L. & Natelson, B.H. (1987) Adrenal, thyroid, and testicular hormone rhythms in male golden hamsters on long and short days. *Am J Physiol*, 253, R321-328.

Ozaki, N., Duncan, W.C., Jr., Johnson, K.A. & Wehr, T.A. (1993) Diurnal variations of serotonin and dopamine levels in discrete brain regions of Syrian hamsters and their modification by chronic clorgyline treatment. *Brain Res*, 627, 41-48.

Ozawa, H. (2005) Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch*, 72, 316-325.

P

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

Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I. & Kay, S.A. (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*, 298, 2213-2216.

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

Pecins-Thompson, M., Brown, N.A. & Bethea, C.L. (1998) Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. *Brain Res Mol Brain Res*, 53, 120-129.

Perlow, M.J., Reppert, S.M., Boyar, R.M. & Klein, D.C. (1981) Daily rhythms in cortisol and melatonin in primate cerebrospinal fluid. Effects of constant light and dark. *Neuroendocrinology*, 32, 193-196.

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

Pevet, P., Pitrosky, B., Vuillez, P., Jacob, N., Teclemariam-Mesbah, R., Kirsch, R., Vivien-Roels, B., Lakhdar-Ghazal, N., Canguilhem, B. & Masson-Pevet, M. (1996) The suprachiasmatic nucleus: the biological clock of all seasons. *Prog Brain Res*, 111, 369-384.

Pevet, P. (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol*, 15, 422-426.

Peyron, C., Petit, J.M., Rampon, C., Jouvret, M. & Luppi, P.H. (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82, 443-468.

Pickard, G.E., Smith, B.N., Belenky, M., Rea, M.A., Dudek, F.E. & Sollars, P.J. (1999) 5-HT_{1B} receptor-mediated presynaptic inhibition of retinal input to the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 19, 4034-4045.

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

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

Pieper, D.R. & Loboeki, C.A. (2000) Characterization of serum dehydroepiandrosterone secretion in golden hamsters. *Proc Soc Exp Biol Med*, 224, 278-284.

- Piggins, H.D., Marchant, E.G., Goguen, D. & Rusak, B. (2001) Phase-shifting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on hamster wheel-running rhythms. *Neurosci Lett*, 305, 25-28.
- Pinato, L., Ferreira, Z.S., Markus, R.P. & Nogueira, M.I. (2004) Bimodal daily variation in the serotonin content in the raphe nuclei of rats. *Biological Rhythm Research*, 35, 245-257.
- Pippal, J.B. & Fuller, P.J. (2008) Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol*, 41, 405-413.
- Pitrosky, B., Kirsch, R., Malan, A., Mocaer, E. & Pevet, P. (1999) Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am J Physiol*, 277, R812-828.
- Pittendrigh, C.S., Elliott, J. & Takamura, T. (1984) The Circadian Component in Photoperiodic Induction. *Ciba Foundation Symposia*, 104, 26-41.
- Pjrek, E., Konstantinidis, A., Assem-Hilger, E., Praschak-Rieder, N., Willeit, M., Kasper, S. & Winkler, D. (2009) Therapeutic effects of escitalopram and reboxetine in seasonal affective disorder: a pooled analysis. *J Psychiatr Res*, 43, 792-797.
- Poland, R.E., Rubin, R.T. & Weichsel, M.E., Jr. (1980) Circadian patterns of rat anterior pituitary and target gland hormones in serum: determination of the appropriate sample size by statistical power analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 5, 209-224.
- Poncet, L., Denoroy, L. & Jouvet, M. (1993) Daily variations in in vivo tryptophan hydroxylation and in the contents of serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in discrete brain areas of the rat. *J Neural Transm Gen Sect*, 92, 137-150.
- Popa, S.M., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2008) The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu Rev Physiol*, 70, 213-238.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. & Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110, 251-260.
- Prosser, R.A. (1998) Neuropeptide Y blocks serotonergic phase shifts of the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res*, 808, 31-41.
- Prosser, R.A. (1999) Melatonin inhibits in vitro serotonergic phase shifts of the suprachiasmatic circadian clock. *Brain Res*, 818, 408-413.
- Prossnitz, E.R., Arterburn, J.B. & Sklar, L.A. (2007) GPR30: A G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266, 138-142.
- Provencio, I., Rollag, M.D. & Castrucci, A.M. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, 415, 493.
- Puchalski, W. & Lynch, G.R. (1991) Circadian characteristics of Djungarian hamsters: effects of photoperiodic pretreatment and artificial selection. *Am J Physiol*, 261, R670-676.

R

- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. & Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975-978.
- Rapport, M.M. (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem*, 180, 961-969.
- Rapport, M.M., Green, A.A. & Page, I.H. (1948) Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem*, 174, 735-741.
- Rasmussen, K., Heym, J. & Jacobs, B.L. (1984) Activity of serotonin-containing neurons in nucleus centralis superior of freely moving cats. *Exp Neurol*, 83, 302-317.
- Raz, L., Khan, M.M., Mahesh, V.B., Vadlamudi, R.K. & Brann, D.W. (2008) Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals*, 16, 140-153.
- Rea, M.A. (1989) Light increases Fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Bull*, 23, 577-581.
- Rea, M.A., Glass, J.D. & Colwell, C.S. (1994) Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*, 14, 3635-3642.
- Reebs, S.G. & Mrosovsky, N. (1989) Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve. *J Biol Rhythms*, 4, 39-48.
- Refinetti, R. (1992) Non-parametric procedures for the determination of phase markers of circadian rhythms. *Int J Biomed Comput*, 30, 49-56.
- Refinetti, R., Kaufman, C.M. & Menaker, M. (1994) Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. *J Comp Physiol A*, 175, 223-232.
- Refinetti, R. (1995) Effects of suprachiasmatic lesions on temperature regulation in the golden hamster. *Brain Res Bull*, 36, 81-84.
- Refinetti, R. (1997) Phase relationship of the body temperature and locomotor activity rhythms in free-running and entrained rats. *Biological Rhythm Research*, 28, 19-24.
- Refinetti, R. (1999) Relationship between the daily rhythms of locomotor activity and body temperature in eight mammalian species. *Am J Physiol*, 277, R1493-1500.
- Refinetti, R. (2002) Compression and expansion of circadian rhythm in mice under long and short photoperiods. *Integr Physiol Behav Sci*, 37, 114-127.
- Reiter, R.J. (1972) Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal axis to the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. *Anat Rec*, 173, 365-371.
- Reiter, R.J. & Johnson, L.Y. (1974) Depressant action of the pineal gland on pituitary luteinizing hormone and prolactin in male hamsters. *Horm Res*, 5, 311-320.
- Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418, 935-941.

- Reul, J.M. & de Kloet, E.R. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117, 2505-2511.
- Reul, J.M., van den Bosch, F.R. & de Kloet, E.R. (1987) Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology*, 45, 407-412.
- Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D. & Simonneaux, V. (2006) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol*, 16, 1730-1735.
- Ribelayga, C., Garidou, M.L., Malan, A., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P. & Simonneaux, V. (1999) Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms*, 14, 105-115.
- Robichaud, M. & Debonnel, G. (2005) Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. *J Neuroendocrinol*, 17, 179-185.
- Rodgers, R.J. & Cole, J.C. (1993) Anxiety enhancement in the murine elevated plus maze by immediate prior exposure to social stressors. *Physiol Behav*, 53, 383-388.
- Rodriguez, J.J., Montaron, M.F., Petry, K.G., Aourousseau, C., Marinelli, M., Premier, S., Rougon, G., Le Moal, M. & Abrous, D.N. (1998) Complex regulation of the expression of the polysialylated form of the neuronal cell adhesion molecule by glucocorticoids in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*, 10, 2994-3006.
- Rohling, J., Meijer, J.H., VanderLeest, H.T. & Admiraal, J. (2006) Phase differences between SCN neurons and their role in photoperiodic encoding; a simulation of ensemble patterns using recorded single unit electrical activity patterns. *J Physiol Paris*, 100, 261-270.
- Roland, B.L. & Sawchenko, P.E. (1993) Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*, 332, 123-143.
- Ronchi, E., Aoki, C., Krey, L.C. & Pfaff, D.W. (1992a) Immunocytochemical study of GnRH and GnRH-associated peptide in male Syrian hamsters as a function of photoperiod and gonadal alterations. *Neuroendocrinology*, 55, 134-145.
- Ronchi, E., Krey, L.C. & Pfaff, D.W. (1992b) Steady state analysis of hypothalamic GnRH mRNA levels in male Syrian hamsters: influences of photoperiod and androgen. *Neuroendocrinology*, 55, 146-155.
- Ronchi, E., Spencer, R.L., Krey, L.C. & McEwen, B.S. (1998) Effects of photoperiod on brain corticosteroid receptors and the stress response in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Brain Res*, 780, 348-351.
- Rosenfeld, P., Van Eekelen, J.A., Levine, S. & De Kloet, E.R. (1988) Ontogeny of the type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 470, 119-127.
- Rosenthal, N.E., Sack, D.A., Gillin, J.C., Lewy, A.J., Goodwin, F.K., Davenport, Y., Mueller, P.S., Newsome, D.A. & Wehr, T.A. (1984) Seasonal affective disorder. A description of the syndrome and preliminary findings with light therapy. *Arch Gen Psychiatry*, 41, 72-80.

Rosenwasser, A.M. & Dwyer, S.M. (2001) Circadian phase shifting: Relationships between photic and nonphotic phase-response curves. *Physiol Behav*, 73, 175-183.

Roumestan, C., Gougat, C., Jaffuel, D. & Mathieu, M. (2004) [Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications]. *Rev Med Interne*, 25, 636-647.

Rueter, L.E., Fornal, C.A. & Jacobs, B.L. (1997) A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. *Rev Neurosci*, 8, 117-137.

Ruhrmann, S., Kasper, S., Hawellek, B., Martinez, B., Hoflich, G., Nickelsen, T. & Moller, H.J. (1998) Effects of fluoxetine versus bright light in the treatment of seasonal affective disorder. *Psychol Med*, 28, 923-933.

Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W. & Hunt, S.P. (1990) Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, 248, 1237-1240.

S

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

Sakai, K. & Crochet, S. (2000) Serotonergic dorsal raphe neurons cease firing by disfacilitation during paradoxical sleep. *Neuroreport*, 11, 3237-3241.

Samson, W.K., Taylor, M.M. & Baker, J.R. (2003) Prolactin-releasing peptides. *Regul Pept*, 114, 1-5.

Sanchez, R.L., Reddy, A.P., Centeno, M.L., Henderson, J.A. & Bethea, C.L. (2005) A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain Res Mol Brain Res*, 135, 194-203.

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

Scarbrough, K., Losee-Olson, S., Wallen, E.P. & Turek, F.W. (1997) Aging and photoperiod affect entrainment and quantitative aspects of locomotor behavior in Syrian hamsters. *Am J Physiol*, 272, R1219-1225.

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

Schmidt, B.J. & Jordan, L.M. (2000) The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Res Bull*, 53, 689-710.

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

Schuhler, S., Pitrosky, B., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N. & Pevet, P. (1999) Role of the thalamic intergeniculate leaflet and its 5-HT afferences in the chronobiological properties of 8-OH-DPAT and triazolam in syrian hamster. *Brain Res*, 849, 16-24.

- Schuhler, S., Clark, A., Joseph, W., Patel, A., Lehnen, K., Stratford, E., Horan, T.L., Fone, K.C. & Ebling, F.J. (2005) Involvement of 5-HT receptors in the regulation of food intake in Siberian hamsters. *J Neuroendocrinol*, 17, 276-285.
- Schwartz, W.J., Gross, R.A. & Morton, M.T. (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 1694-1698.
- Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Bate, E., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Jessop, D.S. & Harbuz, M.S. (2004a) Gonadectomy reverses the sexually dimorphic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol*, 16, 516-524.
- Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Harbuz, M.S. & Lightman, S.L. (2004b) Gonadal steroid replacement reverses gonadectomy-induced changes in the corticosterone pulse profile and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male and female rats. *J Neuroendocrinol*, 16, 989-998.
- Segall, L.A., Perrin, J.S., Walker, C.D., Stewart, J. & Amir, S. (2006) Glucocorticoid rhythms control the rhythm of expression of the clock protein, *Period2*, in oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala in rats. *Neuroscience*, 140, 753-757.
- Segall, L.A., Milet, A., Tronche, F. & Amir, S. (2009) Brain glucocorticoid receptors are necessary for the rhythmic expression of the clock protein, *PERIOD2*, in the central extended amygdala in mice. *Neurosci Lett*, 457, 58-60.
- Selim, M., Glass, J.D., Hauser, U.E. & Rea, M.A. (1993) Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*, 621, 181-188.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Jr. & Reppert, S.M. (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19, 1261-1269.
- Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T., Hastings, M.H. & Reppert, S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288, 1013-1019.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C. & Okamura, H. (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell*, 91, 1043-1053.
- Shishkina, G.T., Kalinina, T.S. & Dygalo, N.N. (2007) Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. *Neuroscience*, 150, 404-412.
- Sijbesma, H., Schipper, J. & de Kloet, E.R. (1990) Eltoprazine, a drug which reduces aggressive behaviour, binds selectively to 5-HT₁ receptor sites in the rat brain: an autoradiographic study. *Eur J Pharmacol*, 177, 55-66.
- Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A. & Lehman, M.N. (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*, 382, 810-813.
- Simansky, K.J. (1996) Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res*, 73, 37-42.

- 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.
- Simpkins, J.W., Kalra, P.S. & Kalra, S.P. (1981) Alterations in daily rhythms of testosterone and progesterone in old male rats. *Exp Aging Res*, 7, 25-32.
- Sinei, K.A. & Redfern, P.H. (1993) The effects of chronic clomipramine and mianserin on the activity of tryptophan hydroxylase in the rat brain. *East Afr Med J*, 70, 721-724.
- Sinei, K.A. & Redfern, P.H. (1994) Effects of the antidepressant drugs clomipramine and mianserin on tryptophan hydroxylase activity in the rat brain, measured at two points in the light/dark cycle. *Chronobiol Int*, 11, 27-34.
- Smart, C.M. & Biello, S.M. (2001) WAY-100635, a specific 5-HT_{1A} antagonist, can increase the responsiveness of the mammalian circadian pacemaker to photic stimuli. *Neurosci Lett*, 305, 33-36.
- Smith, G.S., Savery, D., Marden, C., Lopez Costa, J.J., Averill, S., Priestley, J.V. & Rattray, M. (1994) Distribution of messenger RNAs encoding enkephalin, substance P, somatostatin, galanin, vasoactive intestinal polypeptide, neuropeptide Y, and calcitonin gene-related peptide in the midbrain periaqueductal grey in the rat. *J Comp Neurol*, 350, 23-40.
- Smith, J.T., Dungan, H.M., Stoll, E.A., Gottsch, M.L., Braun, R.E., Eacker, S.M., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. (2005) Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*, 146, 2976-2984.
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E. & Steiner, R.A. (2006) Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci*, 26, 6687-6694.
- Smith, R.D., Inouye, S. & Turek, F.W. (1989) Central administration of muscimol phase-shifts the mammalian circadian clock. *J Comp Physiol A*, 164, 805-814.
- Solito, E., Mulla, A., Morris, J.F., Christian, H.C., Flower, R.J. & Buckingham, J.C. (2003) Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*, 144, 1164-1174.
- Son, G.H., Chung, S., Choe, H.K., Kim, H.D., Baik, S.M., Lee, H., Lee, H.W., Choi, S., Sun, W., Kim, H., Cho, S., Lee, K.H. & Kim, K. (2008) Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20970-20975.
- Srkalovic, G., Selim, M., Rea, M.A. & Glass, J.D. (1994) Serotonergic inhibition of extracellular glutamate in the suprachiasmatic nuclear region assessed using in vivo brain microdialysis. *Brain Res*, 656, 302-308.
- Staub, D.R., Spiga, F. & Lowry, C.A. (2005) Urocortin 2 increases c-Fos expression in topographically organized subpopulations of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res*, 1044, 176-189.
- Staub, D.R., Evans, A.K. & Lowry, C.A. (2006) Evidence supporting a role for corticotropin-releasing factor type 2 (CRF2) receptors in the regulation of subpopulations of serotonergic neurons. *Brain Res*, 1070, 77-89.

Steger, R.W., Bartke, A. & Goldman, B.D. (1982) Alterations in neuroendocrine function during photoperiod induced testicular atrophy and recrudescence in the golden hamster. *Biol Reprod*, 26, 437-444.

Steinmayr, M., Andre, E., Conquet, F., Rondi-Reig, L., Delhay-Bouchaud, N., Auclair, N., Daniel, H., Crepel, F., Mariani, J., Sotelo, C. & Becker-Andre, M. (1998) staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 3960-3965.

Stephan, F.K. & Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 1583-1586.

Sugden, D. & Morris, R.D. (1979) Changes in regional brain levels of tryptophan, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid, dopamine and noradrenaline after pinealectomy in the rat. *J Neurochem*, 32, 1593-1595.

Sumi, Y., Yagita, K., Yamaguchi, S., Ishida, Y., Kuroda, Y. & Okamura, H. (2002) Rhythmic expression of ROR beta mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 320, 13-16.

Sumova, A., Travnickova, Z. & Illnerova, H. (1995a) Memory on long but not on short days is stored in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 200, 191-194.

Sumova, A., Travnickova, Z., Peters, R., Schwartz, W.J. & Illnerova, H. (1995b) The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7754-7758.

Sumova, A. & Illnerova, H. (1996) Endogenous melatonin signal does not mediate the effect of photoperiod on the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 725, 281-283.

Sumova, A., Sladek, M., Jac, M. & Illnerova, H. (2002) The circadian rhythm of Per1 gene product in the rat suprachiasmatic nucleus and its modulation by seasonal changes in daylength. *Brain Res*, 947, 260-270.

Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. & Lee, C.C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell*, 90, 1003-1011.

Sutanto, W. & De Kloet, E.R. (1987) Species-specificity of corticosteroid receptors in hamster and rat brains. *Endocrinology*, 121, 1405-1411.

Sutanto, W., Reul, J.M., van Eekelen, J.A. & de Kloet, E.R. (1988a) Corticosteroid receptor analyses in rat and hamster brains reveal species specificity in the type I and type II receptors. *J Steroid Biochem*, 30, 417-420.

Sutanto, W., van Eekelen, J.A., Reul, J.M. & de Kloet, E.R. (1988b) Species-specific topography of corticosteroid receptor types in rat and hamster brain. *Neuroendocrinology*, 47, 398-404.

T

Takahashi, K., Inoue, K. & Takahashi, Y. (1977) Parallel shift in circadian rhythms of adrenocortical activity and food intake in blinded and intact rats exposed to continuous illumination. *Endocrinology*, 100, 1097-1107.

- Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N. & Okamura, H. (1998a) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, 3, 167-176.
- Takumi, T., Taguchi, K., Miyake, S., Sakakida, Y., Takashima, N., Matsubara, C., Maebayashi, Y., Okumura, K., Takekida, S., Yamamoto, S., Yagita, K., Yan, L., Young, M.W. & Okamura, H. (1998b) A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVLT. *EMBO J*, 17, 4753-4759.
- Tamarkin, L., Hutchison, J.S. & Goldman, B.D. (1976) Regulation of serum gonadotropins by photoperiod and testicular hormone in the Syrian hamster. *Endocrinology*, 99, 1528-1533.
- Tamaru, T., Isojima, Y., Yamada, T., Okada, M., Nagai, K. & Takamatsu, K. (2000) Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci*, 20, 7525-7530.
- Tecler-Mesbah, R., Ter Horst, G.J., Postema, F., Wortel, J. & Buijs, R.M. (1999) Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway. *J Comp Neurol*, 406, 171-182.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. & Sakaki, Y. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*, 389, 512-516.
- Teodoru, C.V. & Schwartzman, G. (1954) Relation of certain endocrine disturbances to susceptibility of golden Syrian hamster to experimental poliomyelitis. *J Exp Med*, 100, 563-574.
- Thorell, L.H., Kjellman, B., Arned, M., Lindwall-Sundel, K., Walinder, J. & Wetterberg, L. (1999) Light treatment of seasonal affective disorder in combination with citalopram or placebo with 1-year follow-up. *Int Clin Psychopharmacol*, 14 Suppl 2, S7-11.
- Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Tyan, S.H., Buchanan, G.F. & Gillette, M.U. (2003) Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of *Per1* is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem*, 278, 718-723.
- Tischler, R.C. & Morin, L.P. (2003) Reciprocal serotonergic connections between the hamster median and dorsal raphe nuclei. *Brain Res*, 981, 126-132.
- Tominaga, K., Shibata, S., Ueki, S. & Watanabe, S. (1992) Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on the circadian rhythm of wheel-running activity in hamsters. *Eur J Pharmacol*, 214, 79-84.
- Tork, I. (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci*, 600, 9-34; discussion 34-35.
- Tournier, B.B., Dardente, H., Vuillez, P., Pevet, P. & Challet, E. (2007) Expression of *Tgfa* in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Neuroscience*, 145, 1138-1143.
- Tournier, B.B., Menet, J.S., Dardente, H., Poirel, V.J., Malan, A., Masson-Pevet, M., Pevet, P. & Vuillez, P. (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience*, 118, 317-322.
- Tournier, B.B., Birkenstock, J., Pevet, P. & Vuillez, P. (2009) Gene expression in the suprachiasmatic nuclei and the photoperiodic time integration. *Neuroscience*, 160, 240-247.
- Trulsson, M.E. & Jacobs, B.L. (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res*, 163, 135-150.

- Tsuchiya, T. & Horii, I. (1995a) Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male Syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 95-102.
- Tsuchiya, T. & Horii, I. (1995b) Immobilization-induced stress decreases lipogenesis in sebaceous glands as well as plasma testosterone levels in male Syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology*, 20, 221-230.
- Tsuchiya, T. & Horii, I. (1996) Epidermal cell proliferative activity assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) decreases following immobilization-induced stress in male Syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology*, 21, 111-117.
- Turek, F.W., Elliott, J.A., Alvis, J.D. & Menaker, M. (1975) The interaction of castration and photoperiod in the regulation of hypophyseal and serum gonadotropin levels in male golden hamsters. *Endocrinology*, 96, 854-860.
- Turek, F.W., Alvis, J.D., Elliott, J.A. & Menaker, M. (1976) Temporal distribution of serum levels of LH and FSH in adult male golden hamsters exposed to long or short days. *Biol Reprod*, 14, 630-631.
- Turek, F.W. (1977) The interaction of the photoperiod and testosterone in regulating serum gonadotropin levels in castrated male hamsters. *Endocrinology*, 101, 1210-1215.
- Turek, F.W. & Losee-Olson, S. (1986) A benzodiazepine used in the treatment of insomnia phase-shifts the mammalian circadian clock. *Nature*, 321, 167-168.
- Twarog, B.M. & Page, I.H. (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, 175, 157-161.

U/ V

- Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y. & Hashimoto, S. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418, 534-539.
- Uhl, G.R. & Reppert, S.M. (1986) Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science*, 232, 390-393.
- Valentino, R.J., Liouterman, L. & Van Bockstaele, E.J. (2001) Evidence for regional heterogeneity in corticotropin-releasing factor interactions in the dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*, 435, 450-463.
- Van Bockstaele, E.J., Biswas, A. & Pickel, V.M. (1993) Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res*, 624, 188-198.
- Van de Kar, L.D. (1991) Neuroendocrine pharmacology of serotonergic (5-HT) neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 31, 289-320.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. & Yasui, A. (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398, 627-630.

- Van Reeth, O. & Turek, F.W. (1989) Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by dark pulses or benzodiazepines. *Nature*, 339, 49-51.
- VanderLeest, H.T., Houben, T., Michel, S., Deboer, T., Albus, H., Vansteensel, M.J., Block, G.D. & Meijer, J.H. (2007) Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. *Curr Biol*, 17, 468-473.
- vanderLeest, H.T., Rohling, J.H., Michel, S. & Meijer, J.H. (2009) Phase shifting capacity of the circadian pacemaker determined by the SCN neuronal network organization. *PLoS ONE*, 4, e4976.
- Vertes, R.P. & Crane, A.M. (1997) Distribution, quantification, and morphological characteristics of serotonin-immunoreactive cells of the suprallemniscal nucleus (B9) and pontomesencephalic reticular formation in the rat. *J Comp Neurol*, 378, 411-424.
- Viau, V. & Meaney, M.J. (1996) The inhibitory effect of testosterone on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress is mediated by the medial preoptic area. *J Neurosci*, 16, 1866-1876.
- Viau, V., Chu, A., Soriano, L. & Dallman, M.F. (1999) Independent and overlapping effects of corticosterone and testosterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and stress-induced adrenocorticotrophic hormone release. *J Neurosci*, 19, 6684-6693.
- Viau, V. & Meaney, M.J. (2004) Testosterone-dependent variations in plasma and intrapituitary corticosteroid binding globulin and stress hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the male rat. *J Endocrinol*, 181, 223-231.
- Villar, M.J., Vitale, M.L., Hokfelt, T. & Verhofstad, A.A. (1988) Dorsal raphe serotonergic branching neurons projecting both to the lateral geniculate body and superior colliculus: a combined retrograde tracing-immunohistochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, 277, 126-140.
- Vitale, M.L. & Chiochio, S.R. (1993) Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocr Rev*, 14, 480-493.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W. & Takahashi, J.S. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*, 264, 719-725.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S. & Sancar, A. (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12114-12119.
- Vitaterna, M.H. & Turek, F.W. (1993) Photoperiodic responses differ among inbred strains of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Biol Reprod*, 49, 496-501.
- Vosko, A.M., Schroeder, A., Loh, D.H. & Colwell, C.S. (2007) Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. *Gen Comp Endocrinol*, 152, 165-175.
- Vrang, N., Mrosovsky, N. & Mikkelsen, J.D. (2003) Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res Bull*, 59, 267-288.
- Vuillez, P., Jacob, N., Tecler-Mesbah, R. & Pevet, P. (1996) In Syrian and European hamsters, the duration of sensitive phase to light of the suprachiasmatic nuclei depends on the photoperiod. *Neurosci Lett*, 208, 37-40.

Vuillez, P., Jacob, N., Tecler-Mesbah, R., Van Rossum, A., Vivien-Roels, B. & Pevet, P. (1998) Effect of NMDA receptor antagonist MK-801 on light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nuclei and on melatonin production in the Syrian hamster. *J Neuroendocrinol*, 10, 671-677.

W

Wade, G.N. (1983) Dietary obesity in golden hamsters: reversibility and effects of sex and photoperiod. *Physiol Behav*, 30, 131-137.

Waite, E., Kershaw, Y., Spiga, F. & Lightman, S.L. (2009) A glucocorticoid sensitive biphasic rhythm of testosterone secretion. *J Neuroendocrinol*.

Wakamatsu, H., Takahashi, S., Moriya, T., Inouye, S.T., Okamura, H., Akiyama, M. & Shibata, S. (2001) Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. *Neuroreport*, 12, 127-131.

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

Wang, Q.P. & Nakai, Y. (1994) The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull*, 34, 575-585.

Weber, E.T., Gannon, R.L. & Rea, M.A. (1998) Local administration of serotonin agonists blocks light-induced phase advances of the circadian activity rhythm in the hamster. *J Biol Rhythms*, 13, 209-218.

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

Wickland, C.R. & Turek, F.W. (1991) Phase-shifting effects of acute increases in activity on circadian locomotor rhythms in hamsters. *Am J Physiol*, 261, R1109-1117.

Wilson, M.J., McMillin, J.M., Seal, U.S. & Ahmed, K. (1976) Circadian variation of serum testosterone in the adult male rat with a late morning acrophase. *Experientia*, 32, 944-945.

Wirz-Justice, A., Krauchi, K., Morimasa, T., Willener, R. & Feer, H. (1983) Circadian rhythm of [3H]imipramine binding in the rat suprachiasmatic nuclei. *Eur J Pharmacol*, 87, 331-333.

Witkin, J.W., Paden, C.M. & Silverman, A.J. (1982) The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 35, 429-438.

Wood, R.I. & Newman, S.W. (1995) Androgen and estrogen receptors coexist within individual neurons in the brain of the Syrian hamster. *Neuroendocrinology*, 62, 487-497.

X / Y

Xu, Z.Q. & Hokfelt, T. (1997) Expression of galanin and nitric oxide synthase in subpopulations of serotonin neurons of the rat dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat*, 13, 169-187.

- Ying, S.W. & Rusak, B. (1994) Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 651, 37-46.
- Ying, S.W. & Rusak, B. (1997) 5-HT₇ receptors mediate serotonergic effects on light-sensitive suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res*, 755, 246-254.
- Yokota, S.I., Horikawa, K., Akiyama, M., Moriya, T., Ebihara, S., Komuro, G., Ohta, T. & Shibata, S. (2000) Inhibitory action of brotizolam on circadian and light-induced *per1* and *per2* expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol*, 131, 1739-1747.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K. & Gustafsson, J.A. (2008) Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*, 6, e003.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A. & Lee, C.C. (2001) Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, 105, 683-694.
- Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C. & Bradley, A. (1999) The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature*, 400, 169-173.
- Zhou, F.C., Tao-Cheng, J.H., Segu, L., Patel, T. & Wang, Y. (1998) Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res*, 805, 241-254.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R. & Reppert, S.M. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20, 1103-1110.

La photopériode, durée de la période lumineuse sur 24h, permet aux mammifères de se situer dans le temps saisonnier. Parmi les mammifères particulièrement sensibles à l'alternance des saisons, le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) constitue un animal modèle. Pour faire face à l'évolution saisonnière des conditions environnementales, ce rongeur nocturne exprime, entre photopériode longue (PL) et photopériode courte (PC), des changements physiologiques et comportementaux profonds. Un grand nombre de ces paramètres physiologiques et comportementaux saisonniers sont régulés par le système sérotoninergique du raphé dorsal (DR) et médian (MnR). De plus, **la sérotonine (5-HT) est un modulateur critique de la synchronisation journalière de l'horloge circadienne centrale**, les noyaux suprachiasmatiques (SCN), **structure indispensable à l'expression des changements physiologiques et comportementaux induits par la photopériode**. Nous avons donc cherché à déterminer si les modifications saisonnières des paramètres régulés par la 5-HT étaient sous-tendues par une modulation photopériodique du fonctionnement journalier des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR.

Cette étude a été initiée par l'analyse de la distribution des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR le long de l'axe caudo-rostral, travail nécessaire pour approcher la complexité régionale de ces noyaux. Plusieurs régions et sous-régions ont été définies, en fonction de critères morphologiques tissulaires et cellulaires.

L'influence de la photopériode sur le système sérotoninergique des différentes régions du DR et du MnR a été abordée par l'étude sur 24h, chez des hamsters en PL et en PC, de plusieurs paramètres du fonctionnement du système 5-HT : 1) la tryptophane hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT, tant au niveau de l'expression du gène *tph2* que de la protéine TPH ; 2) le turnover de la 5-HT, estimé par le ratio entre les concentrations du neurotransmetteur et celles de son produit de dégradation. En PL, tous ces paramètres sont exprimés de manière rythmique sur 24h. En PC, le caractère rythmique est supprimé. **Il apparaît donc que l'un des effets majeurs de la photopériode soit de modifier la régulation journalière de la synthèse de 5-HT.**

Ces résultats soulèvent deux interrogations : quelle est l'origine des variations journalières et photopériodiques du fonctionnement des neurones 5-HT ? L'horloge circadienne des SCN est susceptible de distribuer ces deux types de messages rythmiques. Nous avons envisagé l'implication de deux messagers hormonaux, dont la libération journalière et photopériodique est dépendante des SCN, ayant chacun un rôle connu de modulateur du système 5-HT : les glucocorticoïdes et la testostérone.

Le rôle des glucocorticoïdes a été étudié chez des hamsters en PL ; chez ces animaux, la suppression expérimentale du pic de glucocorticoïdes, conduisant à un statut hormonal comparable à celui mesuré en PC, induit une abolition des variations journalières de l'expression de *tph2*. Celles-ci sont rétablies après restauration artificielle du rythme de glucocorticoïdes. **Le rythme de glucocorticoïdes est donc nécessaire à l'établissement des variations journalières de l'expression de *tph2* en PL ; son abolition en PC semble un facteur critique à la perte du fonctionnement rythmique des neurones 5-HT.**

Le rôle de la testostérone a également été étudié chez des hamsters en PL ; la suppression expérimentale des concentrations plasmatiques de l'hormone, statut hormonal similaire à celui mesuré en PC, abolit les variations journalières de l'expression de *tph2*. **La testostérone semble donc également impliquée à la fois dans la régulation journalière et photopériodique de l'expression de *tph2*.** Il reste cependant à déterminer si l'hormone agit de façon directe sur le fonctionnement des neurones 5-HT, ou de manière indirecte *via* une modulation de la sécrétion rythmique de glucocorticoïdes.

Ces résultats pris dans leur ensemble mettent en évidence que la photopériode régule le fonctionnement journalier des neurones sérotoninergiques du DR et du MnR par l'intermédiaire de médiateurs endocriniens. Considérant le rôle central du système sérotoninergique dans la synchronisation circadienne de l'horloge centrale et dans la modulation de nombreuses fonctions cérébrales, le DR et le MnR apparaissent comme une structure capable de distribuer des messages journaliers et photopériodiques à l'ensemble de l'encéphale.