

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives
CNRS-UPR3212

THÈSE

présentée par :

Amélie CASTANHO

soutenue le : 5 Septembre 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université De Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

Effets de l'agomélatine et de la mélatonine sur les oscillations de l'horloge circadienne *Études physiologiques et moléculaires*

MEMBRES DU JURY :

Directeur de thèse :

M. PÉVET Paul

Directeur de recherche, INCI, Université de Strasbourg

Examineur interne :

M^{me} FREUND-MERCIER Marie-José

Professeur, INCI, Université de Strasbourg

Rapporteurs externes :

M. CLAUSTRAT Bruno

Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard,
Hospices Civils de Lyon, INSERM U846

M^{me} MIGAUD Martine

Chargée de recherche, INRA, Université de Tours

"La musique est un labyrinthe où l'on n'a jamais fini d'entrer et de sortir, de découvrir de nouveaux chemins, dont on n'a jamais épuisé le mystère."

Pierre Boulez, compositeur, XX^{ème} s.

...et si la musique était une science.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury qui ont eu l'obligeance d'évaluer mon travail de thèse.

*J'ai eu le plaisir de rencontrer le **Pr Marie-José Freund-Mercier** et le **Dr Bruno Claustrat** lors de mon comité de demi-thèse où j'ai su apprécier un regard objectif et averti, sur les travaux que je vous avais présenté. Je suis honorée que vous ayez accepté d'évaluer, cette fois-ci, l'ensemble de mon travail de thèse.*

*Lors du congrès de la Société Francophone de Chronobiologie à Loches, j'ai pu rencontrer brièvement le **Dr Martine Migaud** et c'est un honneur pour moi que cette rencontre puisse se prolonger, en acceptant d'être rapporteur de ce travail.*

*À la sortie de mon Master, je me suis présentée auprès de vous, **Dr Paul Pévet**, comme étudiante sans grands bagages dans le domaine des rythmes. Aujourd'hui, je vous remercie particulièrement de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Vous avez su me transmettre vos connaissances dans la neurobiologie des rythmes mais pas uniquement, vous m'avez ouvert un regard avisé sur les sciences au sens large et j'en ressors maintenant grandie. Merci d'avoir dirigé cette thèse avec toute l'expertise que l'on vous connaît. Sans votre expérience, cette thèse n'aurait pas eu la même tonalité.*

*Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à mon encadrante, le **Dr Béatrice Bothorel**. Vous m'avez transmis vos compétences scientifiques avec dextérité et rigueur, j'ai toujours pu compter sur votre encadrement indéfectible. Mais au-delà des aspects scientifiques vous avez su m'écouter, m'encourager, me soutenir dans tous les moments de cette thèse et une belle harmonie a pu se former.*

*Je remercie également le **Dr Elisabeth Mocaër** et le **Dr Laure Seguin** d'avoir suivi avec égard les avancées des travaux de thèse. À Chaque rencontre votre expertise m'a été d'une grande aide et m'a permis de garder le tempo.*

*Je souhaite remercier le **Dr Jorge Mendoza** pour son encadrement, pendant les études in vitro, mené avec pédagogie tout en apportant un peu de folklore.*

*La recherche est avant tout un esprit d'équipe, je souhaite adresser mes remerciements sincères au **Dr Valérie Simonneaux**, pour l'accueil au sein de son équipe et de m'avoir apporté ces conseils judicieux qui arrivaient toujours à la bonne mesure. Merci à l'ensemble de l'équipe d'avoir apporté un regard impartial sur mon travail.*

*C'est avec beaucoup de respect que je présente mes remerciements au **Dr Michel Saboureau** qui, pour l'instant d'une manip, n'a pas hésité à me montrer toutes les astuces et les petits secrets de la microdialyse. Je vous souhaite une retraite toute en mélodie à Poitiers auprès de vos enfants et petits enfants.*

*Je remercie le **Dr Dominique Ciocca** pour son assistance avec les animaux lors des protocoles expérimentaux ainsi qu'à l'ensemble de la troupe du Chronobiotron, **Daniel Bonn**, **Anita Wulgué**, **Aurore Senser** et **Nicolas Lethenet**.*

***Christiane Tavernier** et **Claudine Boissier**, une sonate en duo entraînante, par leur jovialité et leur sympathie. Je tiens particulièrement à vous remercier pour avoir su enseigner mes journées pluvieuses. Je garderai de très bons souvenirs intra et extra labo.*

*Toute mon affection au **Dr Caroline Ancel** (depuis peu) qui a apporté beaucoup de nuances dans mon quotidien au labo, jamais de demi mesure, toujours là pour me soutenir aussi bien professionnellement que personnellement. Tellement de chose... qu'en bref, merci de ton amitié. Je suis convaincue que tu réussiras en Nouvelle Zélande.*

*Je tiens à remercier le **Dr Isabelle Bur** pour toutes les discussions scientifiques et non scientifiques partagées a capella. Cela a été un réel plaisir d'être ta collègue mais également ta voisine et te souhaite beaucoup de bonheur à toi et à ta petite famille.*

Merci, à Sylviane Gourmelen, Guy Normand, Dominique Streicher, et Daniel Clesse, pour tous ces interludes au détour d'un couloir.

Une pensée pour les doctorants (David Chassard, Jo Henningsen, Catherine Jaeger) et post doctorant (Stéphanie Monecke) avec qui j'ai pu échanger quelques notes.

*Il y a des personnes, qui, en l'absence de leur soutien et de leurs encouragements tout vous paraît impossible. Merci à toi, **Maman**, de m'avoir porté, d'avoir toujours été présente et de m'avoir amené là où j'en suis aujourd'hui. Je sais que cela a impliqué des sacrifices mais on y est maintenant arrivé. Merci à mon **Frère** qui par son allégresse m'a accordé de vrais moments de pause et ils ont été précieux pour moi.*

*Il a été ma clé de sol durant toute cette thèse, il a supporté mes baisses de moral, mes humeurs variables quand une manip ne se déroulait pas comme voulue, les longues soirées au labo mais il n'a jamais failli. Merci à mon mari, **Adil**, qui a su se montrer calme et compréhensif et je suis heureuse de partager cet événement de ma vie (un de plus) à tes côtés.*



Tout une symphonie, ne suffirait pas à vous dire simplement Merci

Table des matières

Introduction générale	1
I. Les rythmes biologiques.....	2
II. Le système circadien chez les Mammifères.....	4
1. Origine des rythmes circadiens	4
2. L'horloge biologique interne... "le chef d'orchestre qui bat la mesure" ..	5
2.1. Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) : l'horloge "maîtresse"	5
a. Démonstrations expérimentales	5
b. Anatomie et histophysiologie.....	8
2.2. Genèse des rythmes dans les NSC	9
a. Détermination génétique et mécanismes moléculaires	9
b. Activité électrique endogène des NSC.....	12
c. Le couplage intercellulaire ou quand l'union fait la force.	13
2.3. Synchronisation de l'horloge "maîtresse" à 24 h	14
a. Réception et transmission des signaux extérieurs à l'horloge : les différentes voies nerveuses impliquées	15
b. Synchronisation photique.....	18
c. Synchronisation non photique	20
2.4. Distribution du message temporel : les différentes voies efférentes.....	23
a. Sorties nerveuses, humorales et hormonales des NSC.....	23
b. Implication des oscillateurs périphériques	24
3. Le rythme de sécrétion de la mélatonine... "le premier violon qui donne le LA"	25
3.1. Synthèse de la mélatonine	25
a. La glande pinéale : lieu de synthèse de la mélatonine	25
b. Voie de biosynthèse de la mélatonine	26
c. Sécrétion de la mélatonine	26
d. Catabolisme de la mélatonine	28
3.2. Sites et mécanismes d'action	28

a. Les récepteurs de la mélatonine	28
b. Voies de transduction du signal mélatonine	29
3.3. Rôles physiologiques de la mélatonine au sein du système circadien	30
a. Propriétés chronobiotiques de la mélatonine exogène	31
b. Action de la mélatonine exogène sur l'horloge centrale.....	33
III. Dépression et rythmes circadiens	34
1. Troubles des rythmes circadiens et dépression... "quand la musique s'emballe"	35
1.1. Variations circadiennes de l'humeur dépressive.....	35
1.2. Perturbations du rythme veille-sommeil	36
1.3. Altération des paramètres biologiques dans l'épisode dépressif majeur	36
2. L'agomélatine, un antidépresseur atypique... "le métronome qui s'impose"	39
2.1. Caractéristiques chimiques et métaboliques de l'agomélatine.....	39
2.2. Propriétés agonistes mélatoninergiques	40
2.3. Propriétés antagonistes sérotoninergiques	41
2.4. Effet antidépresseur de l'agomélatine	42
a. Action sur différents modèles expérimentaux.....	42
b. Études cliniques	44
IV. Objectifs des travaux	45

Première partition : études *in vivo* de deux sorties

circadiennes de l'horloge.....47

I. Effets de l'agomélatine sur le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène et de la température corporelle.....	48
1. Introduction	48
2. Matériels et méthodes	50
2.1. Animaux.....	50
2.2. Procédures chirurgicales	50
a. Dialyse de la glande pinéale.....	50

b. I-Buttons.....	51
2.3. Drogues et produits chimiques.....	52
2.4. Procédure expérimentale.....	52
2.5. Dosage radio-immunologique.....	52
2.6. Analyses des données et statistiques.....	53
3. Résultats.....	54
3.1. Profils journaliers de la mélatonine.....	54
a. Effets sur l'amplitude.....	55
b. Variables du rythme de mélatonine (<i>IT50</i> , <i>DT50</i> et durée du pic).....	56
3.2. Profils journaliers de la température corporelle.....	62
4. Discussion.....	63
4.1. Augmentation de l'amplitude des oscillations après traitement.....	63
4.2. Propriétés rythmiques de l'Ago et de la MLT.....	64
4.3. Effets du S32006.....	65
II. Études complémentaires.....	66
1. Effets d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT _{2C} sur le rythme de mélatonine endogène et de la température corporelle.....	66
1.1 Introduction.....	66
1.2. Procédures expérimentales.....	67
1.3. Résultats.....	67
a. Effets sur l'amplitude du rythme de mélatonine endogène.....	67
b. Effets sur l'amplitude du rythme de la température corporelle.....	68
2. Influence de l'heure d'administration des antagonistes sérotoninergiques sur le rythme de la température corporelle.....	69
2.1. Introduction.....	69
2.2. Procédures expérimentales.....	69
2.3. Résultats.....	70
3. Effets des différentes drogues sur le rythme de la température corporelle : étude sans microdialyse.....	73
3.1. Introduction.....	73
3.2. Procédures expérimentales.....	73
3.3. Résultats.....	74

4. Influence de la dose administrée sur le rythme de la température corporelle avec microdialyse	75
4.1. Introduction	75
4.2. Procédures expérimentales.....	76
4.3. Résultats	76
5. Discussion	79

Deuxième partition : étude *in vitro* de l'amplitude des oscillations du gène *Per1* au sein de l'horloge centrale82

I. Introduction.....	83
II. Matériels et méthodes.....	84
1. Animaux	84
2. Enregistrement de la bioluminescence.....	84
3. Drogues	86
4. Procédure expérimentale	86
5. Analyses des données et statistiques.....	86
III. Résultats.....	87
1. Effets à moyen terme de l'agomélatine et de la mélatonine sur l'amplitude des oscillations du gène <i>Per1</i>	87
2. Effet immédiat de l'agomélatine et la mélatonine sur l'expression du gène <i>Per1</i>	89
IV. Discussion.....	91

Discussion générale et perspectives94

I. Effets de l'agomélatine sur l'amplitude des oscillations de l'horloge.....	95
1. Rythme de la sécrétion de mélatonine endogène.....	95
2. Rythme de la température corporelle	97

3. Expression du gène Per1	98
4. Mécanismes d'action de l'agomélatine : vue d'ensemble	99
II Relation entre rythmes circadiens et dépression chez l'Homme.....	102
III. Perspectives à plus long terme	103
Références bibliographiques	105
Liste des figures et des tableaux.....	133

Abréviations

3V : 3^{ème} ventricule

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine

5-HTP : 5-hydroxytryptophane

A

AA-NAT : Arylalkylamine-N-acétyltransférase

Ago : Agomélatine

Ampl : Amplitude

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AP-1 : Activating Protein 1

ARNm : Acide ribonucléique messager

AS-ODN : Antisense Oligodéoxynucléotides

AVP : Arginine Vasopressine

B

bHLH : basic Helix-Loop-Helix

BMAL1 : Brain and Muscle ARNt Protein 1

C

Ccg : Clock controlled gene

CGR : cellules ganglionnaires de la rétine

CKIε : Caséine Kinase Iε

CLOCK : Cycle Locomotor Output Cycle Kaput

co : chiasma optique

CRH : Corticotropin Releasing Hormone

Cry : Cryptochrome

D

DD : obscurité constante ("Dark/Dark")

dmNSC : partie dorso-médiane des NSC

DT50 : temps de demi-descente

E

EDM : Épisodes Dépressifs Majeurs

F

FAA : Food Anticipatory Activity

FIG : Feuillet Intergéniculés latéraux

G

GABA : Acide Gamma Aminobutyrique

GCS : Ganglions Cervicaux Supérieurs

GFP : Green Fluorescent Protein

GHT : Tractus Geniculo Hypothalamique

GLU : Glutamate

GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique

GP : Glande Pinéale

GRP : Gastrin Releasing Peptide

H

HAM-D : Hamilton Anxiety Rating Scale

HDM : Hypothalamus Dorso-médian

HVM : Hypothalamus Ventro-médian

HIOMT : Hydroxy-O-méthyltransférase

I

IML : colonnes Intermédio-latérales

ISRS : Inhibiteurs Spécifiques de la Recapture de Sérotonine

IT50 : temps de demi montée

K

KO : Knock-out

L

LD : lumière/obscurité ("Light/Dark")

LL : lumière constante ("Light/Light")

LP : longue photopériode

M

MLT : mélatonine exogène

N

NA : noradrénaline

NAS : N-acétyl-sérotonine

NMDA : N-méthyl-D-Aspartate

NPV : Noyaux Paraventriculaires de l'hypothalamus

NPY : Neuropeptide Y

NR : Noyaux du raphé

NSC : Noyaux suprachiasmatiques

P

PACAP : Pituitary Adenyl Cyclase Activating Peptide

PAS : Period-ARNt-Sim

PEG : Polyéthylène glycol

Per : Period

PK2 : Prokinéticin 2

PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine Kinase dépendante du Ca^{2+}

PLC : Phospholipase C

PRC : Courbe de réponse de phase

PT : Pars Tuberalis

PVT : Noyaux Paraventriculaires du Thalamus

R

RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G

RHT : Tractus Rétino-Hypothalamique

RIA : Dosage radio-immunologique / Radio Immunno Assay

S

s.c : sous-cutané

SEM : Erreur standard / Standard Error of the Mean

SP : Photopériode courte

T

Tc : Température corporelle

TGF α : Transforming Growth Factor α

TRH : Tractus Rétino-Hypothalamique

Trp : Tryptophane

TSH : Thyroid Stimulating Hormone

TTX : Tétrodotoxine

V

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

vINSC : partie ventro-latérale des NSC

VPAC : Récepteur du VIP/PACAP

Introduction générale

La rotation de la Terre sur elle-même et autour du soleil impose des variations périodiques de l'environnement quotidiennes (alternance jour/nuit) mais également annuelles (succession des saisons). Face à ces variations inéluctables, les organismes vivants doivent anticiper et s'adapter aux contraintes environnementales (lumière, disponibilité des ressources alimentaires, température, humidité, ...). Pour cela, l'organisation rythmique et temporelle des fonctions physiologiques s'avère fondamentale dans le monde du vivant. En effet, que cela concerne les plantes dont la floraison va être programmée ou l'Homme qui va préparer de manière physiologique son réveil dès son endormissement, les organismes vivants vont ainsi anticiper les variations environnementales, grâce aux rythmes biologiques.

I. Les rythmes biologiques

Les rythmes biologiques se définissent comme la variation périodique ou cyclique, donc prévisible dans le temps, d'une fonction particulière d'un être vivant. Un rythme se caractérise par sa période (intervalle de temps séparant la survenue de 2 phénomènes identiques), l'emplacement des pics (acrophase, la phase étant le moment auquel intervient un évènement par rapport à un temps de référence) et des creux (bathyphase), l'amplitude (différence entre les valeurs maximales et les valeurs minimales) et par son mésores correspondant au niveau moyen du rythme (**Figure 1**).

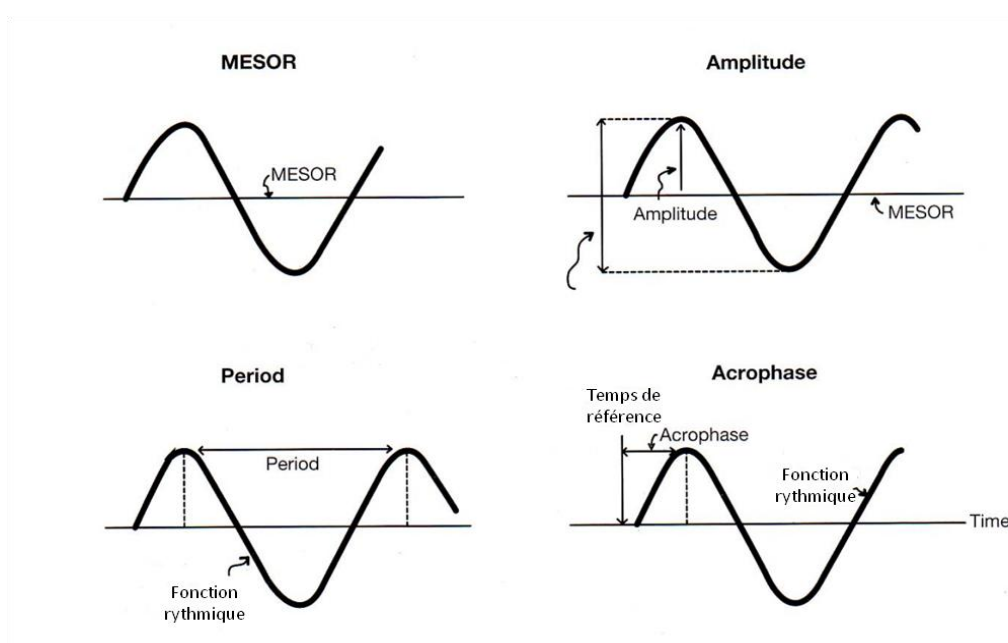


Figure 1 : Paramètres caractéristiques des rythmes biologiques (d'après Touitou & Haus, 1994)

On distingue 3 catégories de rythmes en fonction de leur période (Boissin & Canguilhem, 1998).

Les rythmes ultradiens ont une période courte, de la milliseconde jusqu'à 20 heures. L'un des premiers exemples connus est le pouls qui reflète l'activité rythmique cardiaque.

Les rythmes circadiens (du latin *circa diem*, environ un jour) ont une période d'environ 24 heures (24 ± 4 heures) ajustée sur le rythme astronomique dépendant de la rotation de la Terre sur elle-même. Le cycle veille/sommeil est un exemple caractéristique, c'est un rythme nyctéméral avec une période d'exactly 24 h suivant l'alternance jour/nuit. Le cycle circadien est divisé en jour subjectif et nuit subjective, ce qui correspond respectivement à la phase d'activité et de repos chez les espèces diurnes et inversement chez les espèces nocturnes

Les rythmes infradiens ont une période supérieure à 28 heures. De manière plus commune, on distingue les rythmes saisonniers ou annuels imposés par la rotation de la Terre autour du Soleil. La reproduction chez les espèces sauvages constitue un bon exemple de rythme saisonnier qui s'effectue au moment le plus propice (conditions environnementales favorables) afin que la survie des jeunes soit optimale. Ainsi, les animaux utilisent la photopériode (durée d'éclairement sur 24 h) pour anticiper les saisons.

Les rythmes biologiques sont observés chez tous les organismes, de l'être unicellulaire à l'Homme, et à tous les niveaux d'organisation, de l'écosystème à la fraction subcellulaire. De plus, un même organisme peut présenter des rythmes de différentes périodes, c'est notamment le cas chez les Mammifères, par exemple le rythme respiratoire (quelques secondes), hormonal (une heure) ainsi que le cycle veille/sommeil (plusieurs heures) peuvent apparaître à différents instants. Ainsi, on voit bien l'importance des rythmes biologiques qui confèrent une identité et une organisation temporelle à chaque individu.

Les organismes vivants sont capables d'intégrer l'information temporelle grâce à une organisation intrinsèque complexe. Pour permettre une harmonie avec leur environnement (alternance jour/nuit) la plupart des fonctions rythmiques sont établies de manière prépondérante sur une période de 24 h exactement. Dans le cas des travaux présents, nous nous sommes intéressés exclusivement au système circadien dont la prochaine partie lui sera consacrée afin d'en dévoiler toute sa complexité et son rôle majeur.

II. Le système circadien chez les Mammifères

Les principes biologiques établis par Claude Bernard sur l'état constant des fonctions vitales furent progressivement remis en cause par la découverte de la rythmicité des processus biologiques. En effet, les premières observations de variabilité dans le temps de la température corporelle (T_c) chez l'Homme (plus élevée le soir que le matin) insufflent un nouveau concept, celui des rythmes biologiques. Les fonctions physiologiques ne sont plus linéaires mais présentent une périodicité proche de 24 h. Dans le même temps, la notion d'horloge biologique apparaît, les organismes vivants seraient capables de mesurer le temps. Il s'en suivra de nombreuses controverses quant à l'origine de cette horloge. Deux théories vont s'affronter, pour certains ce sont les facteurs exogènes de l'environnement qui donnent le rythme tandis que d'autres penseront que seule la génétique peut répondre à cette question, mais qu'en est-il vraiment, en d'autres termes, les rythmes biologiques possèdent-ils un caractère inné ou acquis ?

1. Origine des rythmes circadiens

La notion d'endogénie des rythmes biologiques fit son apparition en 1729 avec les observations d'Ortous de Mairan sur le rythme d'ouverture des feuilles de la Sensitive (*Mimosa pudica*) qui perdure en obscurité constante (DD). Chez l'animal, il faut attendre deux siècles plus tard pour retrouver un phénomène similaire. En effet, en (1939), Johnson a observé que la souris est capable de maintenir une activité locomotrice rythmique en conditions constantes, on voit alors apparaître la notion d'horloge biologique.

Dans le même temps, lors d'expériences de confinement (aucun repère temporel), il a été constaté que les rythmes biologiques étaient conservés mais présentaient une période intrinsèque différente du nyctémère (proche mais supérieure ou inférieure à 24 h), il s'agit du libre cours. Tout se passe comme si l'organisme possédait sa propre horloge interne (caractère inné). Toutefois, si les facteurs extérieurs (alternance jour/nuit, température, vie sociale, etc.) ne génèrent pas les rythmes, ils sont capables de les moduler en imposant leur période et sont donc considérés comme des synchroniseurs ou agents donneurs de temps (*Zeitgeber* ; *Zeit* : temps, *Geber* : donneur). Ainsi, les rythmes biologiques sont régis par une horloge interne mais les paramètres qui les caractérisent dépendent des facteurs environnementaux, ce qui, suite à de longs progrès, est actuellement admis par tous. Après avoir mis en évidence

l'existence d'une horloge biologique interne, restait-il encore à la caractériser et à en comprendre son mécanisme.

2. L'horloge biologique interne... "le chef d'orchestre qui bat la mesure"

L'alternance jour/nuit étant le synchroniseur le plus puissant, les recherches s'orientèrent tout d'abord vers des structures pouvant capter les variations lumineuses de l'environnement.

Chez les Mammifères, les premières structures explorées dans ce sens furent la rétine et la glande pinéale, ces dernières étant reconnues pour générer les rythmes dans d'autres groupes zoologiques. En ce qui concerne la rétine, la pratique d'énucléation bilatérale effectuée chez le rat n'empêche pas le rythme d'activité/repos mais celui-ci apparaît en libre cours (Richter, 1967). De même, l'ablation de la glande pinéale n'a aucune conséquence aussi bien sur les rythmes comportementaux que sur les rythmes hormonaux.

Néanmoins, si la rétine et la glande pinéale ne peuvent pas être considérées comme le siège de l'automatisme circadien, ces deux structures vont s'avérer jouer un rôle important dans les mécanismes de synchronisation de la structure circadienne, ce qui sera discuté dans les prochains paragraphes. Les explorations se poursuivirent donc en direction de l'hypothalamus et notamment l'étude de Richter (1967) montra que l'ablation de l'hypothalamus ventro-médian abolissait le rythme de l'activité locomotrice chez le rat. Quelques années plus tard, on identifia, dans cette même partie de l'hypothalamus, la structure capable de réguler les rythmes circadiens : les noyaux suprachiasmatiques.

2.1. Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) : l'horloge "maîtresse"

a. Démonstrations expérimentales

Deux travaux simultanés ont démontré que la lésion bilatérale des NSC abolit le rythme d'activité locomotrice générale (Stephan & Zucker, 1972) mais également celui de la corticostérone (Moore & Eichler, 1972), chez le rat (**Figure 2**). Ces études pionnières ouvrirent très rapidement le chemin à de nombreuses investigations sur cette structure d'intérêt et démontrèrent les unes après les autres que la destruction des NSC supprimait la rythmicité circadienne de plusieurs fonctions (comportement alimentaire et dipsique, température corporelle, rythmes endocriniens, etc.) et ce, chez de nombreuses

espèces (rat, souris, hamster, vison, écureuil,...). Par la suite, Inouye et Kawamura (1979) ont montré que les NSC partiellement isolés des autres structures présentaient une activité électrique circadienne, ce qui fût confirmé par plusieurs études *in vitro* (Green & Gillette, 1982; Groos & Hendriks, 1982) concluant ainsi sur le caractère intrinsèque de la rythmicité de cette structure.

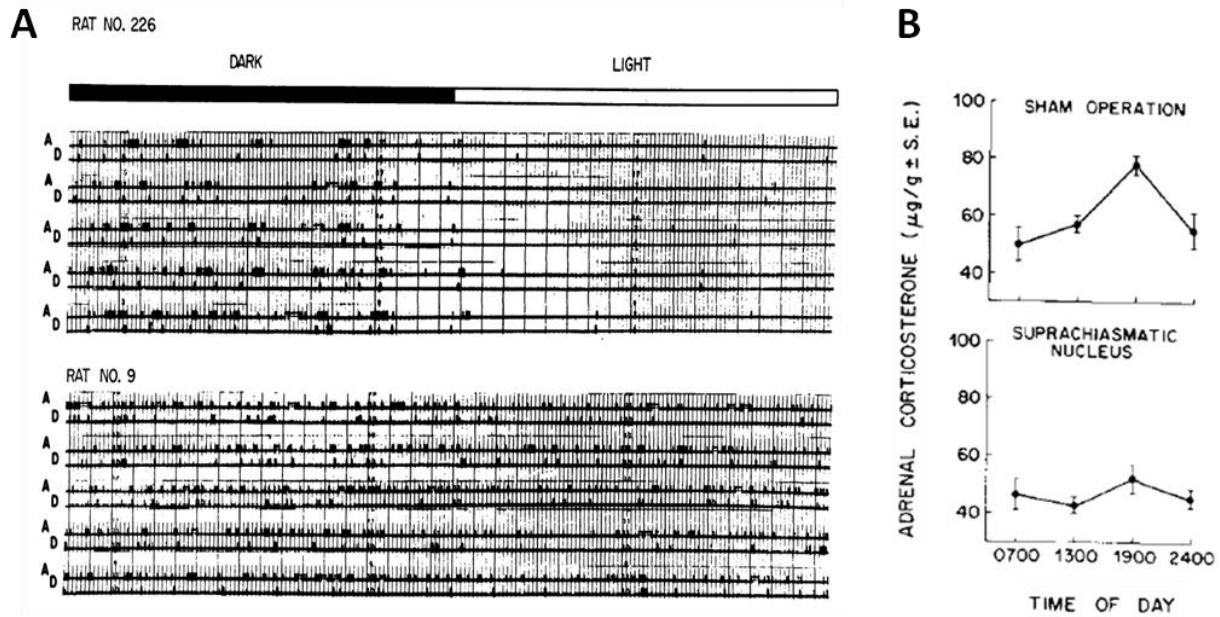


Figure 2 : Abolition des rythmes circadiens après destruction des NSC (d'après Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972). **(A)** Rythme de l'activité locomotrice chez un rat contrôle (haut) et un rat avec lésion bilatérale des NSC (bas). Le schéma obtenu est appelé actogramme où chaque ligne correspond à un jour. L'activité locomotrice enregistrée est symbolisée par les traits noirs verticaux. La barre supérieure indique la condition journalière d'éclairage (Light-Dark 12 h : 12 h) dans laquelle est maintenue le rongeur. **(B)** Rythme de la corticostérone chez des animaux contrôles (haut) en comparaison aux animaux ayant subi une lésion des NSC (bas).

La découverte d'une mutation chez le hamster syrien fût essentielle à cette quête de l'horloge circadienne. La mutation nommée *tau* est responsable d'une diminution de la valeur de la période endogène, elle est de 20 h pour un mutant homozygote et de 22 h pour un hétérozygote alors que celle mesurée chez les hamsters sauvages, est de 24 h. Les animaux préalablement rendus arythmiques par lésion des NSC et placés en condition DD ont été greffés avec des NSC fœtaux provenant, soit de hamsters mutants, soit de hamsters sauvages

selon un protocole de greffes croisées. Les résultats ont montré que, pour l'ensemble des animaux, le rythme circadien de l'activité générale locomotrice était restauré mais avec une période propre à celle du donneur (**Figure 3**) (Ralph *et al.*, 1990).

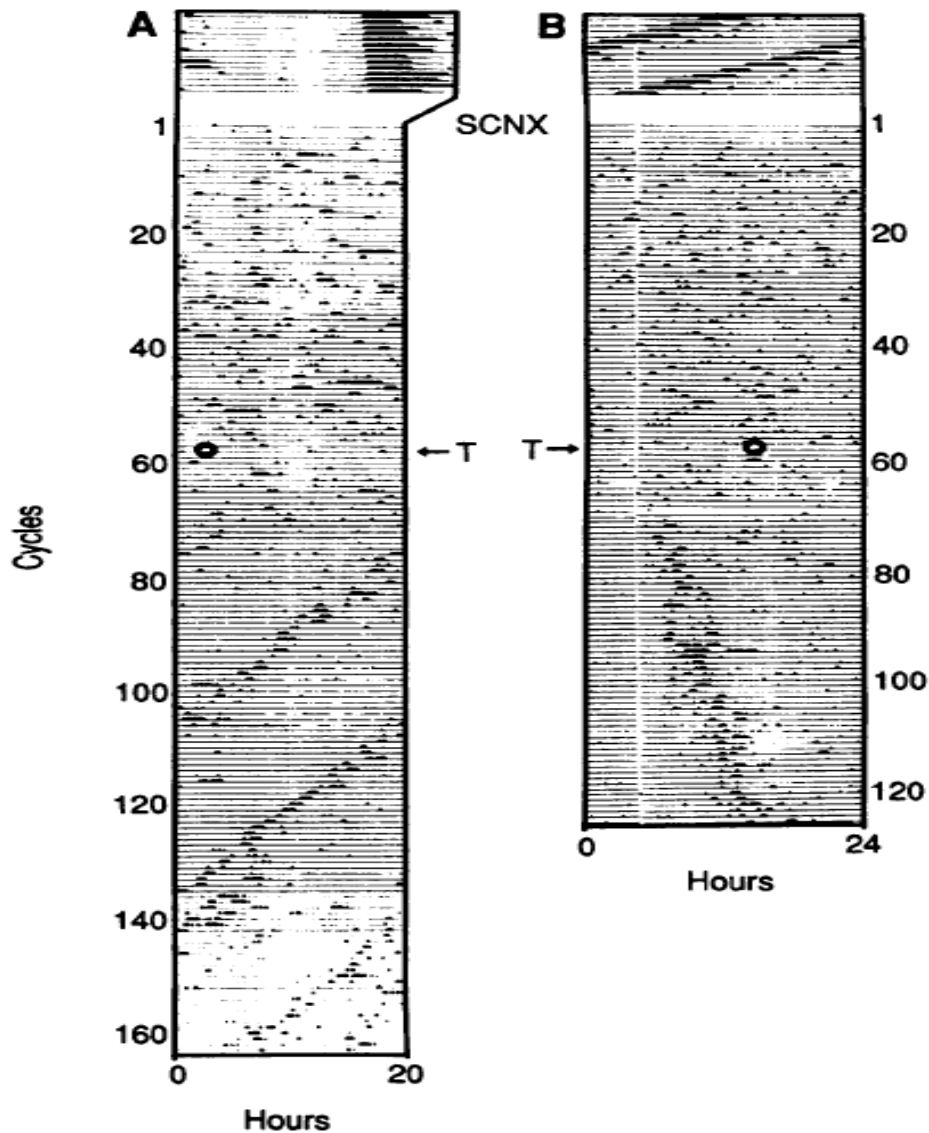


Figure 3 : Actogrammes obtenus après greffe de NSC chez des hamsters syriens sauvages et mutants *tau* (d'après Ralph *et al.*, 1990). (A) Rythme de l'activité locomotrice chez un hamster sauvage intact (en haut de l'actogramme, période de 24,1 h) qui après ablation des NSC présente une arhythmicité (SCNX), celle-ci est restaurée après greffe (T) de NSC fœtaux mutant *tau* (période de 20,1 h). (B) Les animaux mutants hétérozygotes intacts présentent une période de 21,7 h. Suite à la greffe de NSC de hamster sauvage le mutant *tau* retrouve alors un rythme de l'activité locomotrice avec une période de 24,2 h (donneur).

L'ensemble de ces travaux ont su démontrer que la présence d'une horloge biologique interne est nécessaire à la genèse des rythmes circadiens et que celle-ci a lieu dans les noyaux suprachiasmatiques au sein même du cerveau.

b. Anatomie et histophysiologie

Les NSC sont une petite structure cérébrale paire située de part et d'autre du 3^{ème} ventricule à la base de l'hypothalamus, juste au dessus du chiasma optique (**Figure 4A**). Chaque noyau contient 8000 à 10 000 neurones accompagnés de nombreux astrocytes (Van den Pol, 1980). Une régionalisation des NSC a été constatée en fonction de la nature des neuromédiateurs synthétisés par les neurones (Moore, 1983; Moore *et al.*, 2002). Deux subdivisions se distinguent (**Figure 4B**):

- **la partie dorso-médiane** des NSC (dmNSC) riche en neurones à Arginine Vasopressine (AVP, 20% des cellules des NSC) (Van den Pol & Tsujimoto, 1985), ce peptide est exprimé selon un rythme circadien avec un pic durant le jour (Tominaga *et al.*, 1992).

- **la partie ventro-latérale** (vlNSC) constituée de nombreux neurones à Vasoactif Intestinal Peptide (VIP, 10% des cellules des NSC) (Card *et al.*, 1981), le rythme de ce peptide n'est pas circadien mais présente un maximum durant la nuit (Takahashi *et al.*, 1989; Morin *et al.*, 1991; Shinohara *et al.*, 1993).

On retrouve également d'autres peptides tels que la calrétinine, la neurotensine et le Gastrin Releasing Peptide (GRP) dans le vlNSC mais également l'angiotensine II et la met-enképhaline dans le dmNSC, ce qui permet d'établir une sous régionalisation de chaque partie des NSC. Notons également que pour la plupart des neurones des NSC, les neuropeptides sont co-localisés avec l'acide gamma-aminobutyrique (GABA, neurotransmetteur inhibiteur) (Moore & Speh, 1993) bien que certaines cellules peuvent être glutamatergiques (neurotransmetteur excitateur) (Hermes *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 2001; Perreau-Lenz *et al.*, 2004). L'anatomie des NSC, comme décrite ici, reste une vue d'ensemble qui varie considérablement en fonction de l'espèce et s'avère être très complexe (Morin *et al.*, 2006).

Cette organisation neurochimique sous-tend un fonctionnement différent selon la population de neurones considérée dans la construction et la transmission du message circadien (Leak & Moore, 2001)

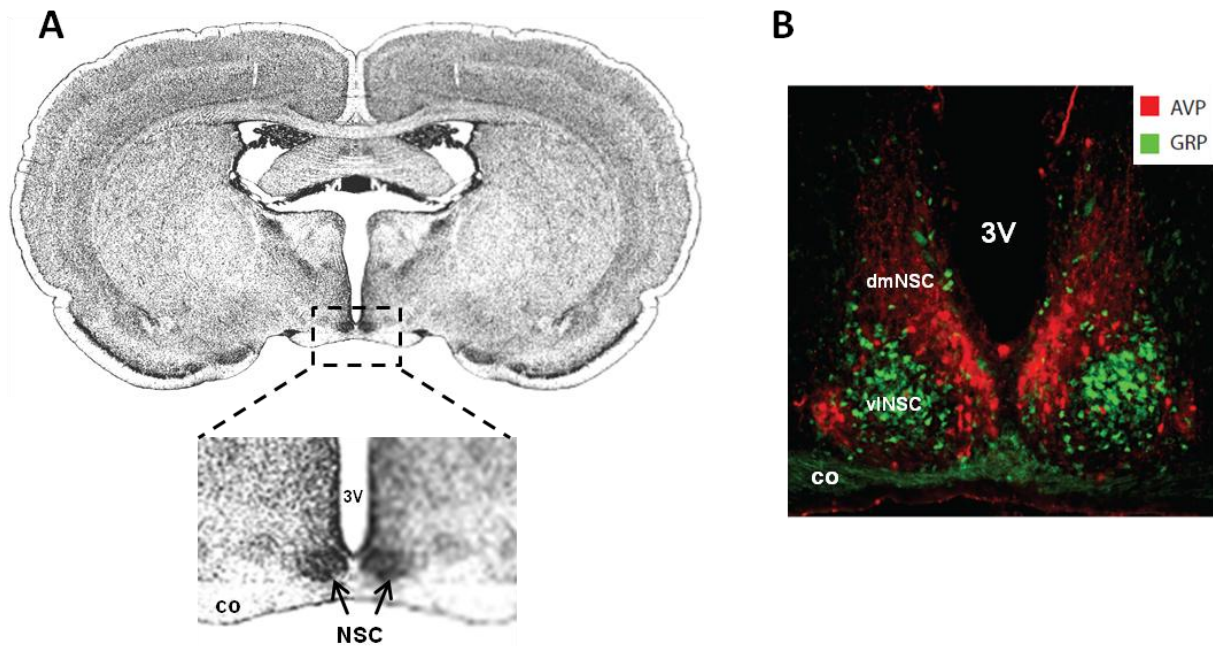


Figure 4 : Localisation et anatomie des NSC chez les Mammifères. (A) Section coronale de cerveau de rat avec élargissement sur la zone des NSC situés de part et d'autre du 3^{ème} ventricule (3V) au dessus du chiasma optique (co). (B) Section coronale des NSC de souris montrant la partie dorso-médiane des NSC (dmNSC) où est exprimée l'AVP (rouge) et la partie ventro-latérale (vlNSC) délimitée par les neurones à GRP (vert) (figure modifiée d'après Karatsoreos *et al.*, 2004).

2.2. Genèse des rythmes dans les NSC

a. Détermination génétique et mécanismes moléculaires

Le caractère endogène des rythmes circadiens, maintenant bien connu, fait intervenir des facteurs génétiques, ce qui appuie de manière décisive le caractère inné des rythmes. L'étude des rouages moléculaires de l'horloge a débuté avec la première description d'une mutation modifiant la valeur de la période du rythme circadien de l'activité locomotrice chez la drosophile (Konopka & Benzer, 1971). Une analyse comparée entre les souches mutantes et sauvages ont permis d'identifier ce gène qui fut appelé *Per* pour Period. Le gène *Per* est le premier gène connu responsable d'un rythme circadien, on parle alors de gène horloge.

C'est une vingtaine d'années plus tard que de rapides progrès sur les mécanismes moléculaires ont été effectués, notamment chez la souris. Le premier gène

horloge à être identifié chez les Mammifères est le gène *Clock* (*Circadian locomotor output cycle kaput*). Les souris mutantes *Clock* présentent un actogramme anormal et perdent rapidement toute rythmicité quand elles sont placées en conditions constantes (Vitaterna *et al.*, 1994). À ce jour, une dizaine de gènes horloge a été identifiée chez les Mammifères : *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1* (*Brain and Muscle ARNt like protein 1*), *Cry1*, *Cry2* (*Cryptochrome*), *Rev-erba* (*Reverse viral erythroblastis oncogene products*), *Rora* (*Retinoic acid-related orphan receptor*)... Ces gènes codent des facteurs de transcription qui en interagissant entre eux constituent des boucles de régulation fonctionnant sur 24 h. L'étude de ces mécanismes moléculaires complexes a permis une meilleure connaissance de l'origine des oscillations endogènes. Seul le fonctionnement de base de l'horloge moléculaire sera présenté, celui-ci étant en perpétuelle évolution au fil des avancées. Il est certain que de nombreux éléments viendront s'ajouter au modèle décrit.

La régulation des gènes horloge implique deux boucles de régulation distinctes (principale et auxiliaire) impliquant des éléments activateurs mais également répresseurs (**Figure 5**) (Ko & Takahashi, 2006 pour revue) :

- **boucle de régulation principale** : les gènes *Clock* et *Bmal1* interviennent dans la boucle principale en tant que régulateurs positifs et codent les protéines CLOCK et BMAL1. Chez la souris, la protéine CLOCK est exprimée de manière constante dans les NSC (Maywood *et al.*, 2003) tandis que BMAL1 présente un rythme circadien avec un pic en fin de nuit (Honma *et al.*, 1998). Ces deux protéines vont s'associer en un dimère (*via* leur domaine PAS : Period-ARNt-Sim) capable d'activer la transcription des gènes *Per1/2/3* et *Cry1/2* entre autres, en se fixant à l'ADN (*via* leur domaine bHLH : basic Helix-Loop-Helix) (Antoch *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997) sur des séquences promotrices appelées E-box (Gekakis *et al.*, 1998). Les dimères CLOCK/BMAL1 activent également la transcription d'autres gènes, appelés "gènes contrôlés par l'horloge, *Ccg* " qui forment la voie de sortie des messages rythmiques.

Les gènes *Per* et *Cry* codent les protéines PER et CRY qui constituent les éléments répresseurs de cette boucle principale. Différents isoformes de la protéine PER ont été identifiés (PER1/2/3) et présentent un pic en fin de jour (Hastings *et al.*, 1999; Field *et al.*, 2000) à un moment proche de celui de la protéine CRY qui a lieu en début de nuit (Kume *et al.*, 1999). Les protéines PER et CRY forment ensuite des hétérodimères qui peuvent inhiber en retour la transcription induite par CLOCK/BMAL1 et ainsi réprimer leur propre synthèse (Kume *et al.*, 1999; Shearman *et al.*, 2000).

Ainsi, le mécanisme moléculaire, de l'horloge est principalement constitué d'une composante positive (CLOCK/BMAL1) contrebalancée par une composante négative (PER/CRY) et ceci, sur une période de 24 h. Depuis l'établissement de cette base moléculaire d'autres intervenants ont été identifiés et constituent une deuxième boucle qui va contribuer à la régulation fine des éléments de la boucle principale.

- **boucle de régulation auxiliaire** : *Rev-erba* et *Rora* sont les principaux acteurs de cette boucle, il s'agit de gènes codant des récepteurs nucléaires orphelins. Leur transcription est activée par le dimère CLOCK/BMAL1 et leur expression est maximale en milieu de jour (Sato *et al.*, 2004). La protéine REV-ERB α inhibe la transcription de *Bmal1* contrairement à ROR α qui va l'activer (Preitner *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004).

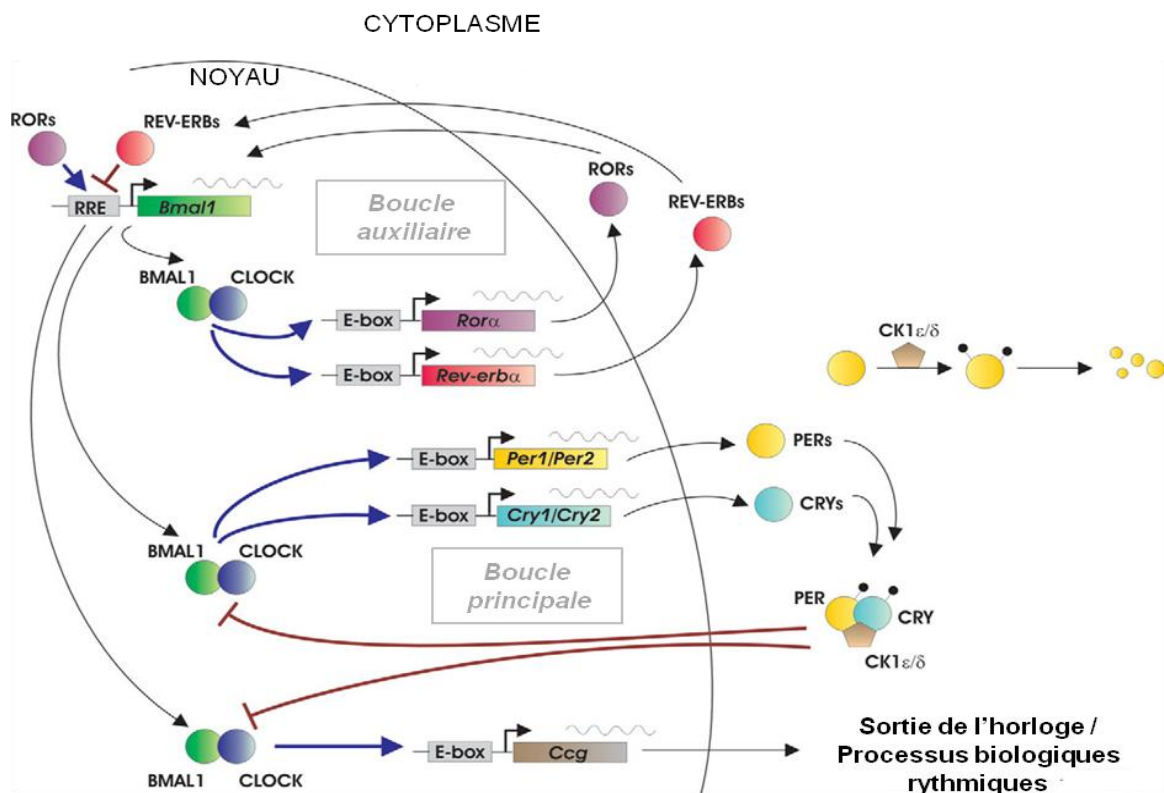


Figure 5 : Modèle de boucles moléculaires de régulation translationnelle et traductionnelle des gènes horloge d'une cellule de NSC, chez les Mammifères (figure modifiée d'après Ko & Takahashi, 2006).

Les produits de ces gènes horloge vont ensuite subir plusieurs modifications post-traductionnelles, telles que des phosphorylations ou des ubiquitinations, afin d'assurer leur stabilité et leur translocation nucléaire (Reppert & Weaver, 2002). La Caséine Kinase I ϵ (CKI ϵ) joue un rôle important dans le sens où elle va phosphoryler PER, CRY et BMAL1 au sein des différentes boucles de régulation (Lowrey *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). La phosphorylation de ces protéines s'avère nécessaire au contrôle de leur dégradation et à leur prise en charge par le protéasome (Akashi *et al.*, 2002).

L'ensemble complexe de ces mécanismes moléculaires permet de réguler l'expression des gènes horloges sur 24 h et il en est également de même pour d'autres gènes très bien caractérisés comme l'AVP (Jin *et al.*, 1999; Herzog *et al.*, 2000) connu pour jouer un rôle dans l'activité électrique des NSC. Ainsi, le fonctionnement moléculaire de l'horloge influencerait cette activité électrique générée au sein des NSC.

b. Activité électrique endogène des NSC

On sait depuis les études *in vivo* de S.T. Inouye et Kawamura (1979), sur des tranches de NSC, que cette structure est caractérisée par une activité électrique endogène et circadienne. Cette activité électrique également observée *in vitro* est présente durant le jour (Shibata *et al.*, 1982). En 1995, les travaux entrepris par Welsh et coll. montrèrent que des neurones de NSC dissociés possédaient une activité électrique et ce, pendant plusieurs semaines. Ainsi, cette rythmicité endogène n'était plus attribuée à l'ensemble des NSC mais portait dès à présent un caractère individuel et ne nécessitait donc pas d'interconnexions cellulaires pour être générée (Welsh *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997).

Nous évoquons, dans le paragraphe précédent, les relations étroites entre les oscillations moléculaires de l'horloge et l'activité électrique. En effet, un traitement à la tétradotoxine (TTX, un bloquant de l'influx nerveux) sur des tranches de NSC empêche la transcription ainsi que la libération de l'AVP (Arima *et al.*, 2002). De plus, la synthèse d'AVP étant également sous le contrôle des boucles moléculaires, ces travaux confirment une corrélation entre les gènes horloge et l'activité électrique des neurones des NSC, cette observation sera appuyée par d'autres études. Par exemple, une mutation du gène *Clock* entraîne un allongement de la période électrique chez la souris (Herzog *et al.*, 1998). De même, des souris double mutantes *Cry1* et *Cry2* perdent la rythmicité circadienne de leur activité électrique (Albus *et al.*, 2002). L'utilisation de souris dont le gène *Per1* est couplé à la GFP (Green Fluorescent Protein) a également révélé que la transcription de *Per1* coïncide avec la fréquence de décharge neuronale (Quintero *et al.*, 2003). Cependant, il a été constaté

in vivo que les cellules ne présentaient pas la même période quant à la venue du pic d'activité électrique, ceci pouvant induire un décalage de phase, voire une opposition de phase, avec les autres cellules (Schaap *et al.*, 2003). Ce qui nous amène à prendre en considération l'individualité des cellules dans les NSC qui représentent à elles seules une horloge à part entière ainsi que l'impact de cette caractéristique sur les rythmes générés au sein de l'horloge centrale.

c. Le couplage intercellulaire ou quand l'union fait la force.

Le couplage des neurones des NSC est un mécanisme essentiel à la construction d'un message rythmique. En effet, l'étude de l'activité électrique chez des hamsters mutants *tau* a montré que la période moyenne enregistrée à partir de l'ensemble des cellules dissociées correspond à la période de l'activité locomotrice de l'animal (Liu *et al.*, 1997). De même, les variations de la période endogène des cellules diminuent d'autant plus que les interconnexions sont nombreuses et tendent à avoir la même période (Herzog *et al.*, 1998). Ainsi, les cellules se synchronisent afin de transmettre un message circadien global, mais la question qui reste encore ouverte est de savoir comment s'effectue ce couplage. Plusieurs études ont avancé dans ce sens, apportant des éléments de réponse importants.

Lorsque l'on parle de couplage inter-neuronal, on pense plus communément à la transmission synaptique. L'implication de cette communication a été étudiée en appliquant de la TTX sur des tranches de NSC, celle-ci va désynchroniser l'activité électrique enregistrée sur des paires de neurones (Honma *et al.*, 2000). De même, l'expression de *Per1* se voit altérée après traitement à la TTX sur des cultures de NSC issus de souris transgéniques *Per1-luciférase* (Yamaguchi *et al.*, 2003). Dans cette étude, les auteurs suggèrent également que le couplage renforce les oscillations au sein de chaque cellule. L'activité électrique simultanée de deux neurones adjacents de NSC de souris mutantes pour la connexine36 (protéine nécessaire à la formation des jonctions GAP) n'a plus lieu au sein des NSC (Long *et al.*, 2005). Les jonctions GAP sont donc directement impliquées dans ce couplage.

Certains neurotransmetteurs seraient également impliqués tel que le GABA considéré comme un important synchroniseur des NSC *in vivo* (Liu & Reppert, 2000). Le neuropeptide VIP est également impliqué dans le couplage intercellulaire. Des souris invalidées pour l'un des récepteurs du VIP (VPAC2) ne présentent plus de rythme d'activité électrique et locomotrice (Harmar *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 2004), ni de synchronisation

entre les cellules des NSC (Quintero *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2003; Maywood *et al.*, 2007 pour revue).

Cependant, il a été constaté que les neurones ne sont pas les seuls acteurs dans ce couplage, les astrocytes contribueraient à la synchronisation. Les prolongements astrocytaires présentent une variation circadienne (Jackson, 2011 pour revue), avec un maximum le jour, ce qui pourrait moduler l'efficacité des connexions inter-neuronales et rendre défaillant le couplage.

L'ensemble de ces éléments serait donc déterminant au couplage cellulaire mais il faut également prendre en considération l'organisation fonctionnelle complexe des NSC. La régionalisation des neurones à AVP et à VIP met en évidence deux zones fonctionnellement distinctes. Par exemple, l'expression maximale des ARNm des gènes *Per1* et *Per2* est observée dans la partie dorso-médiane (neurones à AVP) durant le jour alors que la proportion de neurones à VIP exprimant ces gènes est plus faible, chez le rat (Dardente *et al.*, 2002). De plus, l'activité électrique de ces deux populations neuronales peut être découplée. Un décalage de phase est observé entre les deux parties du NSC lorsqu'elles sont dissociées (Albus *et al.*, 2005). Les parties gauche et droite du NSC peuvent également être découplées. Chez le hamster doré, on observe une expression antiphasique des gènes horloges entre les deux NSC (de la Iglesia *et al.*, 2000). Ainsi, on a donc quatre zones fonctionnelles distinctes indépendantes composées de plusieurs unités rythmiques (les neurones) dont leur synchronisation est indispensable à la construction et à la distribution d'un message rythmique cohérent.

En résumé, l'horloge centrale au sein du cerveau est localisée dans les noyaux suprachiasmatiques. Cette structure complexe est composée de plusieurs unités cellulaires individuelles possédant toute la machinerie moléculaire nécessaire à la genèse des rythmes. Les différentes unités ayant leur propre période vont "se mettre au diapason" afin de transmettre un message rythmique à l'ensemble de l'organisme. Néanmoins, la période de l'horloge n'étant pas exactement de 24 h, des mécanismes de synchronisation sont nécessaires pour sa remise à l'heure.

2.3. Synchronisation de l'horloge "maîtresse" à 24 h

En conditions constantes, l'horloge génère des rythmes avec une période proche de 24 h. Lorsque celle-ci est soumise à un cycle lumière obscurité sur 24 h (par

exemple, 12 h de lumière puis 12 h d'obscurité, LD 12 :12), l'horloge circadienne est alors entraînée exactement sur cette alternance jour/nuit. L'horloge circadienne peut donc être remise à l'heure, et ce, par différents donneurs de temps ou Zeitgebers. Le facteur photique représenté par l'alternance jour/nuit est le plus puissant des synchroniseurs. D'autres facteurs, dits non photiques, notamment sociaux, comportementaux, nutritionnels et pharmacologiques peuvent également synchroniser l'horloge circadienne à leur propre période.

a. Réception et transmission des signaux extérieurs à l'horloge : les différentes voies nerveuses impliquées

Plusieurs afférences aux NSC en provenance de différentes structures cérébrales ont été identifiées dont trois voies majeures. (Moore, 1996).

Le tractus rétino-hypothalamique (RHT) constitue la voie d'entrée principale (Johnson *et al.*, 1988), il est impliqué dans l'entraînement photique (**Figure 6**). Le premier acteur à détecter les variations lumineuses est la rétine. Elle est composée de plusieurs types de neurones (photorécepteurs, cellules ganglionnaires) et de cellules gliales. La lumière va activer deux systèmes parallèles : d'une part le système visuel (cônes et bâtonnets) qui permet la formation de l'image et d'autre part le système circadien, dit non visuel, qui permet de synchroniser les fonctions de l'organisme à son environnement. Il y a une séparation anatomique et fonctionnelle des deux systèmes afin de traiter l'information lumineuse.

Une sous-population de cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) va transmettre la composante circadienne du signal lumineux sur les vNSC. Les cellules ganglionnaires contiennent un pigment visuel spécifique : la mélanopsine (Gooley *et al.*, 2001; Hannibal, 2002 pour revue). Cette protéine s'avère essentielle à l'entraînement par la lumière (Panda *et al.*, 2002; Ruby *et al.*, 2002; Gooley *et al.*, 2003; Rollag *et al.*, 2003). Néanmoins, les souris knock-out (KO) pour le gène de la mélanopsine sont toujours synchronisées par l'alternance jour/nuit (Panda *et al.*, 2002; Ruby *et al.*, 2002). Ceci suggère que la mélanopsine ne serait pas seule à transmettre l'information lumineuse à l'horloge mais que les photorécepteurs joueraient également un rôle (Hattar *et al.*, 2003). Les cellules à mélanopsine vont ensuite libérer dans les NSC du glutamate et du PACAP (Pituitary Adenyl Cyclase Activating Peptide). En présence de lumière, le glutamate se fixe sur les récepteurs N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) et entraîne une augmentation de l'activité électrique des neurones des NSC (Meijer *et al.*, 1993). La libération des deux neurotransmetteurs module les procédés d'entraînement de l'horloge (Chen *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 1999), notamment en

contrôlant l'expression des gènes *Per1* (Shigeyoshi et al., 1997) et *Per2* (Shearman et al., 1997).

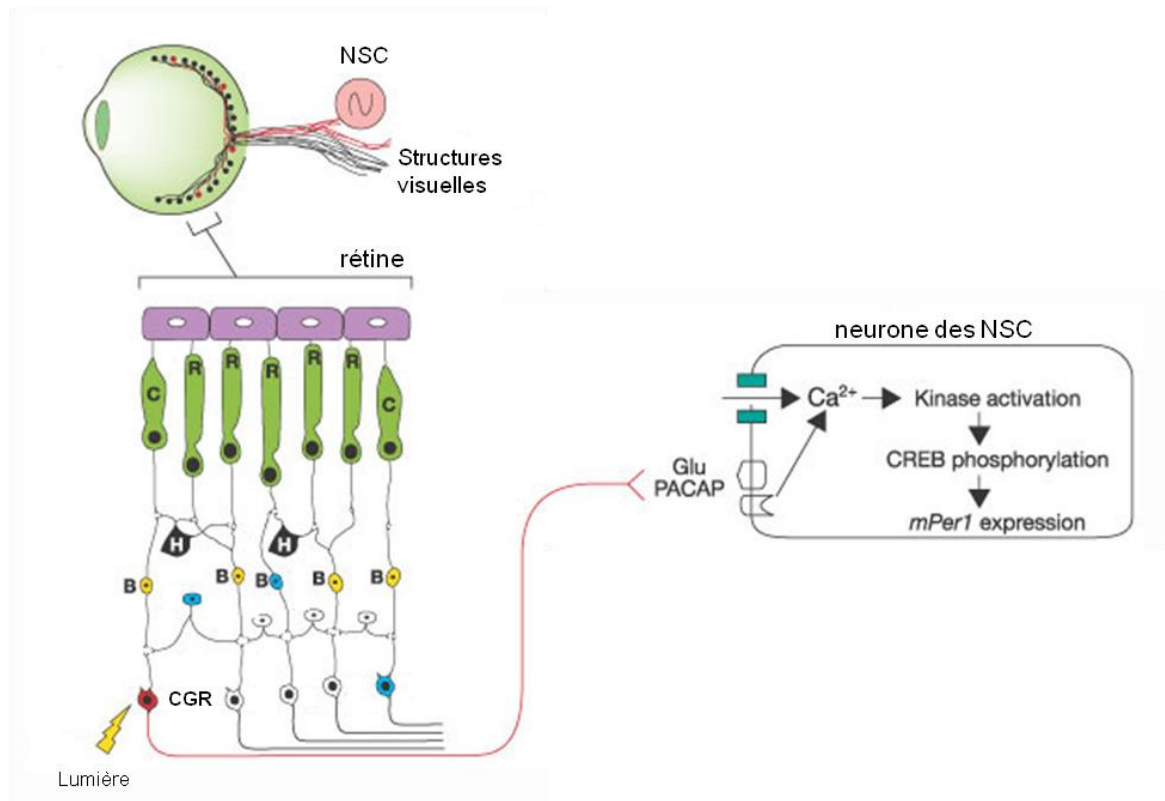


Figure 6 : Traitement de l'information photique par le tractus rétino-hypothalamique (figure modifiée d'après Reppert & Weaver, 2002). Les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) à mélanopsine (rouge) se projettent vers les NSC sont directement sensibles à la lumière. Elles reçoivent également les afférences des bâtonnets (R) et des cônes (C). Le glutamate (Glu) et le PACAP transmettent les effets de la lumière sur les gènes *Per1* dans les neurones des NSC.

Le tractus geniculo-hypothalamique (GHT) est une voie indirecte qui amène l'information photique de la rétine (*via* les collatérales des CGR à mélanopsine) aux feuillets intergéniculés latéraux (FIG) qui projettent vers les NSC. Les fréquences de décharge des neurones des FIG varient en fonction de l'intensité lumineuse, démontrant ainsi la fonctionnalité de cette voie (Harrington & Rusak, 1991). Les projections des FIG sur les vNSC contiennent principalement du GABA et le neuropeptide Y (NPY) (Moore & Card, 1994 pour revue). D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que cette voie n'est pas indispensable à la synchronisation photique (Pickard et al., 1987) mais qu'elle module les effets de la lumière sur les NSC (Albers et al., 1991; Jacob et al., 1999). Par exemple, des

lésions électrolytiques des FIG réduisent l'amplitude des déphasages produits par la lumière chez le hamster (Harrington & Rusak, 1986).

Le tractus sérotoninergique est la troisième afférence majeure des NSC qu'il faut également considérer. Des fibres sérotoninergiques en provenance des noyaux du raphé (NR) se connectent, soit directement sur les NSC, soit indirectement *via* les FIG (Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Moga & Moore, 1997). Les analyses expérimentales suggèrent que le rôle de cette voie serait de moduler les effets de la lumière, au niveau de l'horloge, par des facteurs comportementaux *via* la libération de sérotonine (5-hydroxy-tryptamine : 5-HT) (Challet & Pévet, 2003 pour revue). En effet, les fibres sérotoninergiques constituent des voies importantes dans la transmission des stimuli non photiques vers les NSC (Malek *et al.*, 2004).

Les NSC reçoivent également d'autres afférences en provenance de structures hypothalamiques (aire latérale, pré-optique, paraventriculaire, rétro-chiasmatique, ventro-médiale et dorso-médiale) et thalamiques (noyau paraventriculaire). Le rôle de ces afférences dans l'entraînement circadien de l'horloge a été très peu étudié mais leurs projections vers les NSC suggèrent qu'elles pourraient intervenir dans les mécanismes de synchronisation.

L'ensemble de ces voies d'entrées participe à la remise à l'heure de l'horloge (**Figure 7**), en intégrant les différents signaux extérieurs afin de synchroniser l'organisme avec son environnement.

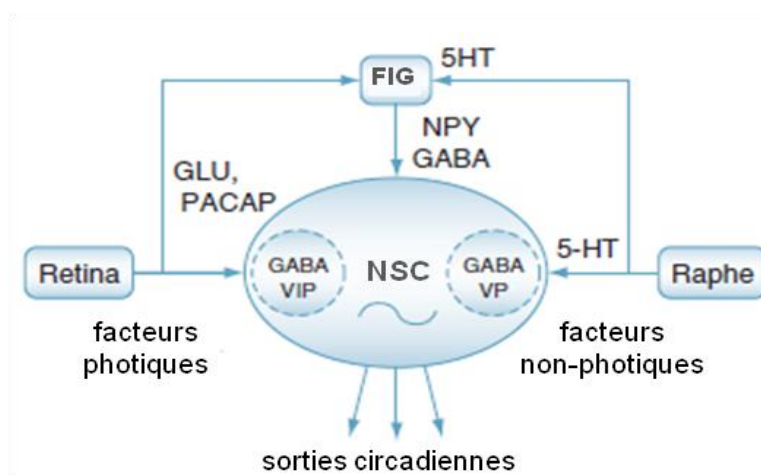


Figure 7 : Représentation schématique des trois afférences majeures des SCN. Les afférences provenant de la rétine et du raphé vont cibler les feuillets intergéniculés (FIG) qui à leur tour projettent sur les NSC. Les projections rétiniennes traitent les signaux photiques tandis que le raphé intègre les signaux non photiques. Les FIG peuvent être impliqués dans les deux types de voies. GABA, acide gamma-immunobutyrique ; GLU, glutamate ; 5-HT, 5-hydroxy-tryptamine, NPY, neuropeptide Y ; PACAP, Pituitary Adenyl Cyclase Activating Peptide ; VIP, Vasoactif Intestinal Peptide.

b. Synchronisation photique

L'alternance jour/nuit est capable d'entraîner les rythmes physiologiques et comportementaux à exactement 24 h en modifiant la phase et la période endogène des oscillations de l'horloge. Chez des animaux placés en DD, l'exposition à la lumière à différents moments peut entraîner un décalage de phase du rythme de l'activité locomotrice (Hannibal, 2002 pour revue). L'application d'un créneau lumineux durant le jour subjectif n'induit pas de changement de phase (**Figure 8A**). Par contre, un créneau appliqué en début de nuit subjective induit un retard de phase (**Figure 8B**), l'activité locomotrice débute alors plus tard. Une avance de phase est observée quand l'exposition lumineuse a lieu en fin de nuit (**Figure 8C**), l'activité locomotrice débute alors plus tôt. Les différents décalages de phases induits par les créneaux lumineux peuvent être retranscrits selon une courbe dite de "réponse de phase" (**Figure 8**). Les décalages provoqués par la lumière sont également fonction de l'intensité et de la durée du créneau (Nelson & Takahashi, 1991 pour revue; Meijer *et al.*, 1992; Reppert & Weaver, 2002).

L'exposition à un créneau de lumière a également des conséquences à l'échelle cellulaire. La lumière, *via* le RHT, est responsable d'une augmentation du glutamate dans les NSC. Le glutamate va se fixer sur les récepteurs NMDA, comme précédemment évoqué. Un traitement avec un antagoniste de ces récepteurs (MK801), avant un créneau de lumière, permet de réduire les effets de la lumière sur l'horloge (Colwell *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1994). Au contraire, un traitement avec un agoniste des récepteurs NMDA mime les effets de la lumière (Mintz & Albers, 1997).

De même, l'application d'un créneau de lumière, aussi bien durant le jour ou la nuit subjective, induit une augmentation de la fréquence de décharge des neurones. Néanmoins, cette augmentation est plus importante lorsque le créneau est appliqué pendant la nuit. Cette observation peut s'expliquer par une activité basale des neurones déjà plus élevée le jour par rapport à la nuit (Meijer *et al.*, 1998).

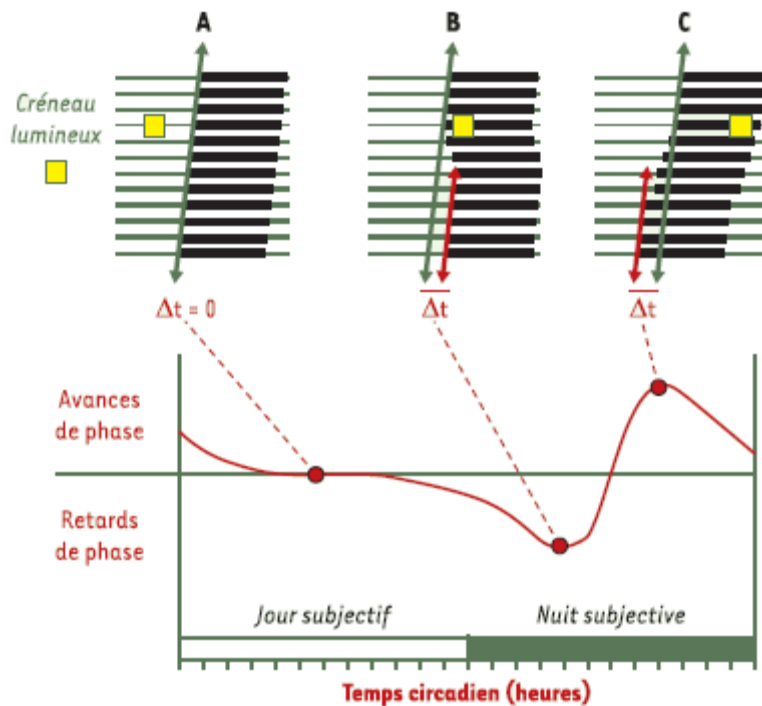


Figure 8 : Représentation des décalages de phases induits par la lumière sur l'activité locomotrice (d'après Dardente & Cermakian, 2005). (A) Actogramme enregistré après un créneau lumineux appliqué durant le jour subjectif, (B) en début de nuit et (C) fin de nuit subjective. La différence temporelle (Δt) obtenue pour chaque situation est représentée sous forme de courbe, la courbe de réponse de phase.

Par ailleurs, l'application d'un créneau de lumière durant la nuit, conduit à une expression rapide des gènes *Per1* (Shigeyoshi *et al.*, 1997) et *Per2* (Shearman *et al.*, 1997). De nombreuses études ont démontré l'importance du rôle de ces gènes dans les décalages de phases de l'activité locomotrice observés en réponse à un créneau de lumière. L'utilisation d'AS-ODN (antisense oligodeoxynucléotides) dirigés contre *Per1* et *Per2* inhibe l'apparition des décalages de phase (Akiyama *et al.*, 1999; Tischkau *et al.*, 2003). Si ces deux gènes semblent bien être impliqués dans les mécanismes de synchronisation de l'horloge, la phase de sensibilité à la lumière varie d'un gène à l'autre (Albrecht *et al.*, 1997). L'expression de *Per1* augmente après un créneau de lumière appliqué aussi bien en début qu'en fin de nuit subjective (Shearman *et al.*, 1997; Shigeyoshi *et al.*, 1997; Takumi *et al.*, 1998; Akiyama *et al.*, 1999; Field *et al.*, 2000; Yan & Silver, 2002). L'effet est similaire en ce qui concerne *Per2* mais uniquement quand la lumière est appliquée en début de nuit (Shearman *et al.*, 1997; Takumi *et al.*, 1998; Zylka *et al.*, 1998; Yan & Silver, 2002). Ainsi, d'après ces travaux, les décalages de phases de l'activité locomotrice induits par des créneaux

de lumière pendant la nuit seraient liés à *Per1* pour les avances de phase et à *Per1* et *Per2* pour les retards de phase. De même, des souris KO pour *Per1* et *Per2* ne présentent plus d'avance ni de retard de phase, respectivement pour chacun de ces gènes (Albrecht *et al.*, 2001), suite à des créneaux lumineux. Néanmoins, ce postulat reste encore très controversé, notamment par des études montrant que *Per1* et *Per2* ne sont pas nécessaires à l'apparition des décalages de phase (Cermakian *et al.*, 2001; Bae & Weaver, 2003).

La régionalisation présente au sein des NSC est à prendre en considération notamment dans l'induction du gène *Per1* après un créneau lumineux. En effet, l'expression du gène *Per1* semble restreinte à la partie vNSC (Sumova & Illnerova, 2005) et plus précisément dans les neurones à VIP (Dardente *et al.*, 2002). Néanmoins, un pic d'ARNm *Per1* apparaît dans la partie dmNSC mais plus tardivement (Hamada *et al.*, 2004), ceci s'expliquerait par les mécanismes de couplage s'opérant entre les deux régions.

Bmal1 serait également un gène impliqué dans la synchronisation des NSC par la lumière. L'application d'un créneau de lumière en début ou en fin de nuit subjective diminue la quantité de protéine BMAL1 (Tamaru *et al.*, 2000).

L'ensemble de ces données démontrent l'implication des gènes horloges dans les décalages de phase en réponse aux différentes variations lumineuses.

c. Synchronisation non photique

Bien que l'alternance jour/nuit soit le *Zeitgeber* le plus puissant, des facteurs non photiques peuvent synchroniser l'horloge circadienne. Ces stimuli peuvent être des facteurs comportementaux ou encore des facteurs alimentaires. Ils peuvent être également des agents pharmacologiques comme des injections de certains agonistes sérotoninergiques, de benzodiazépine ou de mélatonine (Challet & Pévet, 2003 pour revue).

A l'inverse de la lumière, la sensibilité aux facteurs non photiques semble être limitée au jour subjectif et la plupart de ces facteurs induisent des avances de phases.

D'un point de vue comportemental, l'induction de l'activité locomotrice est le facteur non photique le plus étudié. Par exemple, chez le hamster doré placé en DD, l'ajout d'une roue dans la cage durant sa période de repos l'incite à courir, ce qui va décaler la phase du rythme d'activité locomotrice. La présence de la roue induit une forte avance de phase (en moyenne 2 h) et de légers retards de phase, avec une amplitude plus ou moins grande, en fonction du moment où la roue est présentée (Reebs & Mrosovsky, 1989; Wickland & Turek, 1991).

D'un point de vue moléculaire, l'activation comportementale agit également sur l'expression des gènes *Per1* et *Per2*, de façon inverse par rapport à ce qui est observé avec le facteur photique. Ainsi, l'expression des gènes *Per1* et *Per2* est diminuée lorsque les facteurs non photiques sont appliqués durant le jour subjectif alors que l'application de lumière durant la nuit induit l'expression de ces deux mêmes gènes (Maywood *et al.*, 1999; Caldelas *et al.*, 2005).

Certains agents pharmacologiques sont capables d'induire une hyperactivité pendant la période de repos de l'animal, ayant pour conséquence également une avance de phase. Cet effet est produit lors d'injection de benzodiazépine durant le jour subjectif, comme le triazolam chez le hamster doré (Van Reeth & Turek, 1989) ou encore l'injection de morphine chez la souris (Marchant & Mistlberger, 1995).

La restriction alimentaire est capable de perturber les rythmes du système circadien. La restriction peut être calorique (régime hypocalorique donné chaque jour à la même heure) ou temporelle (accès quotidien à la nourriture limité à une certaine période). La restriction temporelle durant le jour, chez des rats maintenus en cycle lumière/obscurité (LD 12 :12), permet de synchroniser seulement une partie de l'activité locomotrice (**Figure 9**) qui anticipe le moment de la prise alimentaire (appelée FAA : Food Anticipatory Activity), tandis que la composante nocturne de l'activité est toujours présente. De plus, le rythme anticipatoire persiste également lorsque la privation de nourriture est totale (Mistlberger, 1994). Cette FAA s'avère indépendante de l'horloge centrale, puisque cette activité est toujours présente chez des souris ayant une lésion bilatérale des NSC (Marchant & Mistlberger, 1997). Ce processus robuste suggère qu'il existe dans le système circadien une horloge liée à la prise alimentaire. En revanche, la restriction calorique constitue un puissant *Zeitgeber* pour l'horloge centrale. En effet, en conditions DD, un régime hypocalorique quotidien synchronise le rythme d'activité locomotrice et de la température corporelle (Challet *et al.*, 1996).

Un facteur non photique qu'il est également intéressant de considérer, c'est la mélatonine (Pévet *et al.*, 2002). Il s'agit d'une hormone jouant un rôle important dans le système circadien (un chapitre y sera consacré ultérieurement). Cette hormone injectée en fin de jour subjectif est capable d'entraîner les rythmes circadiens aussi bien chez des rongeurs nocturnes (Armstrong & Redman, 1985; Pitrosky *et al.*, 1999) que chez les diurnes (Slotten *et al.*, 2002).

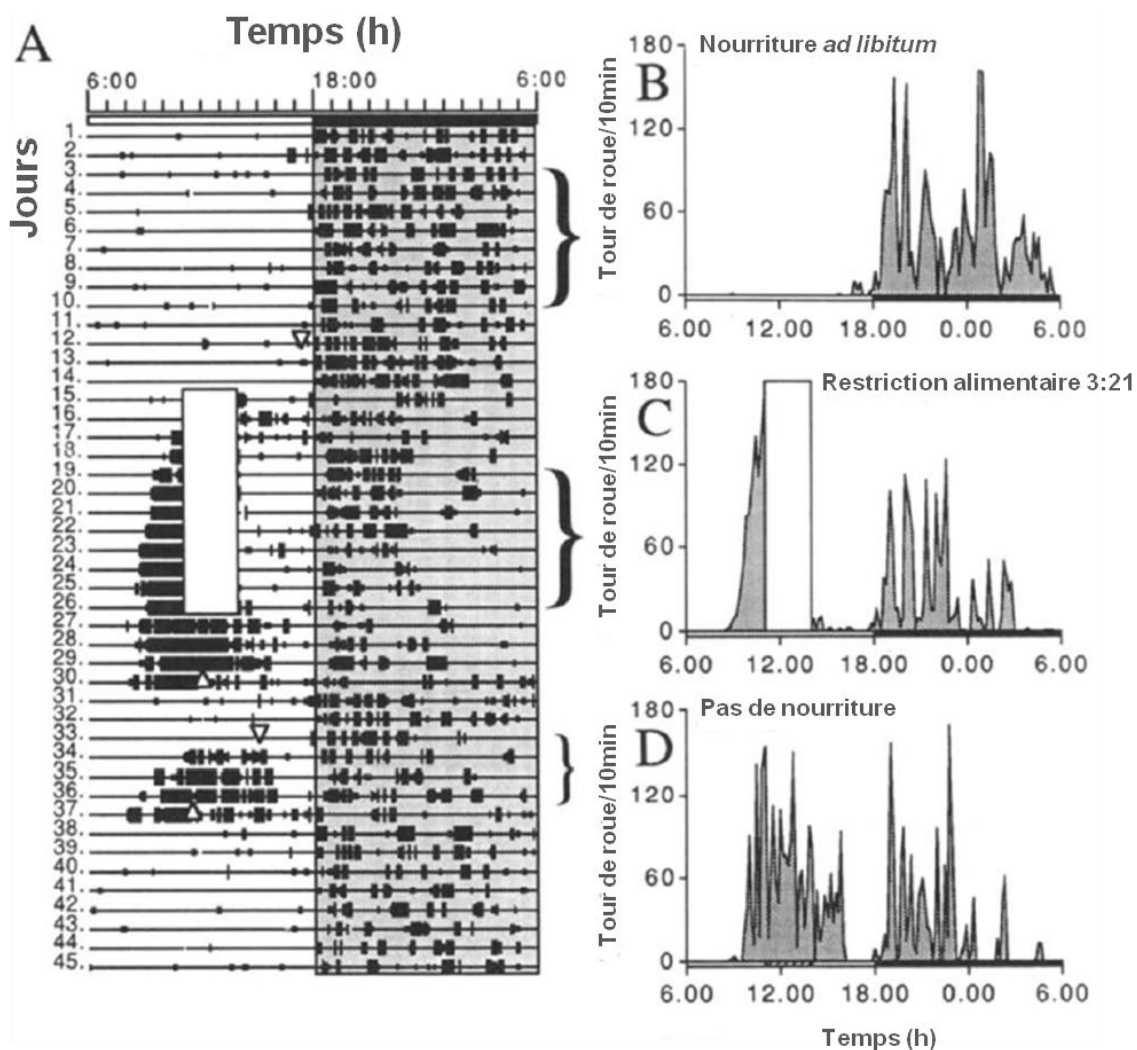


Figure 9 : La restriction alimentaire temporelle induit une activité locomotrice anticipatoire (d'après Mistlberger, 1994). (A) Actogramme représentant l'activité de roue chez des rats placés en LD 12 :12 durant un accès *ad libitum* puis restreint à la nourriture. La barre verticale blanche symbolise la durée où la nourriture est présente (3 h). Les triangles situés en bas de l'actogramme représentent le début (vers le bas) et la fin (vers le haut) de la privation totale de nourriture. (B) Signaux de l'activité de roue durant l'accès *ad libitum*, (C) limité à la nourriture et (D) lors d'une privation totale.

Ainsi, la synchronisation du système circadien résulte d'un ensemble complexe prenant en considération de multiples facteurs environnementaux (lumière, disponibilité alimentaire...), et ce, à différents niveaux d'organisation (physiologique, cellulaire et moléculaire) afin d'adapter au mieux l'organisme à son milieu. Bien que la transmission des signaux à l'horloge s'avère indispensable à la construction du message temporel, il est également nécessaire que ce message soit distribué à l'ensemble de l'organisme.

2.4. Distribution du message temporel : les différentes voies efférentes

Les rythmes circadiens générés au sein des NSC vont régir différentes fonctions physiologiques, notamment l'activité locomotrice, la température corporelle, les comportements dipsique et alimentaire mais encore la sécrétion de certaines hormones. Pour distribuer les signaux circadiens aux autres structures de l'organisme, les NSC empruntent des efférences nerveuses, humorales et hormonales

a. Sorties nerveuses, humorales et hormonales des NSC

Chez des rongeurs dont les NSC ont été lésés, la greffe dans le 3^{ème} ventricule de NSC encapsulés dans une membrane perméable permet de restaurer le rythme d'activité locomotrice (Silver *et al.*, 1996). Ces travaux indiquent que la diffusion d'un composé à partir du greffon est suffisante pour induire le rythme d'activité et démontrent ainsi l'existence d'une communication par facteurs diffusibles. Les facteurs diffusibles impliqués seraient le TGF α (Transforming Growth Factor) et la PK2 (Prokineticin 2). Tous deux sont exprimés durant le jour dans les NSC et leur injection intracérébroventriculaire inhibe le rythme d'activité locomotrice (Kramer *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002). Toutefois, dans ce type de protocole, où aucune connexion neuronale ne peut s'établir, tous les rythmes ne sont pas rétablis (mélatonine et corticostérone), ce qui montre l'importance d'une communication en particulier nerveuse.

Les données anatomiques montrent que les afférences neuronales des NSC projettent vers l'aire préoptique médiane, les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (NPV), les noyaux sub-paraventriculaires de l'hypothalamus ainsi que l'hypothalamus dorso et ventro-médian (HDM et HVM). Les NSC projettent également vers d'autres structures cérébrales, telles que les noyaux paraventriculaires du thalamus (PVT) et les FIG (Watts & Swanson, 1987; Watts *et al.*, 1987).

Les NPV constituent la cible la plus importante des NSC et jouent un rôle important dans le contrôle des sécrétions neuroendocrines, notamment de la mélatonine et de la corticostérone. Le contrôle de la sécrétion nocturne de la mélatonine emprunte une voie polyneuronal dont les NPV sont le premier relais, avec essentiellement comme neurotransmetteurs le GABA et le glutamate (Hermes *et al.*, 1996; Kalsbeek *et al.*, 1999; Perreau-Lenz *et al.*, 2004). De même, les NSC vont contrôler la sécrétion de corticostérone plasmatique *via* un contact synaptique direct avec les neurones à CRH (Corticotropin Releasing Hormone) dans les NPV (Kalsbeek *et al.*, 1992; Kalsbeek *et al.*, 1996). Ainsi, les NSC vont contrôler la libération rythmique d'hormones telles que la mélatonine et la

corticostérone. Ces hormones sont véhiculées dans la circulation sanguine, elles peuvent alors distribuer le message temporel dans l'organisme entier et s'avèrent importantes pour le système circadien. Une partie de l'introduction sera dédiée à l'une de ces hormones, la mélatonine.

b. Implication des oscillateurs périphériques

Depuis les années 2000, plusieurs travaux chez les Mammifères ont mis en évidence des oscillateurs circadiens en dehors des NSC. En effet d'autres structures cérébrales, des tissus périphériques (la rétine, le foie, les reins, les muscles, etc.) ainsi que des cellules isolées expriment des gènes horloges (Dibner *et al.*, 2010 pour revue). Les études menées sur des fibroblastes en culture confirment que chaque cellule possède sa propre horloge circadienne (Balsalobre *et al.*, 1998; Welsh *et al.*, 2004; Sandu *et al.*, 2012).

Il est bien établi chez les Mammifères que les oscillateurs périphériques présentent une boucle moléculaire semblable à celle observée dans les NSC mais que les oscillations sont moins persistantes et s'amortissent rapidement *in vitro* (Yagita *et al.*, 2001). Toutefois, dans le même temps, il a été montré que les oscillations peuvent être relancées par plusieurs facteurs dont le changement du milieu de culture ou l'application d'un sérum (Balsalobre *et al.*, 1998). Depuis, plusieurs études ont prouvé que les cellules individuelles sont capables d'osciller de manière auto-entretenu sur une longue période de culture (Nagoshi *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004). La synchronisation de ces oscillateurs individuels en périphérie est un paramètre important à prendre en considération pour assurer le bon fonctionnement de l'ensemble des tissus et des organes. Les NSC s'avèrent être essentiels à cette synchronisation puisque leur lésion provoque une différence de phase des oscillateurs périphériques. Par exemple, l'étude de Guo *et coll.* (2006) a montré que des NSC fonctionnels sont nécessaires pour synchroniser les hépatocytes du foie entre eux. Le rôle de chef d'orchestre, conféré aux NSC, est également appuyé par des travaux réalisés sur des souris sauvages sur lesquelles des fibroblastes de souris mutantes pour *Per1* (période endogène courte) ont été greffés. Les fibroblastes des souris mutantes présentent alors la même période que les fibroblastes des souris sauvages (Pando *et al.*, 2002). Ces résultats démontrent la dominance hiérarchique des NSC.

Ainsi, les NSC jouent bien leur fonction d'horloge centrale en contrôlant la rythmicité des différents oscillateurs périphériques *via* les voies nerveuses et/ou humorales, en fonction de l'organe considéré. Parmi les messagers qui vont transmettre l'information

temporelle, une hormone particulière se distingue, la mélatonine. Dans la partie suivante, nous verrons en quoi cette hormone joue un rôle important et central dans le système circadien.

3. Le rythme de sécrétion de la mélatonine... "le premier violon qui donne le LA"

L'histoire de la mélatonine débute suite à la lecture d'un article de Mac Cord et Allen (1917) qui évoque la dépigmentation de la peau des batraciens après immersion dans un bain contenant des extraits de glande pinéale bovine. Après une investigation littéraire, Lerner et coll. (1958) entreprirent de nombreuses expériences pour isoler l'agent responsable de cet effet : la N-acétyl-5-méthoxytryptamine. L'éclaircissement de la peau étant la conséquence de l'agrégation des grains de mélanine dans les mélanocytes de la peau de grenouille, ils baptisèrent la molécule isolée, "mélatonine".

3.1. Synthèse de la mélatonine

a. La glande pinéale : lieu de synthèse de la mélatonine

La mélatonine est une hormone synthétisée principalement dans la glande pinéale (évagination du toit du diencephale). Il faut noter que d'autres sources de synthèse de la mélatonine existent également, telle que la rétine, la glande de Harder, les intestins, les plaquettes sanguines, etc. Chez les rongeurs, la glande pinéale devient superficielle après migration et se retrouve sur l'axe central du cerveau entre les deux hémisphères et le cervelet, celle-ci est reliée à une partie profonde au niveau du 3^{ème} ventricule par la tige épiphysaire (Moller & Baeres, 2002 pour revue). La glande pinéale est principalement constituée de pinéalocytes, cellules dérivées des photorécepteurs qui, chez les Mammifères se sont spécialisées en cellules endocrines capables de synthétiser la mélatonine (Falcon, 1999 pour revue). La glande superficielle est richement vascularisée mais elle est également très innervée. En effet, les principales afférences proviennent des fibres sympathiques provenant d'une voie polysynaptique depuis les NSC. La glande pinéale est ainsi sous le contrôle de l'horloge en impliquant successivement les NPV, les colonnes intermedio-latérales de la moelle épinière (IML) et les ganglions cervicaux supérieurs (GCS). Les GCS sont constitués de neurones noradrénergiques, dont la NA co-localise avec le NPY, qui projettent sur la glande pinéale (Zhang *et al.*, 1991). Néanmoins, suite à une ganglionectomie (ablation des GCS), cela ne supprime pas pour autant toute l'innervation de la glande pinéale, laissant

supposer la présence d'une autre innervation (Moller & Korf, 1983; Zhang *et al.*, 1991). Même si l'innervation sympathique reste majoritaire, il existe une innervation parasympathique provenant entre autre des ganglions sphéno-palatins et otiques (Shiotani *et al.*, 1986; Moller & Liu, 1999) dont le rôle est très limité dans le contrôle de la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale.

b. Voie de biosynthèse de la mélatonine

La première étape de la voie de biosynthèse (**Figure 10**) est la capture par les pinéalocytes du tryptophane (Trp) circulant, celui-ci sera converti en 5-hydroxy-tryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase mitochondriale. Une décarboxylation du 5-HTP va produire la 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine) en grande quantité dans la glande pinéale pendant la journée avant de diminuer en début d'obscurité. La conversion de la 5-HT en mélatonine se fait en deux étapes successives (Simonneaux & Ribelayga, 2003 pour revue) :

- en premier lieu **une acétylation** de la 5-HT par l'arylalkylamine N-acétyl transférase (AA-NAT) va produire la N-acétylsérotonine (NAS). L'activité de cette enzyme présente des variations dépendantes du rythme lumière/obscurité avec un pic au cours de la nuit. Le rythme endogène de la synthèse de la mélatonine suit le rythme de l'AA-NAT qui constitue donc l'enzyme limitante de cette voie de biosynthèse rythmique (Klein *et al.*, 1997).

- enfin **la méthylation** de la NAS par l'hydroxyindole-O-méthyle (HIOMT) va donner la mélatonine. Contrairement à l'AA-NAT, l'activité de l'HIOMT est plus stable et n'est pas limitante dans la synthèse nyctémérale mais interviendrait lors des variations photopériodiques de la sécrétion de mélatonine (Ribelayga *et al.*, 2000).

La mélatonine n'est pas stockée dans la glande pinéale mais est directement libérée dans la circulation sanguine après sa synthèse.

c. Sécrétion de la mélatonine

Chez les Mammifères, qu'ils soient diurnes ou nocturnes, la sécrétion de mélatonine a toujours lieu durant la nuit (Klein & Weller, 1970; Wilkinson *et al.*, 1977). De plus, la durée de sécrétion de cette hormone est dépendante de la durée de la nuit (**Figure 11**), lorsque la nuit est courte (photopériode longue, LP) la sécrétion de mélatonine va l'être également et inversement lorsque la nuit est longue (photopériode courte, SP), la sécrétion de mélatonine va être longue (Illnerova & Vanecek, 1980). Chez les Mammifères, le rythme de

sécrétion de la mélatonine est générée par les NSC qui, pour se faire, transmettent un message nerveux par la voie polysynaptique induisant une libération nocturne de noradrénaline (NA) qui va stimuler les récepteurs β -1 adrénergiques présents sur les pinéaloctes (Pévet, 2003).

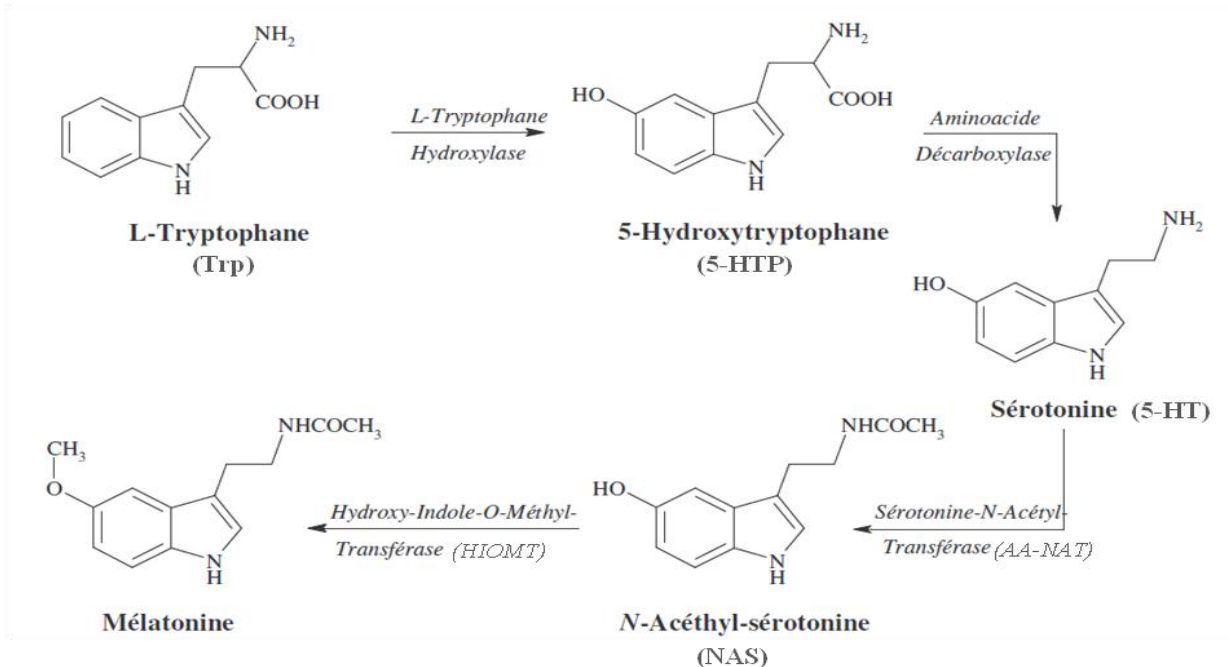


Figure 10 : Voie de biosynthèse de la mélatonine dans la glande pinéale.

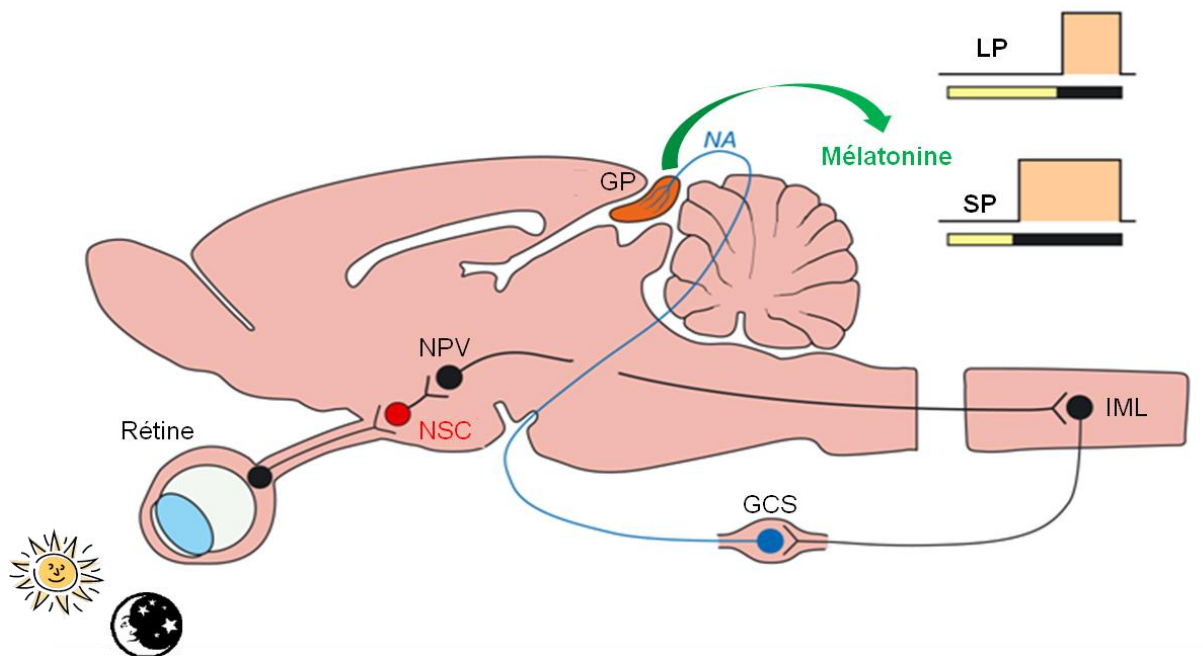


Figure 11 : Voie polysynaptique impliquée dans la transmission du message temporel jusqu'à la glande pinéale. Coupe sagittale de cerveau de rat représentant les différents relais qui interviennent dans la sécrétion de mélatonine dont la durée est fonction des variations lumineuses. NSC : noyaux suprachiasmatiques, NPV : noyaux paraventriculaires, GCS : ganglions cervicaux supérieurs, IML : colonne intermédiaire-latérale, GP : glande pinéale. La barre jaune et noire représente l'alternance jour/nuit de la lumière (LP : long photoperiod, SP : short photoperiod).

Le rythme de sécrétion de la mélatonine persiste en obscurité constante tant que l'intégrité des NSC est préservée alors que l'application d'un créneau de lumière pendant la période nocturne abolit ce rythme (Klein & Weller, 1970; Illnerova *et al.*, 1979). La mélatonine représente un bon signal efférent de l'horloge qui définit "la nuit biologique". De plus, sa nature lipophile lui permet de traverser librement les membranes cellulaires et va donc pouvoir distribuer le message temporel à l'ensemble des tissus.

Ainsi, la mélatonine est considérée comme une hormone "donneuse de temps" jouant un rôle fondamental dans le fonctionnement coordonné des processus biologiques.

d. Catabolisme de la mélatonine

La mélatonine est métabolisée principalement par le foie où elle est hydroxylée en 6-hydroxy-mélatonine. Ce catabolisme est très rapide puisque la demi-vie de la mélatonine est de 20 minutes dans le sang (Gibbs & Vriend, 1981). La 6-hydroxy-mélatonine est excrétée sous forme d'un sulfate ou d'un glucuronide (Kopin *et al.*, 1961). Chez l'Homme et les rats, c'est la forme sulfatée qui est couramment mesurée dans les urines (Fournier *et al.*, 2002; Ritzenthaler *et al.*, 2009) car elle constitue un bon marqueur de la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale. Dans le cerveau la mélatonine est métabolisée en méthoxy-kynuramine (Hirata & Hayaishi, 1972)

3.2. *Sites et mécanismes d'action*

Le message hormonal de la mélatonine est transmis *via* des récepteurs spécifiques ayant une haute affinité pour la mélatonine. Ces récepteurs ont pu être identifiés et caractérisés à partir d'études d'autoradiographie quantitative et de l'utilisation de la [¹²⁵I]iodomelatonine (I-MEL) comme ligand (Vanecek *et al.*, 1987; Morgan *et al.*, 1994)

a. Les récepteurs de la mélatonine

C'est en 1994 qu'a eu lieu le clonage du premier récepteur de la mélatonine à partir de la peau de Xénope (Reppert *et al.*, 1994). À partir de cette première séquence, 3 sous-types de récepteurs de la mélatonine ont été clonés chez les vertébrés. Chez les Mammifères, deux d'entre eux présentent une haute affinité pour la mélatonine (constante de dissociation inférieure à 200 pM), ils sont appelés MT1 (Reppert *et al.*, 1994) et MT2 (Reppert *et al.*, 1995). Tandis que le récepteur originellement cloné chez le Xénope (appelé

Mel_{1c}) est présent chez d'autres vertébrés, mais pas chez les Mammifères (Reppert *et al.*, 1996; von Gall *et al.*, 2002 pour revues).

Le troisième type de récepteurs décrit est à faible affinité (constante de dissociation entre 1 et 10 nM) et a été nommé MT3. Le clonage de ce récepteur a montré qu'il s'agissait d'une enzyme impliquée dans la détoxification, c'est la quinone réductase 2 (Nosjean *et al.*, 2000).

La distribution de ces récepteurs a largement été étudiée grâce à l'utilisation de l'I-MEL, rapportant un très grand nombre de structures cérébrales (NSC, cerebellum, cortex, hippocampe, hypothalamus et artères cérébrales) et périphériques (rétine, rein, adipocytes, surrénales) qui expriment ces sites de liaison (Pévet *et al.*, 2002 pour revue). Cependant, une très grande variabilité entre espèces a été notée dans le nombre de structures marquées et dans la nature de ces structures (Masson-Pévet *et al.*, 1994). Seuls les NSC de l'hypothalamus et la *pars tuberalis* (PT) de l'adénohypophyse sont des structures communes la plupart des espèces présentant un marquage pour ces récepteurs (Masson-Pévet *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1994 pour revue).

b. Voies de transduction du signal mélatonine

Les récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs sont couplés négativement à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire d'une protéine Gi/o sensible à la toxine pertussique (Reppert *et al.*, 1994; Van den Top *et al.*, 2001). La stimulation des récepteurs de la mélatonine a pour conséquence une inhibition de la voie adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Niles & Hashemi, 1990; Brydon *et al.*, 1999) et de ce fait, une diminution de la protéine kinase A (PKA) (Morgan *et al.*, 1994 pour revue). Parallèlement à cette voie AMPC, il existe d'autres voies de signalisation qui diffèrent selon les structures et les types cellulaires étudiés (Barrett *et al.*, 2003; Boutin *et al.*, 2005; Guardiola-Lemaitre, 2005 pour revues). Ainsi, il a également été constaté que l'activation des récepteurs MT1 augmente la concentration de calcium et stimule la protéine kinase C (PKC) suite à l'activation de la phospholipase C (PLC) par les sous unités $\beta\gamma$ de la protéine G (Godson & Reppert, 1997). De même, l'activation de ces récepteurs entraîne une stimulation des courants potassiques hyperpolarisants de type Kir3 (canaux couplés aux protéines Gi) (Nelson *et al.*, 1996) impliqués dans l'inhibition de l'activité électrique spontanée des NSC. Les récepteurs MT2, comme les MT1, sont couplés au métabolisme des phosphoinositides qui conduit à une activation de la PKC et à une augmentation du calcium intracellulaire. Les

récepteurs MT2 sont capables d'inhiber l'accumulation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Dubocovich *et al.*, 2003).

3.3. Rôles physiologiques de la mélatonine au sein du système circadien

Comme évoqué précédemment, la sécrétion de mélatonine est contrôlée par les NSC et constitue un signal de sortie de l'horloge. La durée de ce pic de mélatonine reflète la durée de la nuit et, de ce fait, présente des variations en fonction de la photopériode. Ainsi, la mélatonine intervient à la fois dans l'organisation temporelle circadienne et saisonnière. Le rôle de la mélatonine dans les variations saisonnières a largement été étudié (Reiter, 1993; Pévet, 2003; Morgan & Hazlerigg, 2008 pour revues). Dans cette partie, seul le rôle de la mélatonine dans le système circadien sera pris en considération.

Chez les Mammifères, la glande pinéale ne semble pas être directement impliquée dans la genèse et le maintien de la rythmicité circadienne. En effet, la pinéalectomie (absence de synthèse de mélatonine endogène) semble à peu d'effet sur le rythme circadien de l'activité locomotrice (Underwood & Goldman, 1987). La distribution du message temporel aux différents tissus cibles est également assurée par les autres sorties de l'horloge, ce qui expliquerait le peu d'effet suite à une pinéalectomie (Kramer *et al.*, 2001). Pourtant, la mélatonine occupe une place importante dans l'organisation circadienne (Stehle *et al.*, 2002 pour revue). Suite à une pinéalectomie, la désynchronisation de plusieurs paramètres physiologiques a été décrite. Par exemple, chez des rats pinéalectomisés, le réentraînement du rythme d'activité locomotrice est allongé après un déphasage du cycle LD (Armstrong, 1989). Une semaine après la pinéalectomie, le rythme d'activité électrique des neurones des NSC *in vitro* est altéré, une diminution de leurs fréquence de décharge est alors observée (Rusak & Yu, 1993). La mélatonine interfère également avec l'activité métabolique des NSC (utilisation du glucose et synthèse des protéines) (Cassone *et al.*, 1988).

Le rythme de mélatonine étant sous le contrôle des NSC, la mélatonine permet donc de transmettre le message circadien à l'ensemble des structures possédant des récepteurs de la mélatonine. Par exemple, au niveau de la *pars tuberalis*, le rythme circadien de la densité des récepteurs de la mélatonine est supprimé après une pinéalectomie chez le rat, ce rythme semble être sous le contrôle unique de la mélatonine indépendamment des NSC ou du cycle LD (Gauer *et al.*, 1994). Dans cette même structure, la mélatonine contrôle

directement l'expression rythmique du gène horloge *Per1* (Messager *et al.*, 1999; Messager *et al.*, 2000) et *Cry1* (Dardente *et al.*, 2003).

La présence de récepteurs MT1 et MT2 sur les NSC permet d'envisager une influence de la mélatonine exogène (MLT) sur la régulation circadienne. L'ensemble des données décrites précédemment concernait le rôle de la mélatonine endogène. Dans la partie suivante, les effets de la mélatonine exogène vont être abordés.

a. Propriétés chronobiotiques de la mélatonine exogène

Par définition, une drogue chronobiotique est une drogue capable de modifier la phase (par rapport au cycle LD) ou la période de l'horloge biologique (Reinberg & Ashkenazi, 1993). La MLT est une drogue chronobiotique capable d'agir directement sur l'organisation temporelle des fonctions (Pévet *et al.*, 2002). En effet, l'administration à des doses supraphysiologiques de MLT peut entraîner le rythme d'activité locomotrice des rongeurs en libre cours (Cassone & Natesan, 1997; Weaver, 1999). Par exemple, le rythme d'activité locomotrice est fortement affecté suite à des injections quotidiennes de MLT (Redman *et al.*, 1983) ou suite à l'ajout de la MLT dans l'eau de boisson (Slotten *et al.*, 1999). Il est également important de noter que l'entraînement des animaux a lieu uniquement lorsque l'injection de MLT coïncide avec le début de l'activité pour les espèces nocturnes (**Figure 12A**) et la fin d'activité pour les espèces diurnes (**Figure 12B**), ce qui correspond à la même fenêtre circadienne (Redman *et al.*, 1983; Slotten *et al.*, 2002). Un protocole d'infusion de MLT a également été développé afin de contrôler au mieux la durée d'administration de MLT toujours sans avoir à manipuler les animaux (Pitrosky *et al.*, 1999). Dans cette expérience, la MLT a été infusée pendant différentes durées (de 1 h à 16 h par jour) et pour chaque condition un entraînement des rythmes de la température corporelle (T_c), de l'activité de roue et de l'activité générale locomotrice à une période de 24 h a été observé. Néanmoins, l'efficacité de la MLT décroît lorsqu'elle est infusée pendant une longue durée (16 h). Ainsi, le mode d'administration de la MLT ne semble pas intervenir dans l'effet induit mais il faut noter l'importance des doses utilisées (Cassone *et al.*, 1986; Pitrosky *et al.*, 1999; Slotten *et al.*, 1999). Ces doses de MLT induisent une concentration sérique 100 à 1000 fois plus élevée par rapport au pic nocturne de mélatonine endogène.

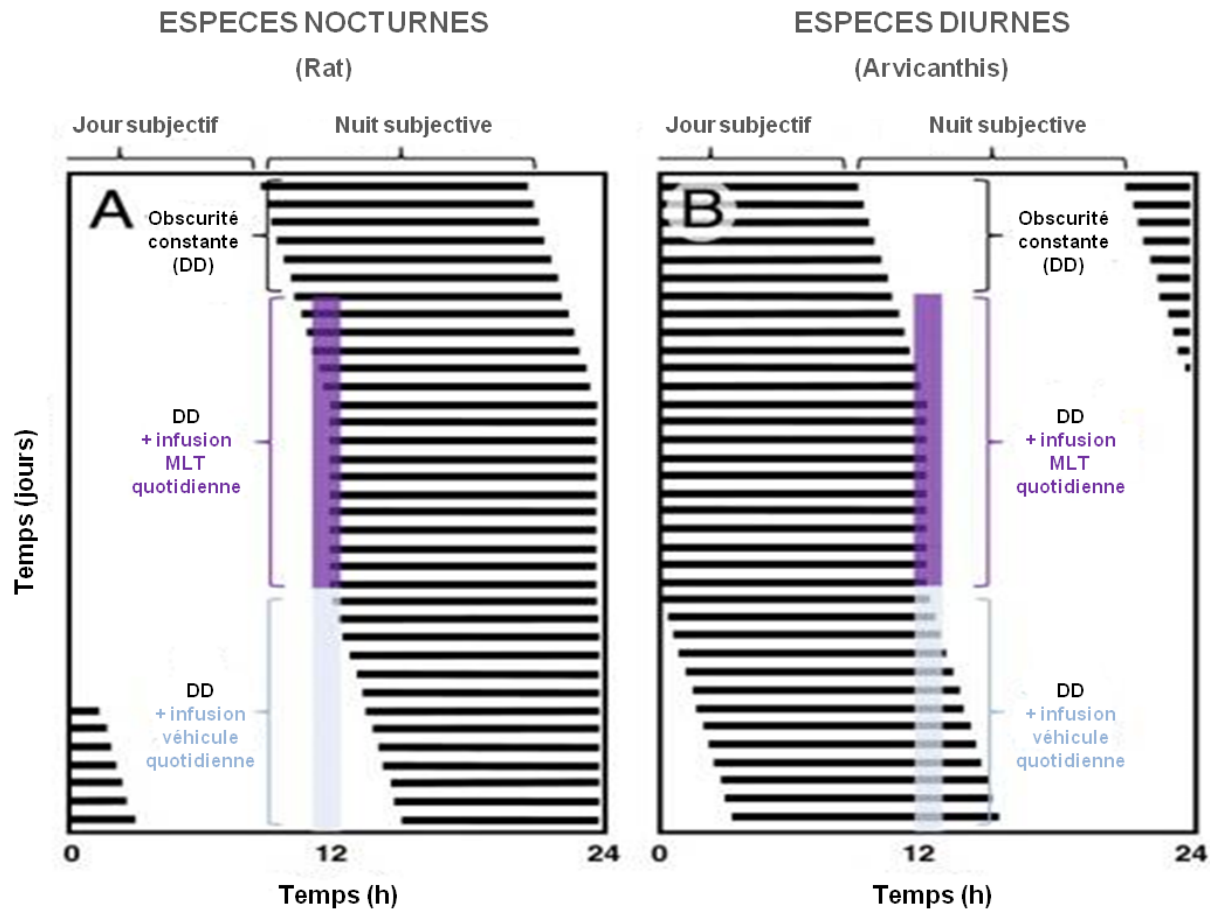


Figure 12 : Actogramme représentant l'entraînement du rythme de l'activité locomotrice par la mélatonine exogène (MLT) (d'après Pévet & Challet, 2011). (A) Pour une espèce nocturne, chez des rats placés en obscurité constante (DD), l'injection de MLT quotidienne entraîne le rythme d'activité locomotrice lorsque l'infusion coïncide avec le début d'activité. (B) Pour une espèce diurne, chez les Arvicanthis placés en DD, l'entraînement se produit pendant la même fenêtre circadienne qui correspond cette fois-ci avec la fin de la période d'activité. Dans les deux cas, le libre cours reprend après infusion du véhicule.

La MLT est également capable d'imposer une période différente de 24 h démontrant ainsi sa puissance comme synchroniseur non photique (Pitrosky *et al.*, 1999; Slotten *et al.*, 2002). La mise en évidence de cette propriété lui a valu un grand intérêt thérapeutique chez l'Homme pour lequel les propriétés chronobiotiques ont également été démontrées sur différents rythmes circadiens (sécrétion de mélatonine et corticostérone, la Tc) (Lewy *et al.*, 1992).

En effet, chez certains aveugles, la MLT procure des effets positifs, notamment sur la resynchronisation du sommeil. Les aveugles, qui ne peuvent pas être entraînés par le cycle jour/nuit, présentent un cycle veille/sommeil en libre cours. La prise de

MLT à une dose et à un moment précis permet la resynchronisation de leur cycle veille/sommeil (Lockley *et al.*, 2000; Hack *et al.*, 2003). De même, l'administration de MLT chez des animaux ayant subi un décalage de phase de quelques heures (par avance brutale de la période obscure) permet une resynchronisation rapide avec l'environnement lumineux (Redman & Armstrong, 1988). À partir de ces observations, différents travaux ont été réalisés dans le but d'utiliser la MLT contre le décalage horaire ou dans le cas de troubles induits par le travail posté (Claustrat *et al.*, 1992; Haimov & Arendt, 1999). Avec le vieillissement, on observe un affaiblissement de certaines fonctions rythmiques telles qu'une diminution de l'amplitude des rythmes hormonaux, une avance de phase de la Tc et une déstructuration du sommeil. Les propriétés chronobiotiques de la MLT ont également des effets bénéfiques sur la qualité du sommeil des personnes âgées (Siegrist *et al.*, 2001). Dans ces cas, l'effet de la MLT sur l'organisation temporelle des fonctions s'avère efficace de par sa capacité à moduler les oscillations en agissant directement sur l'horloge.

b. Action de la mélatonine exogène sur l'horloge centrale

Chez de nombreux Mammifères, y compris chez l'Homme, les NSC expriment des récepteurs MT1 et MT2, ce qui implique que la MLT ou tout agoniste sélectif de ces récepteurs a la capacité d'agir sur le fonctionnement de l'horloge. Par exemple, *in vivo*, l'injection sous-cutanée (s.c) de MLT, en fin de jour subjectif chez des rats, diminue la consommation de glucose par les NSC (Cassone *et al.*, 1988). De même, l'application *in vitro* de MLT sur des tranches d'hypothalamus de rat inhibe l'activité électrique des NSC (Stehle *et al.*, 1989; Van den Top *et al.*, 2001).

La capacité de la MLT à entraîner le rythme d'activité est en corrélation avec la densité des récepteurs dans les NSC. Cette observation a été faite lors d'une expérience sur des jeunes hamsters Syriens dont le nombre de récepteurs diminue juste après la naissance. (Maywood *et al.*, 1995; Gauer *et al.*, 1998). Ainsi, les jeunes hamsters sont entraînés par une administration quotidienne de MLT (Grosse *et al.*, 1996) contrairement aux adultes (Hastings *et al.*, 1992). Une étude supplémentaire est venue appuyer ces résultats, chez des hamsters adultes dont les NSC ont été lésés, la greffe de NSC fœtaux permet l'entraînement par la MLT (Grosse & Davis, 1998). L'ensemble de ces travaux met en évidence que l'effet chronobiotique de la MLT est la conséquence d'une action sur l'horloge. De plus, l'administration d'un antagoniste des récepteurs de la mélatonine (S22153) bloque l'effet de la MLT (Weibel *et al.*, 1999).

À partir de ce constat, la MLT, en agissant sur l'horloge, pourrait donc influencer la sécrétion de mélatonine endogène qui s'avère être une sortie sous le contrôle direct de l'horloge mais pourrait également moduler d'autres sorties (Tc, activité locomotrice, etc.). Dans une étude, les effets de la MLT sur la synthèse de mélatonine dans la glande pinéale ont été suivis *in vivo*. Les profils de mélatonine ont été mesurés par microdialyse intrapinéale sur 4 jours consécutifs et la MLT a été administrée par microdialyse inverse directement dans les NSC (Bothorel *et al.*, 2002). Les résultats montrent une augmentation significative de l'amplitude du pic de mélatonine, que ce soit après administration directe dans les NSC ou bien après injection s.c de la MLT (effet persistant 2 jours après administration). Ce résultat suggère une action directe sur l'amplitude des oscillations de l'horloge. Cet effet n'a été obtenu que lorsque la MLT était administrée à ZT12 (Bothorel *et al.*, 2002), cette fenêtre de sensibilité est semblable à celle observée pour ses effets chronobiotiques.

La sécrétion nocturne de mélatonine est une sortie de l'horloge capable de transmettre l'information circadienne à de nombreuses structures centrales et/ou périphériques présentant des récepteurs de la mélatonine. Plus particulièrement, la présence de ces récepteurs au niveau des NSC permet à la MLT d'induire un effet chronobiotique au sein de l'horloge et de moduler l'amplitude de ses oscillations. L'ensemble des propriétés de la MLT suscite un intérêt thérapeutique dans le cadre de la restructuration des rythmes biologiques. Des troubles circadiens sont notamment retrouvés chez les personnes âgées, les aveugles, les travailleurs postés, les voyageurs transméridiens ou bien encore chez les personnes souffrant d'épisodes dépressifs majeurs, d'où le développement récent d'agonistes de la MLT. Dans la dernière partie de l'introduction, les relations entre rythmes circadiens et dépression seront abordés et un point sera consacré à l'un de ces agonistes de la MLT élaboré afin de pallier les perturbations circadiennes.

III. Dépression et rythmes circadiens

La dépression est un problème majeur de santé publique et considérée comme l'une des 10 pathologies majeures à l'heure actuelle et deviendra d'ici 2020 la deuxième cause de morbidité (Kessler *et al.*, 2005). Le traitement de cette pathologie est donc un enjeu important

dont la cause et les processus neurobiologiques exacts impliqués ne sont pas encore complètement compris. De nombreuses hypothèses ont été avancées, notamment la déplétion en monoamine comme la 5-HT et la norépinephrine dans l'hippocampe, le système limbique et le cortex frontal qui serait à l'origine des symptômes rencontrés (Hindmarch, 2002; Booij *et al.*, 2003 pour revues). L'utilisation des antidépresseurs actuels qui agissent en augmentant les niveaux de monoamines ne sont complètement efficaces que pour un peu moins de la moitié des patients (Berton & Nestler, 2006 pour revue). Ainsi, l'hypothèse monoaminergique ne permet pas d'expliquer entièrement la physiopathologie de la dépression, d'où la recherche de nouvelles thérapies impliquant d'autres mécanismes d'action.

De nombreuses études suggèrent l'existence d'un lien entre les désorganisations des rythmes biologiques et les troubles de l'humeur, en particulier les troubles dépressifs. En effet, une grande proportion des patients déprimés présente des anomalies des rythmes circadiens (perturbations des paramètres biologiques, déstructuration du cycle veille/sommeil) associées à une variation circadienne des symptômes dépressifs, notamment l'humeur dépressive (Haffen & Sechter, 2006). De ce constat, émane l'idée que la restructuration des rythmes circadiens peut avoir un effet antidépresseur.

1. Troubles des rythmes circadiens et dépression..."quand la musique s'emballe"

1.1. Variations circadiennes de l'humeur dépressive

Il existe une périodicité circadienne de la réactivité émotionnelle corrélée aux variations temporelles des niveaux de vigilance et de l'activation centrale, pouvant moduler les réponses neurovégétatives et comportementales (Monteleone *et al.*, 2011 pour revue). Chez le sujet sain, la variation diurne de l'humeur avec une détérioration dans la soirée par rapport à la matinée, est influencée par de nombreux facteurs comme l'âge mais peut être également liée aux événements extérieurs (Tolle & Goetze, 1987; Gordijn *et al.*, 1994; Boivin *et al.*, 1997; Buysse *et al.*, 2004). La mise en place de protocole de désynchronisation (avance ou retard de phase) met en évidence de fortes variations de l'humeur dans la même journée ou d'un jour à l'autre (Wirz-Justice & Van den Hoofdakker, 1999). Chez les patients déprimés, en général l'humeur est basse le matin (aggravation des symptômes dépressifs) et s'améliore lentement au cours de la journée pour atteindre un maximum le soir (Gordijn *et al.*, 1994). Parmi les facteurs extérieurs pouvant influencer les variations de l'humeur, il est à noter

qu'une modification brutale des horaires de vie, notamment lors de voyages impliquant un changement de fuseau horaire, accentue les troubles de l'humeur chez les patients déprimés (Jauhar & Weller, 1982). Par ailleurs, les altérations circadiennes de l'humeur sont corrélées positivement à l'intensité de la dépression (Murray, 2007). Ainsi, ces différentes observations viennent appuyer l'importance des rythmes circadiens dans les épisodes dépressifs majeurs (EDM).

1.2. Perturbations du rythme veille-sommeil

Parmi les perturbations circadiennes associées à la dépression, les troubles du sommeil (insomnie, dysomnie) sont fréquemment observés. Près de 90% des patients déprimés se plaignent des difficultés à dormir (Casper *et al.*, 1985; Riemann *et al.*, 2001; Tsuno *et al.*, 2005 pour revue). En effet, des altérations importantes de l'architecture du sommeil sont observées lors d'enregistrements polysomnographiques (suivi simultané de l'électroencéphalogramme, l'électromyogramme et de l'électro-oculogramme) chez les patients déprimés. Le temps de latence d'endormissement est prolongé chez les patients dépressifs par rapport à des sujets sains. De même, les patients déprimés présentent une augmentation de la durée du sommeil paradoxal accompagnée d'un nombre accru des mouvements des yeux et à l'inverse une diminution du sommeil lent profond comparativement aux sujets sains (Shaffery *et al.*, 2003; Tsuno *et al.*, 2005). L'augmentation des réveils intermittents ainsi que les réveils matinaux précoces sont également enregistrés.

Une restructuration de l'architecture du sommeil est observée après guérison (Knowles *et al.*, 1986; Fava *et al.*, 2006). Cependant, des preuves cliniques et épidémiologiques montrent que la persistance des perturbations du sommeil est un indice de vulnérabilité dépressive et constituerait un facteur prédictif de rechutes (Mendlewicz, 2009; Harvey, 2011 pour revues). Une meilleure qualité de sommeil après traitement est associée à un taux plus faible de rechutes (Giles *et al.*, 1987; Kupfer *et al.*, 1990; Buysse *et al.*, 1997).

1.3. Altération des paramètres biologiques dans l'épisode dépressif majeur

Chez les patients présentant un EDM, plusieurs paramètres biologiques présentent des modifications de leur rythme circadien notamment une avance de phase, ceci s'observe particulièrement pour le rythme de la Tc et des sécrétions neuroendocrines.

De nombreuses études montrent des modifications du cycle de la Tc au cours d'un EDM (**Figure 13A**) (Souetre *et al.*, 1989; Avery *et al.*, 1999). La valeur moyenne de la température est plus élevée (Wehr *et al.*, 1980), l'amplitude est quant à elle diminuée (Souetre *et al.*, 1989) et la période est réduite chez les patients maniaque-dépressifs (Kripke *et al.*, 1978). L'acrophase a lieu en début d'après-midi (en fin d'après-midi chez les sujets sains) (Wehr *et al.*, 1980) et le minimum durant la première partie de la nuit (vers 2 à 4 h du matin chez les sujets sains) (Souetre *et al.*, 1989), ce qui traduit une avance de phase par rapport au cycle veille/sommeil. Cette avance de phase disparaît lors de la guérison de l'épisode.

De plus chez les patients déprimés, les changements nocturnes de la Tc sont inversement corrélés aux modifications nocturnes des taux plasmatiques de la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) (Souetre *et al.*, 1988). Pendant le sommeil, les concentrations plasmatiques et l'amplitude du pic de TSH sont plus faibles chez les patients déprimés par rapport aux sujets sains. De même, une avance du pic nocturne de TSH est observée au cours de l'EDM

La sécrétion rythmique du cortisol est caractérisée par des pics de sécrétion en fin de nuit et début de matinée et diminue progressivement au cours de la journée pour atteindre un minimum durant les premières heures de sommeil avant d'augmenter de nouveau. Cette sécrétion se retrouve modifiée lors d'un EDM (**Figure 13B**) avec une diminution d'amplitude du rythme, une avance de phase et une hypersécrétion est également observée chez la plupart des patients (Van Cauter *et al.*, 1996; Gervasoni *et al.*, 2004). Cependant, l'hypersécrétion de cortisol est très variable chez les patients déprimés et ne semble pas être liée à la désynchronisation du rythme circadien. Toutefois, le profil de sécrétion se normalise après guérison.

En raison de son rôle central dans le système circadien, la mélatonine a largement été étudiée lors d'épisodes dépressifs. Une désynchronisation du rythme circadien de mélatonine ainsi qu'une diminution de l'amplitude du pic nocturne associée à une avance de phase sont observées chez les patients déprimés (**Figure 13C**) (Claustrat *et al.*, 1984). Les rapports des sécrétions diurnes et nocturnes ont tendance à s'inverser. Cependant, il existe d'autres études qui ont montrés des résultats discordants avec notamment une augmentation de la sécrétion de mélatonine (Thompson *et al.*, 1988) et un retard de phase (Crasson *et al.*, 2004) observés chez les patients déprimés.

D'autres sécrétions hormonales sont également modifiées lors des EDM, notamment l'hormone de croissance (Sakkas *et al.*, 1998) ou encore la prolactine (Mendlewicz *et al.*, 1980) pour lesquelles l'amplitude du rythme est diminuée.

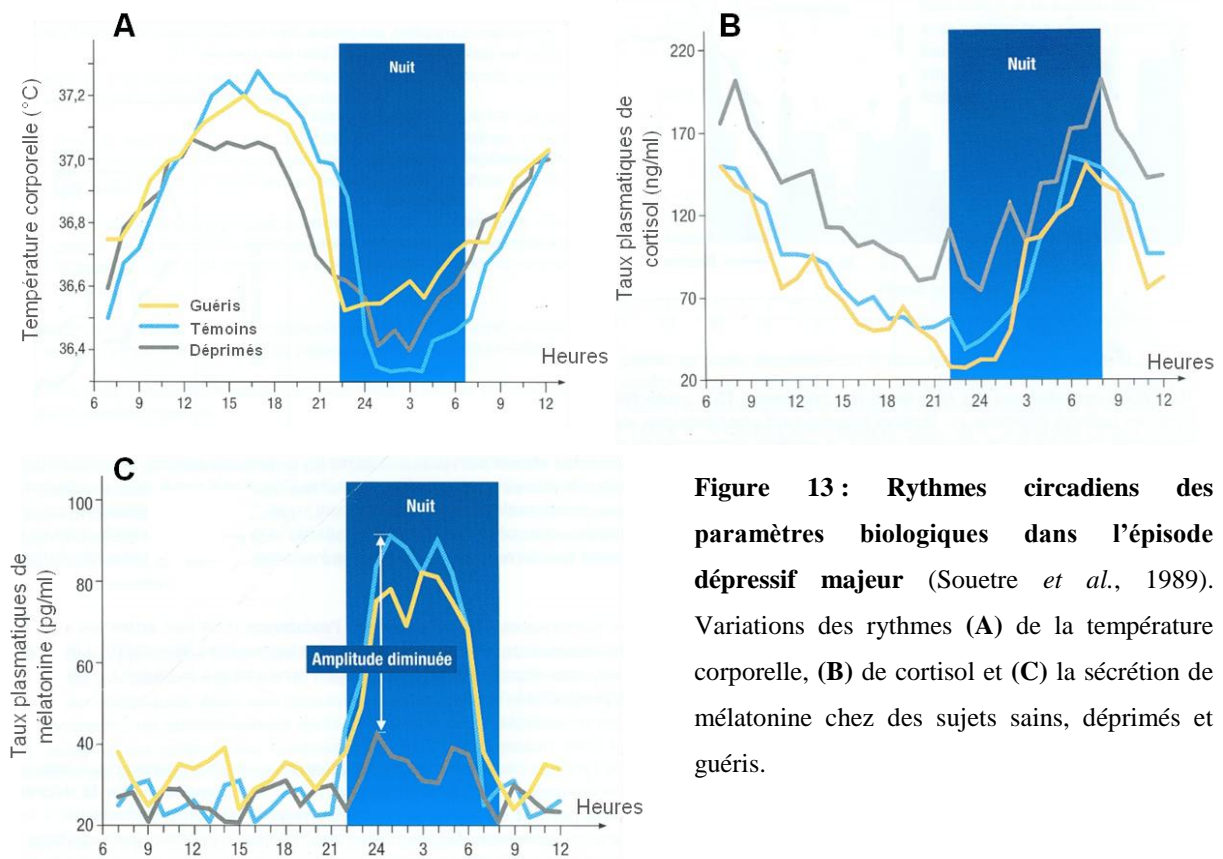


Figure 13 : Rythmes circadiens des paramètres biologiques dans l'épisode dépressif majeur (Souetre *et al.*, 1989). Variations des rythmes (A) de la température corporelle, (B) de cortisol et (C) la sécrétion de mélatonine chez des sujets sains, déprimés et guéris.

Toutes ces perturbations des rythmes circadiens rencontrées lors d'un EDM, ont permis d'aborder l'approche thérapeutique sous un nouvel angle, on voit alors apparaître la chronothérapie. La privation de sommeil (Wu & Bunney, 1990), la photothérapie (Lam *et al.*, 1997) ainsi que la restructuration des rythmes sociaux de la personne (Frank *et al.*, 1997) ont montré un effet antidépresseur. D'un point de vue pharmacologique, la plupart des antidépresseurs induisent des troubles du sommeil contrairement à la MLT qui va améliorer la qualité de cette phase de repos (Srinivasan *et al.*, 2009 pour revue). Néanmoins, l'administration de MLT n'a pas d'effets antidépresseurs chez l'Homme (deVries & Peeters, 1997; Dolberg *et al.*, 1998), mais de par son rôle central dans le système circadien et de ces propriétés chronobiotiques évoquées précédemment, le développement d'analogues spécifiques de la MLT a suscité de nombreuses investigations. Parmi ces analogues, un candidat se distingue particulièrement de par ses propriétés pharmacologiques et thérapeutiques : c'est l'agomélatine.

2. L'agomélatine, un antidépresseur atypique... "le métronome qui s'impose"

2.1. Caractéristiques chimiques et métaboliques de l'agomélatine

L'agomélatine (*Valdoxan*, S20098) est un bio-isostère naphthalénique de la MLT (cycle indolique remplacé par un cycle naphthalénique) synthétisé en 1991 (**Figure 14**). Parmi d'autres, cette molécule a été retenue par les Laboratoires Servier car elle présente une forte affinité, de même ordre que la MLT, pour les récepteurs de la mélatonine (Yous *et al.*, 1992; Ying *et al.*, 1996). Cette affinité a été démontrée *in vitro* dans la *pars tuberalis* de mouton puis chez l'Homme sur les récepteurs clonés MT1 et MT2 ($IC_{50} = 1.3 \times 10^{-10}$ et 2.1×10^{-10} M, respectivement). De même, l'agomélatine (Ago) possède une activité antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} ($IC_{50} = 2.7 \times 10^{-7}$ M) tandis qu'elle se lie également aux récepteurs 5-HT_{2B} et présente une très faible affinité pour les sous types 5-HT_{2A} et 5-HT_{1A} (Chagraoui *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2003; Dekeyne *et al.*, 2008).

Le métabolisme de l'Ago a lieu principalement dans le foie et fait intervenir trois cryptochromes P450 différents (CYP1A1, CYP1A2 et CYP2C9). L'Ago circulante est liée aux protéines plasmatiques et ses métabolites sont essentiellement excrétés dans les urines. Le temps de demi-vie de 2 h pour l'Ago (déterminé par voie orale, Zupancic & Guilleminault, 2006), constitue un atout par rapport à la mélatonine pour laquelle la demi-vie est plus courte.

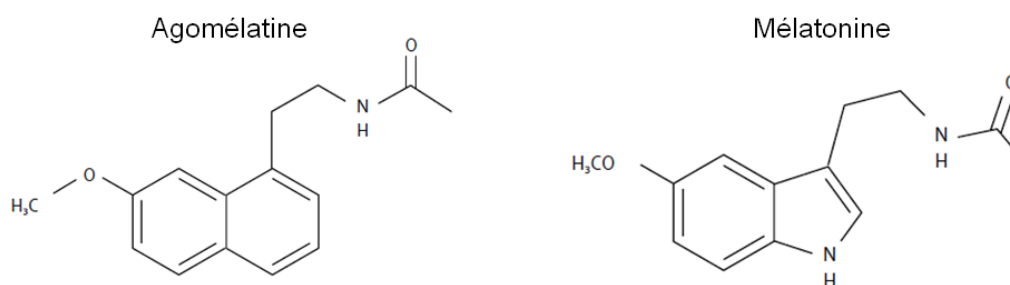


Figure 14 : Structures de l'agomélatine (N-[2-(7-methoxy-1-naphtyl)ethyl]acetamide) et de la mélatonine (N-acetyl-5-methoxytryptamine)

2.2. Propriétés agonistes mélatoninergiques

Plusieurs études *in vivo* ont été entreprises afin de démontrer la capacité de l'Ago à restaurer les rythmes circadiens perturbés. Chez des rats placés en DD, l'activité locomotrice en libre cours est entraînée à exactement 24 h après une administration chronique d'Ago, il en est de même pour le rythme de la Tc (Martinet *et al.*, 1996; Van Reeth *et al.*, 1997; Pitrosky *et al.*, 1999). Cet effet de resynchronisation des rythmes circadiens est semblable à celui observé par la MLT, comme précédemment évoqué. Par la suite, il a été montré que cette capacité de synchronisation des rythmes de l'Ago est active sous différentes conditions notamment lors d'avance ou de retard de phase (Armstrong *et al.*, 1993; Redman *et al.*, 1995).

Le vieillissement est associé à des perturbations des rythmes circadiens du fait d'une sensibilité amoindrie de l'horloge circadienne aux stimuli environnementaux. Une étude chez de hamsters âgés montre que l'Ago restaure le rythme d'activité de roue (Van Reeth *et al.*, 2001). L'ensemble de ces études ont été réalisées dans un premier temps chez des espèces nocturnes mais des études plus tardives ont également confirmé les propriétés chronobiotiques de l'Ago chez des rongeurs diurnes comme l'*Arvicanthis* (Van Reeth *et al.*, 1998; Slotten *et al.*, 2002). De plus, chez des personnes âgées saines, il a été montré que l'Ago est capable d'induire une avance de phase de 2 h du rythme de la Tc et du cortisol, lorsqu'il est administré de manière quotidienne en début de soirée (Leproult *et al.*, 2005).

L'action de l'Ago sur la phase des différents rythmes circadiens semble indépendante de la sécrétion de mélatonine endogène. En effet, la réalisation d'une pinéalectomie ne modifie pas l'influence de l'Ago sur les rythmes circadiens (Redman & Francis, 1998; Pitrosky *et al.*, 1999). Néanmoins, la resynchronisation apportée par l'Ago implique les récepteurs de la mélatonine localisés dans les NSC. Une lésion des NSC abolit l'effet de l'Ago et suggère donc une action de la molécule sur l'horloge centrale (Redman & Francis, 1998).

L'Ago est donc considérée comme une drogue chronobiotique pouvant agir sur les rythmes circadiens, néanmoins cette seule action sur les récepteurs MT1 et MT2 ne suffit pas à expliquer l'effet antidépresseur qui la caractérise. L'Ago présente une deuxième composante en tant qu'antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} qui semble indissociable de ses propriétés thérapeutiques.

2.3. Propriétés antagonistes sérotoninergiques

Le système sérotoninergique est impliqué dans de nombreuses fonctions telles que l'humeur, le comportement émotionnel, le sommeil et l'activité hormonale, ce qui lui procure un rôle central dans la dépression. Au cours de cette maladie, une diminution de la neurotransmission sérotoninergique a été constatée, d'où le développement d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS). Contrairement à ces antidépresseurs, l'Ago n'inhibe pas la recapture de sérotonine, par contre elle bloque les récepteurs 5-HT_{2C}. Chez les patients déprimés, une augmentation de la sensibilité des récepteurs 5-HT_{2C} est observée et le nombre de récepteurs est réduit lors d'une action thérapeutique. Cette observation a permis d'envisager les propriétés antagonistes 5-HT_{2C} comme une valeur ajoutée aux potentiels effets thérapeutiques de l'Ago (Riedel *et al.*, 2002).

Dans les études *in vivo*, l'Ago augmente le taux de dopamine et de noradrénaline dans le cortex frontal tout comme les antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C}, contrairement à la MLT. Dans le test d'interaction sociale et le test de Vogel (comportement dipsique rendu aversif) chez le rat, l'action anxiolytique observée pour l'Ago est comparable à celle obtenue avec un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C} (SB243.213). L'effet induit par l'Ago n'est pas inversé lorsqu'un antagoniste des récepteurs MT1 et MT2 (S22153) est utilisé. Cette observation suggère que l'activité anxiolytique de l'Ago serait essentiellement liée à ses propriétés antagonistes 5-HT_{2C} (Millan *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2005).

De plus, les récepteurs 5-HT_{2C} sont exprimés selon un rythme circadien (Holmes *et al.*, 1997) dans plusieurs structures cérébrales (cortex frontal, hippocampe, amygdale et thalamus) y compris dans les NSC. En effet, les NSC reçoivent des projections sérotoninergiques provenant du raphé et la 5-HT va ainsi moduler l'activité circadienne de l'horloge (Prosser *et al.*, 1990; Barassin *et al.*, 2002; Varcoe & Kennaway, 2008; Cuesta *et al.*, 2009). L'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C} prévient des effets inhibiteurs de la lumière sur la sécrétion de mélatonine (Kennaway *et al.*, 2001) tandis que les agonistes inhibent cette sécrétion (Kennaway & Moyer, 1998).

Le profil atypique de l'Ago de part ses propriétés à la fois agoniste mélatoninergique et antagoniste sérotoninergique permet de couvrir une large partie de la symptomatique de l'EDM. L'action combinée de ces deux propriétés semble expliquer l'effet antidépresseur de l'Ago rencontré dans plusieurs modèles de dépression.

2.4. Effet antidépresseur de l'agomélatine

a. Action sur différents modèles expérimentaux

Il existe de nombreux modèles animaux et tests comportementaux permettant d'étudier les propriétés antidépressives d'une molécule. Dans le cas de l'Ago, le test de la nage forcée, de la résignation acquise, le stress chronique modéré et l'utilisation de modèles transgéniques ont été plus particulièrement utilisés de par les perturbations circadiennes qu'ils entraînent. Pour l'ensemble de ces modèles, les effets de l'Ago ont été comparés à ceux obtenus pour la MLT et des antidépresseurs de référence.

Le test de la nage forcée consiste à placer le rat dans un cylindre rempli d'eau dont il ne peut pas sortir. Pendant un certain temps l'animal va nager puis s'immobiliser. Le temps d'immobilisation est diminué significativement après administration d'Ago chez le rat par rapport à l'utilisation d'autres antidépresseurs comme l'imipramine (Bourin *et al.*, 2004). Pour ce même test, l'utilisation de souris transgéniques présentant une diminution des récepteurs des glucocorticoïdes (souris GR-i) a confirmé les résultats précédents. Les souris GR-i, chez lesquelles l'Ago a été administrée, passent également plus de temps dans les branches ouvertes d'un labyrinthe surélevé, une situation considérée anxiogène (Barden *et al.*, 2005). Dans cette même étude, les rythmes circadiens de la Tc et de l'activité locomotrice sont resynchronisés par l'Ago, avec un effet supérieur à celui observé pour la MLT. Les auteurs suggèrent que ce résultat est lié à l'action combinée des propriétés agonistes mélatoninergiques et antagonistes 5-HT_{2C}. L'ensemble de ces résultats ont permis de confirmer les effets antidépresseurs et anxiolytiques de l'Ago.

Le test du stress chronique modéré a permis d'étudier plus en détail les caractéristiques thérapeutiques liées à l'Ago (délai d'action, phénomène de sevrage, moment d'administration). Dans ce modèle, des rats sont soumis à des stress répétitifs modérés qui provoquent des troubles du comportement similaires à ceux observés chez les patients déprimés. Le principal symptôme observé chez le rat est une anhédonie (perte de l'appétence pour le goût sucré). L'étude de Papp et coll. (2003), a montré l'efficacité de l'Ago dans ce type de modèle en s'opposant à l'anhédonie induite. De même, l'injection chronique d'Ago a permis de constater qu'un délai de 2 à 3 semaines est nécessaire pour observer un effet antidépresseur, ce qui s'avère plus rapide que pour les antidépresseurs de référence (4 à 6 semaines) et ce, sans phénomène de sevrage. De manière indifférente, l'efficacité de l'Ago est retrouvée aussi bien lorsqu'elle est administrée le matin ou le soir, contrairement à la MLT qui améliore les symptômes uniquement quand elle est injectée le soir (**Figure 15**).

L'administration d'un antagoniste mélatoninergique n'arrête pas l'effet de l'Ago administrée le matin. De plus, dans une étude récente, il a été étudié l'influence de l'Ago sur des modèles de rats présentant une hyperactivité locomotrice (mesure supposée de l'activité antidépressive) en comparaison avec la MLT et le S32006. Il s'avère que l'Ago et le S32006 réduisent significativement l'hyperactivité qui n'a pas lieu suite à l'administration de la MLT (Norman *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données suggère que l'effet antidépresseur implique aussi bien les propriétés mélatoninergiques que sérotoninergiques et qu'il ne repose pas uniquement sur l'action chronobiotique de l'Ago.

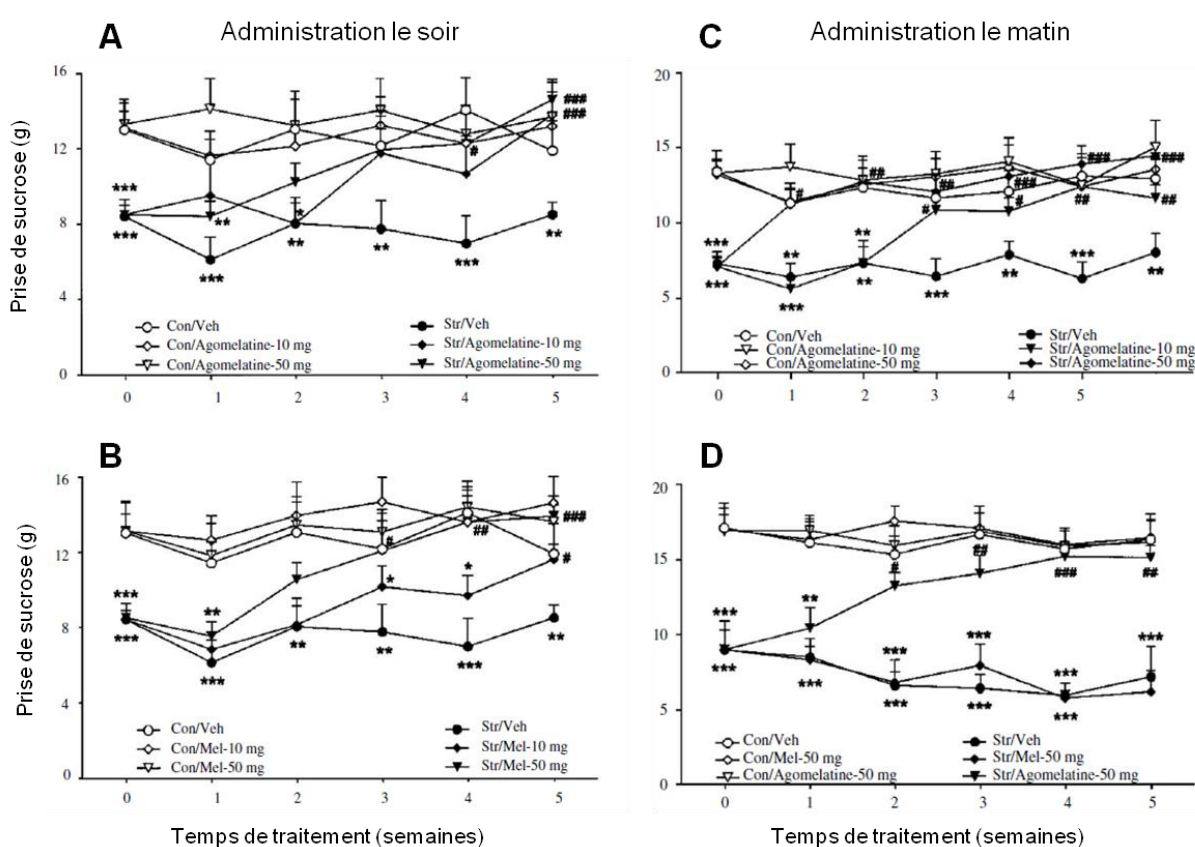


Figure 15 : Effets de l'Ago sur la consommation de sucrose chez des rats stressés (d'après Papp *et al.*, 2003). Administration le soir de véhicule, (A) agomélatine et (B) mélatonine (10 et 50 mg) chez les contrôles (symboles ouverts) et la animaux exposés à un stress chronique modéré (symboles fermés). Les drogues sont administrées 2 h avant la phase d'obscurité. Administration le matin de véhicule, (C) agomélatine (10 et 50 mg) et (D) mélatonine (50 mg) chez les contrôles et les animaux stressés. Les drogues sont administrées 2 h après la phase d'obscurité.

b. Études cliniques

De nombreuses études cliniques ont été engagées afin de confirmer la valeur thérapeutique de l'Ago chez l'Homme. Un condensé est ici proposé afin de mettre en avant les principales caractéristiques retenues suite à un traitement avec l'Ago.

L'efficacité antidépressive de l'Ago, sur l'échelle de HAM-D (Hamilton Anxiety Rating Scale), a été démontrée chez les patients souffrant d'EDM et ceci, à la dose de 25 mg/j prise au moment du coucher. Les patients pour lesquels cette dose était inappropriée, la dose de 50 mg/j permettait d'induire une réponse positive au traitement. (Loo *et al.*, 2002; Kennedy & Emsley, 2006; Olie & Kasper, 2007; de Bodinat *et al.*, 2010 pour revue). Dans toutes ces études, l'efficacité de l'Ago a été également observée chez des patients présentant une dépression plus sévère.

L'Ago présente une action rapide détectable dès la première semaine de traitement par rapport aux antidépresseurs de référence (venlafaxine, sertraline, fluoxétine, etc.) (Kennedy, 2009 pour revue). De même, l'Ago améliore significativement l'endormissement et la qualité du sommeil sans altération des capacités diurnes (Lemoine *et al.*, 2007).

Une étude de prévention des rechutes a permis de démontrer le maintien de l'efficacité de l'Ago. La rechute et le taux de rémission est significativement plus faible (21.7%) par rapport au placebo (46.6%) et ce jusqu'à 24 semaines (Goodwin *et al.*, 2009).

Ces différentes études cliniques ont contribué à l'obtention par l'Agence Européenne du Médicament de la mise sur le marché du Valdoxan en 2009.

L'Ago est un nouvel antidépresseur présentant un mécanisme d'action entièrement innovant, son activité ne repose pas uniquement sur les fonctionnements classiques qui étaient jusque là connus, comme la recapture de la sérotonine. L'effet antidépresseur de l'Ago réside dans son action combinée antagoniste 5-HT_{2C} et agoniste MT1/MT2, ces récepteurs étant connus pour être liés aux effets chronobiotiques sur les rythmes circadiens, apportant ainsi une nouvelle ère dans l'approche thérapeutique de la dépression. De par son efficacité et son profil atypique, l'Ago s'impose ainsi comme le chef de file d'une nouvelle classe d'antidépresseurs.

IV. Objectifs des travaux

Le lien entre rythme et dépression est maintenant bien établi. Ceci a amené les industries pharmaceutiques à développer une nouvelle génération d'antidépresseurs, en tenant compte des nouvelles connaissances. L'Ago s'inscrit dans cette approche thérapeutique de par ses propriétés à la fois agonistes MT1/MT2 (Yous *et al.*, 1992) et antagonistes 5-HT_{2C} (Millan *et al.*, 2003) mais ses mécanismes d'action ne sont que partiellement identifiés. Sa synergie d'effet entre ces deux activités expliquerait ses propriétés d'antidépresseur.

L'Ago en tant qu'agoniste MT1/MT2 possède certaines propriétés de la MLT, en particulier un effet chronobiotique observé chez de nombreux modèles d'animaux présentant des perturbations des rythmes circadiens (Martinet *et al.*, 1996; Pitrosky *et al.*, 1999). De plus, la resynchronisation induite par l'Ago n'est pas affectée après une pinéalectomie. Ces effets semblent s'exercer sur les rythmes circadiens *via* les NSC, tout comme la MLT (Pitrosky *et al.*, 1999).

La MLT est également capable d'agir directement sur le fonctionnement de l'horloge circadienne en augmentant fortement les amplitudes d'oscillations. Ceci a pu être démontré au laboratoire en étudiant le rythme de sécrétion de la mélatonine endogène comme marqueur circadien, *via* la technique de microdialyse intrapinéale (Bothorel *et al.*, 2002). Une seule injection sous cutanée de MLT (1mg/kg) en début d'obscurité (ZT12), en condition LD induit une augmentation du pic de mélatonine sur 2 jours consécutifs. Ces effets ont également été observés quand la MLT est directement injectée dans les NSC, suggérant une action directe de la MLT sur les NSC afin de contrôler les oscillations de son propre rythme endogène (Bothorel *et al.*, 2002).

Les NSC reçoivent des projections sérotoninergiques du noyau du raphé et la 5-HT module l'activité circadienne de l'horloge (Prosser *et al.*, 1990; Graff *et al.*, 2005; Graff *et al.*, 2007). Différents types de récepteurs 5-HT sont impliqués dans cette action, principalement les récepteurs 5-HT_{2C} (Moyer & Kennaway, 1999). Un agoniste des récepteurs est capable de mimer les effets de la lumière et d'inhiber la sécrétion de mélatonine chez le rat (Kennaway & Moyer, 1998). Ces effets sont bloqués par un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C} (SB242084) (Kennaway *et al.*, 2001).

À partir de ces observations, nous avons émis comme hypothèse de travail que l'Ago, par des mécanismes d'action neurones spécifiques, induirait un effet synergique

sur les mécanismes de genèse des oscillations provoquant ainsi une augmentation de l'amplitude des rythmes de l'horloge.

Dans un premier temps, afin de répondre à cette question, nous avons envisagé une approche *in vivo* permettant d'évaluer les effets de l'agomélatine sur les oscillations de l'horloge circadienne. Nous avons donc choisi d'étudier le rythme endogène de mélatonine et de la Tc qui s'avèrent être des sorties robustes de l'horloge. La sécrétion de mélatonine chez le rat Wistar a été suivie, suite à l'administration d'Ago, en utilisant la technique de microdialyse intra pinéale développée au laboratoire pour ce modèle animal dont le rythme de mélatonine endogène est très bien caractérisé. Simultanément, sur l'ensemble des expériences, la Tc a été enregistrée. Une comparaison avec la MLT et un antagoniste 5-HT_{2C/2B} (S32006) sera effectuée afin de mieux appréhender les mécanismes d'action de l'Ago. Des résultats annexes viendront compléter cette étude notamment avec l'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C} (SB242084). De même, l'étude de la Tc indépendamment de la sécrétion de mélatonine (sans microdialyse) sera présentée afin d'approfondir les travaux engagés.

Dans la ligne de notre hypothèse, nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie du projet de thèse à la structure cible de l'Ago qui semble être localisée dans les NSC. Afin d'aborder cette question, une étude *in vitro* a été réalisée, dans laquelle nous nous sommes intéressés au fonctionnement moléculaire des NSC, en utilisant une technique de bioluminescence qui permet d'étudier l'expression à long terme d'un gène horloge (*Per1*). En effet, les NSC en culture présentent des oscillations circadiennes de *Per1* sur plusieurs jours consécutifs (Yamazaki *et al.*, 2000). Notre objectif a donc été de déterminer les effets induits sur les oscillations du gène *Per1* suite à l'application soit d'Ago, soit de MLT.

Première partition :
études *in vivo* de deux sorties
circadiennes de l'horloge

I. Effets de l'agomélatine sur le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène et de la température corporelle

Cette partie fait l'objet d'un article :

Agomelatine (S20098) increases the amplitude of oscillations of two clock outputs: melatonin and temperature rhythms (soumis pour publication).

Amélie Castanho, Béatrice Bothorel, Laure Seguin, Elisabeth Mocaër, Paul Pévet

1. Introduction

L'Ago est un puissant agoniste des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 (Ying *et al.*, 1996) et présente des propriétés antagonistes au niveau des récepteurs de la sérotonine 5-HT_{2C} (Chagraoui *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2003). L'Ago est actuellement disponible en tant qu'antidépresseur cliniquement actif (Loo *et al.*, 2003; Kennedy & Emsley, 2006; Olie & Kasper, 2007; de Bodinat *et al.*, 2010). Des expériences sur des modèles animaux de dépression (Papp *et al.*, 2003; Bourin *et al.*, 2004) ou d'anxiété (Millan *et al.*, 2005; Papp *et al.*, 2006) ont démontré que cette drogue a besoin de l'action combinée des propriétés agonistes mélatonine et antagonistes 5-HT_{2C} (Papp *et al.*, 2003).

En ce qui concerne ses propriétés mélatoninergiques, après une seule administration en fin de journée (ou jour subjectif), l'Ago synchronise ou accélère la resynchronisation des rythmes circadiens dans diverses conditions : changements brusques et perturbations du cycle LD, conditions de libres cours (Martinet *et al.*, 1996; Pitrosky *et al.*, 1999) ou phase de sommeil retardée (Armstrong *et al.*, 1993). Les propriétés chronobiotiques de l'Ago, comme celles de la MLT, présentent des effets dépendants de la dose en agissant directement sur les NSC de l'hypothalamus (Redman & Francis, 1998). Les NSC renferment l'horloge centrale du système circadien. Cette horloge oscille de manière endogène (Inouye & Kawamura, 1979) mais requiert des facteurs externes (Zeitgebers) pour se synchroniser exactement à 24 h. Le cycle LD constitue le synchroniseur le plus puissant mais d'autres facteurs tels que la prise alimentaire (Challet *et al.*, 1996), l'activité locomotrice (Turek, 1989) ou des drogues

chronobiotiques peuvent également agir comme des synchroniseurs (Redman *et al.*, 1983; Pitrosky *et al.*, 1999). Les NSC contrôlent de nombreux rythmes circadiens comportementaux, endocriniens et physiologiques. Le rythme de sécrétion de la mélatonine ainsi que le rythme de la Tc sont deux sorties de l'horloge qui sont très bien caractérisées. De ce fait, ces sorties de l'horloge sont souvent utilisées comme marqueur du fonctionnement de l'horloge circadienne. L'utilisation d'enregistreurs de la température corporelle (Tc) ainsi que le développement de la technique *in vivo* de microdialyse intrapinéale (Azekawa *et al.*, 1990; Drijfhout *et al.*, 1993; Barassin *et al.*, 1999; Perreau-Lenz *et al.*, 2005; Herwig *et al.*, 2006) permettent de suivre ces deux sorties de l'horloge sur une longue période chez des animaux libre de leurs mouvements. L'utilisation de ces suivis à long terme ont permis de montrer qu'une seule injection de MLT (1 mg/kg s.c.) lors de la transition jour/nuit, induit une augmentation significative de l'amplitude du pic de mélatonine sur 2 jours consécutifs (Bothorel *et al.*, 2002). L'administration de MLT par microdialyse inversée, directement dans les NSC, démontre que l'augmentation d'amplitude observée sur le pic de mélatonine est liée à une action directe de la MLT sur les NSC (Bothorel *et al.*, 2002).

La 5-HT est également un acteur majeur de la rythmicité circadienne. Les NSC reçoivent des efférences sérotoninergiques en provenance du noyau du raphé et possèdent plusieurs récepteurs 5-HT (Moyer & Kennaway, 1999) impliqués dans la modulation et la synchronisation par la lumière (Pickard & Rea, 1997; Graff *et al.*, 2005). Par exemple, l'administration de DOI (agoniste 5-HT_{2A/2C}) induit un retard de phase du rythme de mélatonine, similaire à celui observé suite à l'application d'un créneau de lumière. Cet effet est bloqué par le SB242084, un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C} (Kennaway *et al.*, 2001).

L'effet antidépresseur de l'Ago nécessite une action à la fois sur les récepteurs de la mélatonine et 5-HT_{2C}. Ces deux types de récepteurs sont présents dans les NSC. Ainsi, une analyse comparative des effets de l'Ago, la MLT et un antagoniste 5-HT_{2C} (S32006) sur les NSC permettrait de distinguer ceux induits *via* les récepteurs de la mélatonine ou *via* les récepteurs 5-HT_{2C}. Le but de cette étude est donc d'étudier les effets de l'Ago sur le fonctionnement de l'horloge. Afin d'analyser les propriétés de l'horloge dans ces conditions, nous avons utilisés deux sorties caractéristiques, le rythme de mélatonine et de la Tc, qui peuvent facilement être suivies plusieurs jours consécutifs.

2. Matériels et méthodes

2.1. Animaux

Des rats Wistar adultes mâles (~300g, Charles River, France) ont été utilisés. Avant toute expérience, les animaux ont été placés dans une chambre à température contrôlée ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) et maintenus en cycle inversé de 12 h de lumière et 12h d'obscurité (LD 12 : 12, obscurité de 10 h à 22 h) durant 3 semaines, ceci afin de s'adapter aux conditions de microdialyse (collecte des échantillons ayant lieu pendant la période nocturne). Dans cette expérience, le synchroniseur ou *Zeitgeber* est le cycle LD et par convention, sur une journée de 24 h, ZT12 correspond au début de la période d'obscurité. La nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*.

Le protocole a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS, n° AL/02/06/04/10). Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la directive 2010/63/E4 du Conseil Européen.

2.2. Procédures chirurgicales

Les animaux ont été opérés une semaine avant les expériences de microdialyse. Ils sont anesthésiés avec du Zoletil 20 (40 mg/kg i.p.) et du Rompun (10 mg/kg i.p.). À la fin de la chirurgie, un agent anti-inflammatoire avec des propriétés analgésiques (Ketofen, 5 mg/kg s.c.) est injecté à chaque animal. Après la chirurgie, pendant une semaine les animaux sont placés dans des cages individuelles afin de leur permettre de récupérer.

a. Dialyse de la glande pinéale

La construction et l'implantation de la sonde de microdialyse ont été réalisées comme décrit dans les travaux de référence (Barassin *et al.*, 1999; Bothorel *et al.*, 2002). La membrane de dialyse en ester de cellulose saponifié (0,22 mm de diamètre intérieur et 0,27 mm de diamètre extérieur) est maintenue par un fil de tungstène (0,1 mm de diamètre extérieur et 76,5 mm de longueur) dont l'extrémité est aiguisée (**Figure 16A**). Puis, cette sonde est positionnée de manière horizontale sur un support fixé à l'appareil stéréotaxique. Un trou est percé de chaque côté de l'os temporal afin d'insérer la sonde transversalement (**Figure 16B**) au travers de la glande pinéale (1,6 mm ventral par rapport au crâne et 0,7 mm en arrière du lambda selon l'atlas de Paxinos et Watson (1982)). À l'autre extrémité, une aiguille rodée en acier inoxydable est collée à la membrane avec une résine époxy. La totalité de la membrane est recouverte d'une colle silicone hormis la partie médiane (2 mm) qui

correspond à la zone de dialyse active qui doit être placée dans la glande pinéale. Le fil de tungstène est ensuite enlevé puis l'entrée et la sortie de la sonde sont fixées en position verticale par rapport au crâne avec du ciment dentaire.

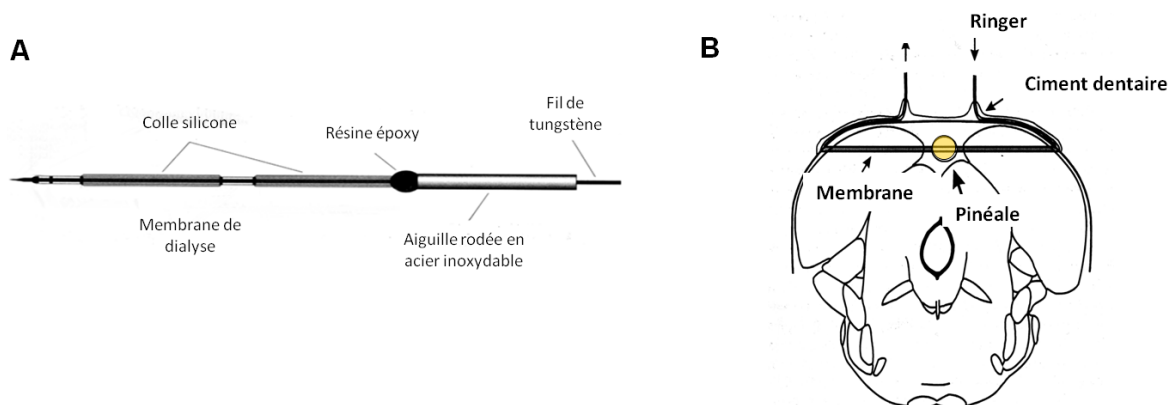


Figure 16 : (A) Représentation de la sonde intrapinéale. (B) Coupe frontale du cerveau illustrant l'implantation transversale de la sonde dans la glande pinéale.

Pour l'expérience, l'entrée de la sonde est reliée par des tubes en polyéthylène (0,38 mm de diamètre intérieur et 1,09 mm de diamètre extérieur) à une pompe de micro-injection *via* un joint tournant. Ce joint est fixé à un balancier permettant de laisser libre l'animal de ses mouvements. La sonde est perfusée avec une solution de Ringer à un débit de 3 μ L/min pendant la durée des prélèvements des échantillons et de 1 μ L/min entre les périodes expérimentales. La sortie est connectée à un micro-flacon en polypropylène de 1,5 ml par des tubes en polyéthylène (0,3 mm de diamètre intérieur et de 0,7 mm de diamètre extérieur). Les échantillons prélevés sont conservés à -20°C jusqu'au dosage radio-immunologique (RIA). À la fin de l'expérience, après euthanasie, le cerveau de chaque animal est prélevé afin de vérifier l'emplacement de la sonde à l'intérieur de la glande pinéale.

b. I-Buttons

Simultanément à l'implantation de la sonde de microdialyse, des enregistreurs de températures (I-Buttons, 3g, 17 mm de diamètre et 6 mm d'épaisseur) sont implantés dans la cavité intrapéritonéale des animaux. Ces I-Buttons sont programmés afin d'enregistrer la Tc tout au long de l'expérience (résolution $\pm 0,0625$; température mesurée chaque 10 min) et sont ensuite recouverts de paraffine.

2.3. Drogues et produits chimiques

L'Ago (S20098) et le S32006 antagoniste 5-HT_{2C/2B} (N-pyridin-3-yl-1,2-dihydro-3H-benzo[e]indole-carboxamide) utilisés dans cette étude ont été fournis par l'Institut de Recherches Internationales Servier. La MLT et le polyéthylène glycol 400 (PEG) proviennent de chez Sigma. Toutes les drogues ont été dissoutes dans une solution véhicule constituée de 10% d'éthanol, 40% de PEG et 50% d'eau stérile.

2.4. Procédure expérimentale

Les profils journaliers de la sécrétion de mélatonine ont été mesurés durant 4 jours consécutifs, chez le même animal. Le premier jour représente le jour contrôle (CTR1). Lors du deuxième jour, l'Ago, la MLT, le S32006 ou le véhicule (PEG) ont été injectés en s.c. à la transition jour/nuit, correspondant au temps ZT12 (10 h). Ce deuxième jour n'a pas été inclus dans les analyses de par les perturbations que l'injection pourrait induire sur le pic de mélatonine endogène. Les données obtenues durant les deux nuits après le jour de l'injection (CTR3 et CTR4) sont utilisés pour analyser les effets des différentes drogues. Chaque animal est utilisé comme son propre contrôle. Les échantillons sont collectés toutes les heures de ZT11 (9 h) à ZT1 (23 h). Seuls les animaux pour lesquels l'implantation de la sonde de microdialyse a été correctement positionnée sont pris en considération pour l'analyse. Pour chaque drogue, trois doses ont été utilisées : 1 mg/kg (effectif final: Ago, n = 5; MLT, n = 6; S32006, n = 4), 2,5 mg/kg (effectif final: Ago, n = 8; MLT, n = 8; S32006, n = 9), 5 mg/kg (effectif final: Ago, n = 4; MLT, n = 5; S32006, n = 5). Les drogues ont été administrées dans un volume constant de 100 µl/100 g de poids corporel. Les rats du groupe contrôle (n = 5) ont été injectés avec un volume équivalent de solution véhicule.

Sur les mêmes animaux, la Tc a été enregistrée à l'aide d'I-Buttons tout au long de l'expérience de microdialyse, il s'agit donc des mêmes animaux. Les profils journaliers obtenus durant les deux jours contrôles (CTR) précédant le traitement, ont été comparés avec ceux obtenus les deux jours (EXP) suivant l'injection, seulement à la dose de 2,5 mg/kg.

2.5. Dosage radio-immunologique

Pour chaque dialysat collecté, la concentration de mélatonine a été déterminée par Radio Immuno Assay (RIA) à partir d'échantillon de 25 µl dosés en doublets en utilisant un anti-sérum spécifique de lapin (R 19540) provenant de l'INRA de Nouzilly (France), à une

dilution finale de 1/100000 et la [125I]-2-iodomélatonine (Perkin Elmer) comme traceur. La limite de sensibilité de ce dosage est de 0,5 pg par tube. Le dosage en direct de la mélatonine a déjà été validé dans une étude précédente pour des dialysats de la glande pinéale de rat (Barassin *et al.*, 1999).

2.6. Analyses des données et statistiques.

Les données pour la concentration de mélatonine endogène sont exprimées en pg/25 µl. Pour les échantillons qui ne présentaient pas de concentration de mélatonine détectable, nous leur avons attribué la valeur limite de sensibilité du dosage soit 0,5 pg/25 µl. Chaque profil de mélatonine a été caractérisé par le temps de demi-montée (*IT50*, temps pour lequel 50% d'augmentation du niveau de mélatonine est atteint), le temps de demi-descente (*DT50*, temps pour lequel 50% de baisse du niveau de mélatonine a eu lieu) et l'amplitude du pic (Y_{ampl}). Ces variables ont été déterminées en appliquant une régression non linéaire à pic logistique appropriée sur le profil de mélatonine, selon l'équation suivante :

$$Y = Y_0 + Y_{\text{ampl}} / \{ [1 + e^{2,9 \cdot (IT50 - x)}] \times [1 + e^{2,8 \cdot (x - DT50)}] \}$$
 où Y est le $n^{\text{ième}}$ point de donnée, x représente le point dans le temps du $n^{\text{ième}}$ point, Y_0 le niveau basal durant le jour et Y_{ampl} l'amplitude nocturne par rapport au niveau basal (Barassin *et al.*, 1999). Les facteurs multiplicateurs en exponentiels représentent les pentes des profils qui ont été fixées à 2,9 (montée) et 2,8 (descente), d'après les données moyennes obtenues en appliquant une régression non linéaire sur les profils d'un groupe contrôle (Barassin *et al.*, 1999). La durée du pic de mélatonine a été déterminée comme la différence entre *DT50* et *IT50*.

Pour les données sur la température, nous avons appliqué une fonction cosinor, selon l'équation suivante :

$$Y = Y_0 + [Ampl \cdot \cos(2\pi (Acro - t)/\tau)]$$
 où Y_0 est la température moyenne, $Ampl$ est l'amplitude du rythme de température, $Acro$ est l'acrophase, τ est la période circadienne et t est la norme de temps. La régression non linéaire pour le profil de la mélatonine endogène et le cosinor pour le profil de la Tc ont été respectivement réalisés à l'aide du logiciel Sigmaplot.

Après avoir déterminé les variables caractérisant les profils de la mélatonine endogène et de la Tc, tout d'abord, une analyse de variance pour mesures répétées a été effectuée, pour chaque dose injectée, sur Y_{ampl} , *IT50* et *DT50* et la durée du pic pour le rythme de mélatonine, et sur $Ampl$ pour le rythme de la Tc, avec deux facteurs : les drogues (véhicule, Ago, MLT et S32006) et les jours expérimentaux (CTR1, CTR3 et CTR4 pour le rythme de mélatonine et CTR, EXP pour le rythme de la Tc). Ces analyses ont été effectuées afin de déterminer si un effet était au moins présent dans un des groupes d'animaux. Puis, les

comparaisons de CTR3, CTR4 vs CTR1 et EXP vs CTR pour chaque paramètre dans les différents groupes expérimentaux ont été réalisées selon la méthode des contrastes planifiés pour tester les effets des traitements. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Toutes les données sont exprimées en moyenne \pm SEM.

3. Résultats

3.1. Profils journaliers de la mélatonine

La **Figure 17A** représente les profils moyens de mélatonine avant (CTR1) et après l'injection de véhicule (CTR3 et CTR4). La sécrétion de mélatonine présente des valeurs basales de jour proche du zéro avant d'atteindre un maximum durant la seconde partie de nuit (entre ZT18 et ZT22). Pendant les dernières heures de la nuit, le niveau de mélatonine redescend pour atteindre dès le début de la période d'éclairage des valeurs basales. La **Figure 17B** montre les variations d'amplitude obtenues entre CTR1 vs CTR3 ou CTR4 après l'injection du véhicule. Les données obtenues à CTR3 et CTR4 sont présentées en tant que variations par rapport au jour contrôle CTR1 (ligne de base = 0) et exprimées en pg/25 μ l pour l'amplitude. Les variations moyennes sont proches de la ligne de base et les amplitudes observées à CTR3 et CTR4 ne présentent aucune différence significative par rapport au jour contrôle CTR1. L'injection de véhicule n'induit aucun effet significatif sur l'amplitude de la sécrétion endogène de mélatonine ni sur *IT50*, *DT50* et la durée du pic.

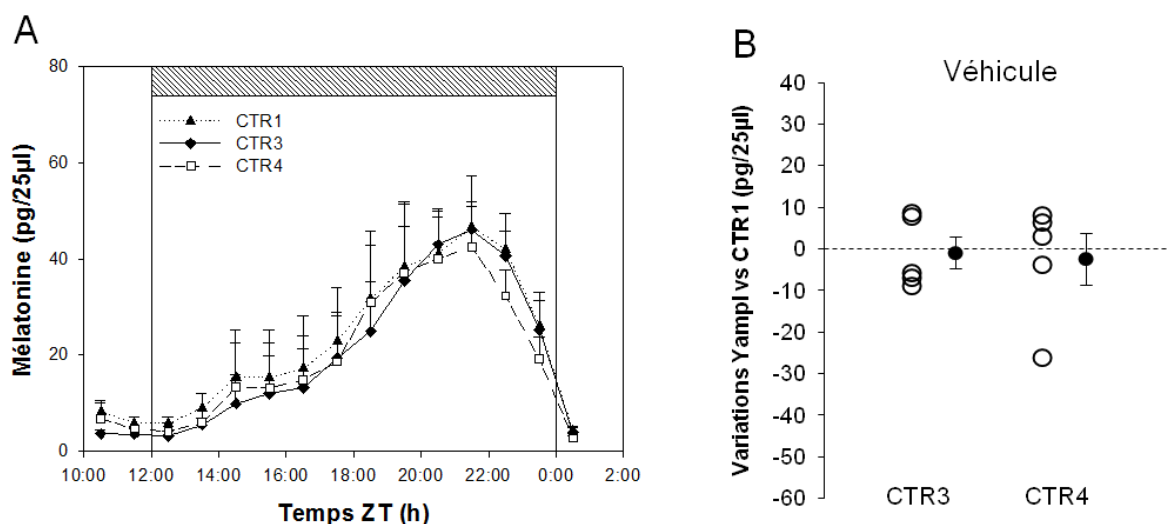


Figure 17 : Sécration de mélatonine mesurée durant le premier jour contrôle (CTR1) et les 2 jours (CTR3 et CTR4) suivant l'injection de véhicule, à ZT12. (A) Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD. **(B)** Variations d'amplitude du rythme de mélatonine à CTR3 et CTR4 vs CTR1 (ligne pointillée). Symboles ouverts : valeurs individuelles. Symboles fermés : moyennes \pm SEM.

a. Effets sur l'amplitude

Pour l'ensemble des drogues, à la dose de 1 mg/kg, aucune différence significative de l'amplitude n'a été observée entre les profils moyens journaliers (**Figure 18**). Les variations moyennes de l'amplitude après traitement sont proches de celles de la journée contrôle (CTR1). Les différentes valeurs de variations obtenues, entre CTR1 et CTR3 ou CTR4, sont résumées dans le **Tableau 1**, pour chaque drogue et à chaque dose.

Tableau 1 : Valeurs moyennes des variations d'amplitude du pic de mélatonine, déterminées à partir des profils individuels, entre CTR3 vs CTR1, CTR4 vs CTR1.

Drogues	Dose	Amplitude (pg/25µl ± SEM)	
		CTR3	CTR4
Véhicule		-0,87 ± 3,80	-2,38 ± 6,24
Ago	1 mg/kg	1,71 ± 1,27	-0,63 ± 2,80
Mel	1 mg/kg	-2,98 ± 4,68	-0,65 ± 4,29
S32006	1 mg/kg	0,15 ± 2,05	2,97 ± 2,19
Ago	2,5 mg/kg	6,20 ± 4,59	10,51 ± 5,17*
Mel	2,5 mg/kg	8,74 ± 4,30	9,78 ± 2,31*
S32006	2,5 mg/kg	-0,20 ± 8,20	-1,76 ± 3,96
Ago	5 mg/kg	-5,21 ± 1,76	-4,05 ± 2,08
Mel	5 mg/kg	3,76 ± 6,29	3,73 ± 6,50
S32006	5 mg/kg	15,59 ± 10,15*	0,19 ± 5,41

Les données sont représentées comme la moyenne ± SEM, *P<0,05.

Une seule injection d'Ago ou de MLT, à 2,5mg/kg, augmente l'amplitude du pic de mélatonine (**Figure 19**). Les variations de *Y_{ampl}* sont significativement différentes à CTR4 (Ago: F = 6,2, p = 0,019; MLT: F = 5,365, p = 0,028) par rapport à CTR1 (**Figure 19**, **Tableau 1**). L'injection de S32006, à cette même dose, ne modifie pas le profil moyen du pic de mélatonine (**Figure 19**). Les variations observées à CTR3 et CTR4 (F = 0,001, p = 0,971 et F = 0,196, p = 0,661, respectivement) sont proches de la ligne de base CTR1. Toutefois, les données individuelles montrent une grande dispersion. Par exemple, à CTR4, la moitié des rats présentent une augmentation de l'amplitude (n = 4) et l'autre moitié une diminution (n = 5), par rapport à CTR1 (**Figure 19**).

Pour la dose de 5 mg/kg, aucune drogue ne change l'amplitude du pic de mélatonine (**Figure 20**). Les variations observées à CTR4 vs CTR1 ne sont pas significatives (Ago: $F = 0,434$, $p = 0,519$; MLT: $F = 0,466$, $p = 0,5078$ et S32006: $F = 0,001$, $p = 0,972$). Seule l'injection du S32006 induit une augmentation significative de l'amplitude à CTR3 ($F = 5,73$, $p = 0,03$). Ceci est lié à un animal qui présente une grande variation d'amplitude tandis que quatre animaux sur cinq présentent une variation proche de la ligne de base, de ce fait aucun effet ne sera considéré pour ce groupe.

En conclusion, seule la dose de 2,5mg/kg pour l'Ago et la MLT conduit à une augmentation de l'amplitude du pic de mélatonine durant les deux jours consécutifs à l'injection.

b. Variables du rythme de mélatonine (*IT50*, *DT50* et durée du pic)

Les valeurs des variations moyennes (CTR3 ou CTR4 vs CTR1) de l'*IT50*, *DT50* (négatives pour une avance et positives pour un retard du rythme) et de la durée du pic sont résumés dans le **Tableau 2**.

Après le traitement à l'Ago : à 1 mg/kg, aucun effet significatif n'a été observé, après traitement, sur les différentes variables analysées (**Figure 18**). Par contre, une avance significative de l'*IT50* a été observée à CTR3 et CTR4, à la dose de 2,5 mg/kg ($F = 22,803$, $p < 0,001$ and $F = 20,764$, $p < 0,001$) et de 5 mg/kg ($F = 14,760$, $p = 0,002$ and $F = 15,770$, $p = 0,001$; **Figure 19 et 20**). De plus, un allongement significatif du pic de mélatonine est induit par l'Ago à CTR3 ($F = 5,0521$, $p = 0,033$) à 2,5 mg/kg et un effet similaire est obtenu avec la dose de 5 mg/kg kg ($F = 10,187$, $p = 0,006$ and $F = 8,0541$, $p = 0,012$) à CTR3 et CTR4 (**Tableau 2**).

Après le traitement à la MLT : une avance significative de la phase, qui concerne à la fois l'*IT50* et le *DT50* (**Figure 18 et 19**), est induite à 1 mg/kg (CTR3: $F = 37,60$, $p < 0,001$; $F = 8,781$, $p = 0,009$ et CTR4: $F = 15,515$, $p = 0,001$ $F = 4,509$, $p = 0,049$, respectivement) et à 2,5 mg/kg (CTR3: $F = 12,916$, $p = 0,001$; $F = 4,240$, $p = 0,049$ et CTR4: $F = 20,071$, $p < 0,001$; $F = 9,070$, $p = 0,005$). Cette avance de phase est accompagnée d'un allongement significatif du pic de mélatonine seulement à la dose de 1 mg/kg ($F = 19,625$, $p < 0,001$; $F = 9,282$, $p = 0,007$ pour CTR3 et CTR4, respectivement). À la dose de 5 mg/kg, aucun effet significatif n'a été rencontré après l'injection de MLT.

Le S32006 n'induit aucun effet significatif quelles que soient la dose et les variables étudiées (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Valeurs moyennes des variations des deux marqueurs de phase (*IT50*, *DT50*) et de la durée du pic de mélatonine, déterminées à partir des profils individuels, entre CTR3 vs CTR1, CTR4 vs CTR1.

Drogues	Dose	<i>IT50</i> (min ± SEM)		<i>DT50</i> (min ± SEM)		<i>DT50-IT50</i> (min ± SEM)	
		CTR3	CTR4	CTR3	CTR4	CTR3	CTR4
Véhicule		-4,43 ± 6,09	-19,25 ± 6,44	4,25 ± 5,80	-14,58 ± 7,92	8,67 ± 7,35	4,94 ± 7,48
Ago	1 mg/kg	-9,20 ± 12,24	-20,13 ± 21,85	-10,02 ± 8,21	-1,27 ± 7,62	-0,82 ± 16,61	-18,85 ± 25,14
Mel	1 mg/kg	-62,54 ± 11,86 ^{***}	-62,52 ± 14,43 ^{**}	-15,73 ± 2,53 ^{**}	-13,50 ± 5,30 [*]	46,81 ± 10,72 ^{***}	49,01 ± 14,37 ^{**}
S32006	1 mg/kg	-21,38 ± 12,99	-3,61 ± 25,09	-7,09 ± 6,40	0,73 ± 7,21	14,28 ± 7,51	4,34 ± 20,17
Ago	2,5 mg/kg	-48,21 ± 13,09 ^{***}	-50,96 ± 15,05 ^{***}	-14,68 ± 6,29	-19,46 ± 10,61	33,53 ± 17,37 [*]	31,50 ± 24,12
Mel	2,5 mg/kg	-36,28 ± 12,13 ^{**}	-50,10 ± 11,21 ^{***}	-21,46 ± 13,59 [*]	-31,11 ± 11,66 ^{**}	14,82 ± 15,19	18,98 ± 16,45
S32006	2,5 mg/kg	-2,49 ± 6,04	-9,71 ± 8,71	-6,55 ± 11,41	-16,58 ± 9,88	-4,06 ± 14,63	-6,86 ± 14,92
Ago	5 mg/kg	-90,02 ± 46,10 ^{**}	-102,75 ± 53,77 ^{**}	-4,28 ± 27,96	-7,14 ± 32,26	85,73 ± 38,25 ^{**}	95,61 ± 56,82 [*]
Mel	5 mg/kg	-38,25 ± 7,49	-37,74 ± 8,15	-3,78 ± 5,17	-9,97 ± 8,16	34,47 ± 6,01	27,77 ± 9,90
S32006	5 mg/kg	-17,15 ± 16,69	-22,84 ± 12,86	-24,99 ± 22,58	-30,26 ± 32,34	-7,84 ± 34,59	-7,41 ± 36,24

Les données sont représentées comme la moyenne ± SEM ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

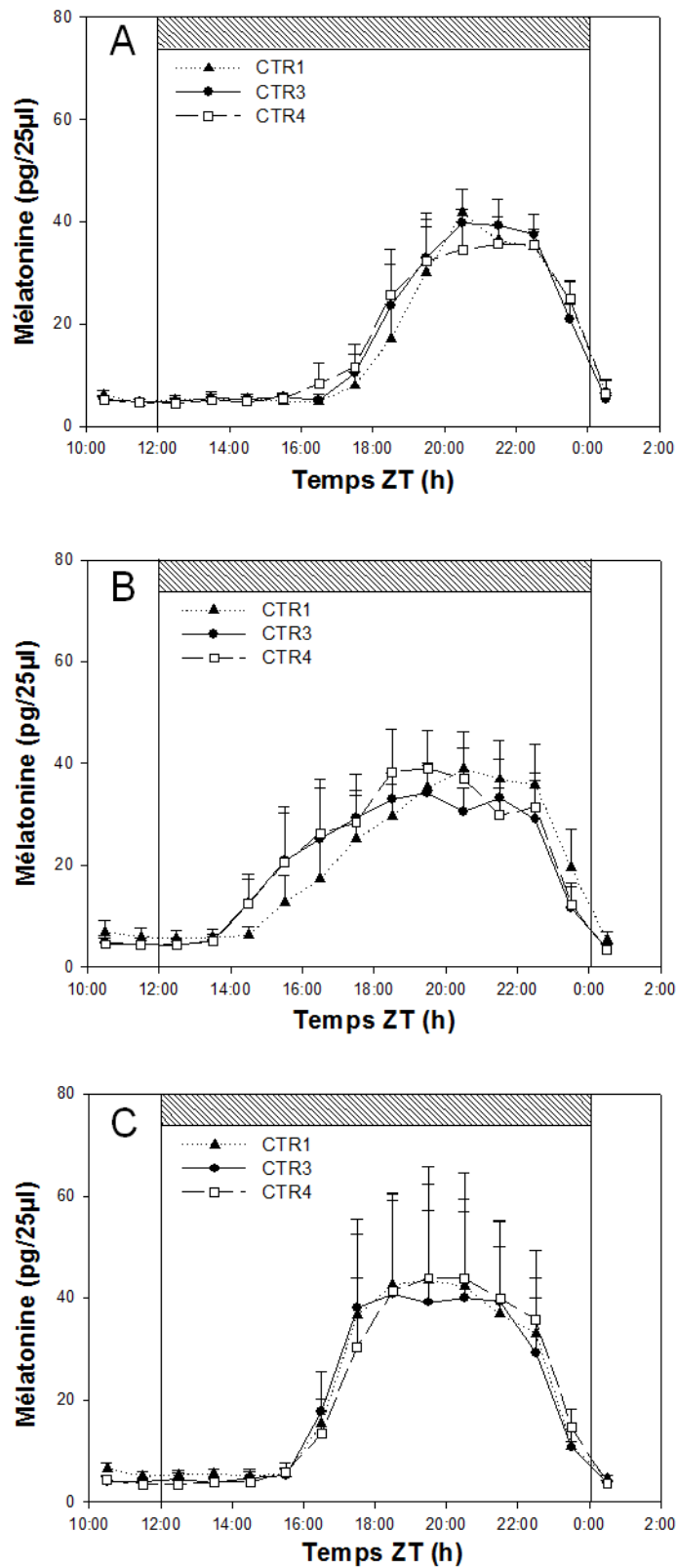


Figure 18 : Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale mesurée durant le premier jour contrôle et les 2 jours suivant une seule injection (A) d'Ago, (B) de MLT et (C) de S32006 à 1 mg/kg. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD 12 : 12.

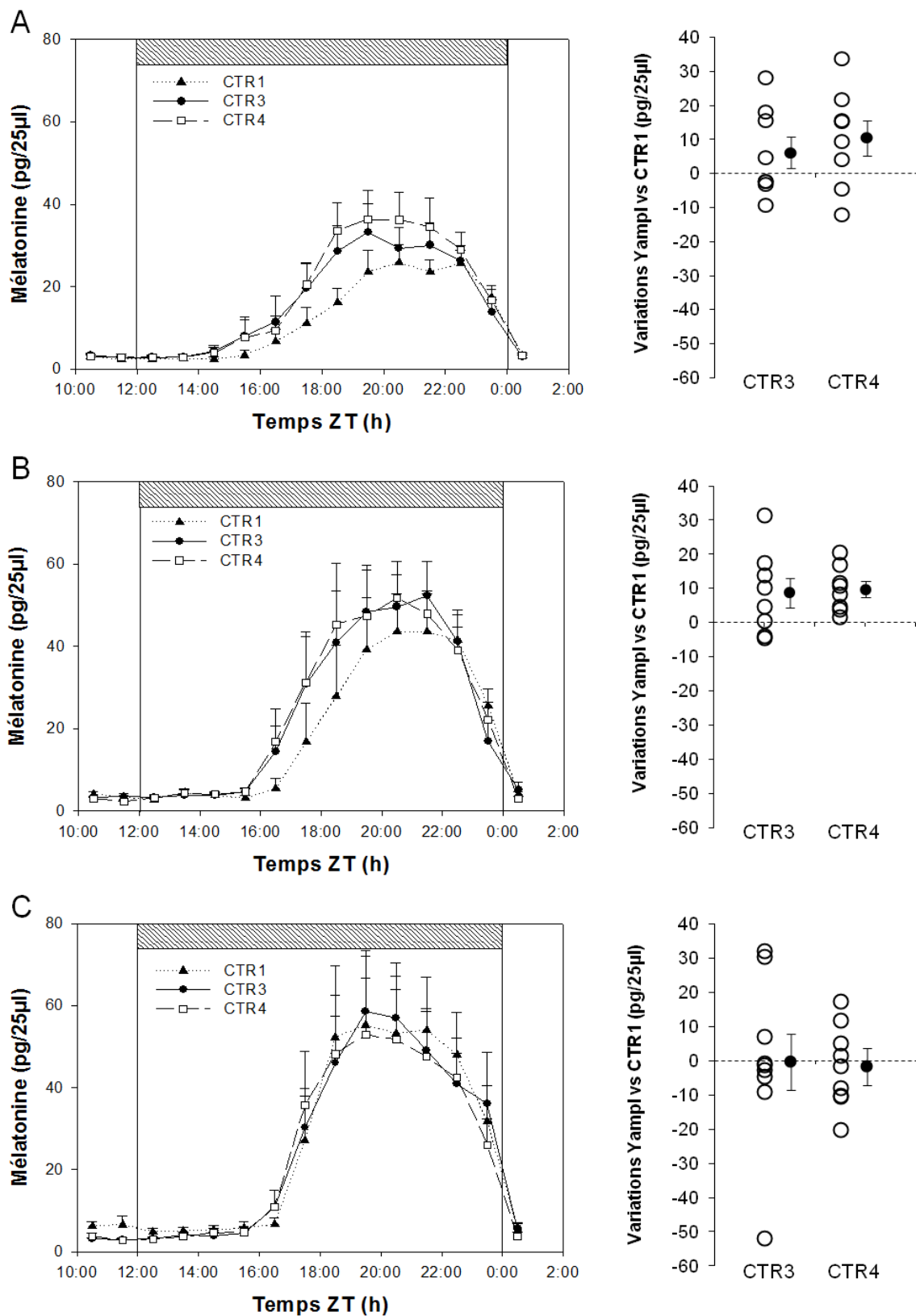


Figure 19 : Sur la gauche : profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale mesurée durant le premier jour contrôle et les 2 jours suivant une seule injection (A) d'Ago, (B) de MLT et (C) de S32006 à 2,5 mg/kg. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD 12 : 12. Sur la droite : variations d'amplitude du rythme de mélatonine à CTR3 et CTR4 vs CTR1 (ligne pointillée) suivant une injection d'Ago, MLT et S32006 à 2,5 mg/kg en LD. Symboles ouverts : valeurs individuelles. Symboles fermés : moyennes \pm SEM.

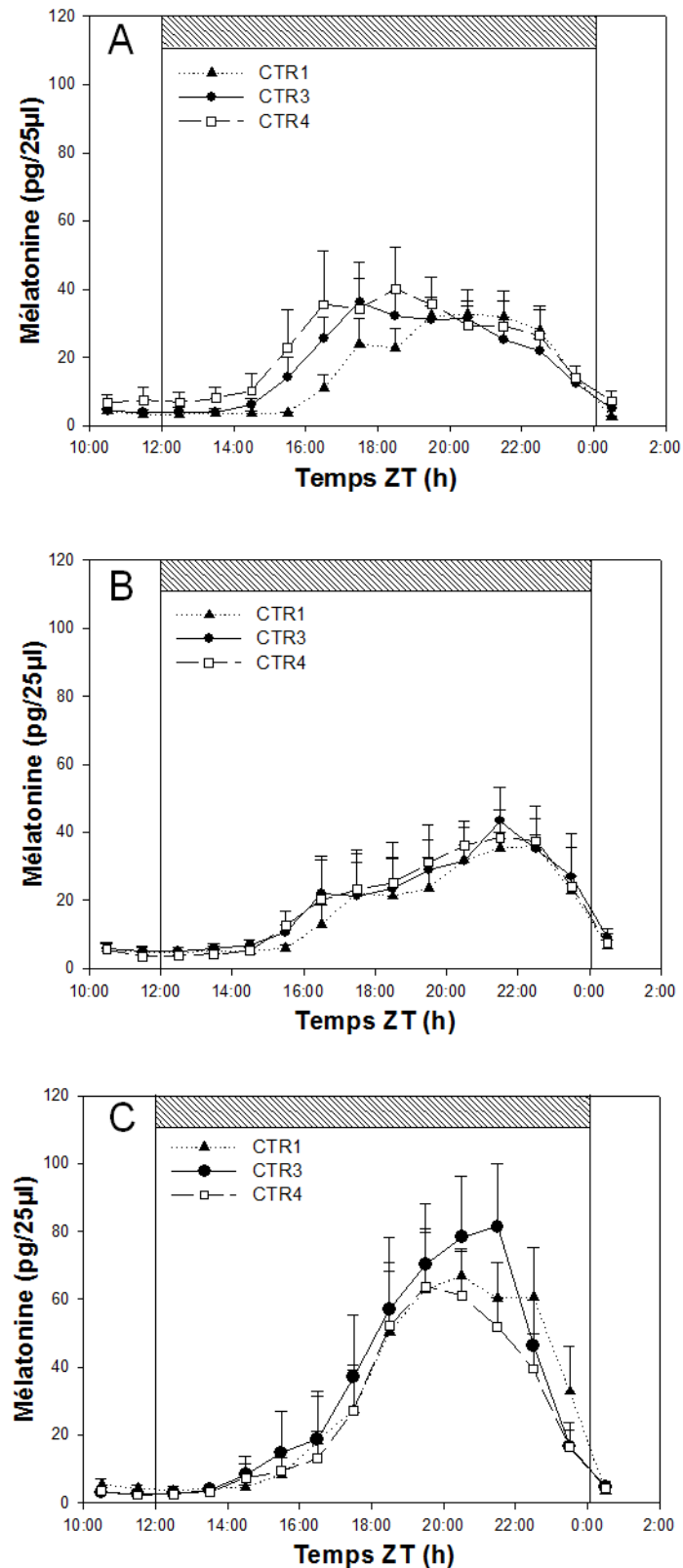


Figure 20 : Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale mesurée durant le premier jour contrôle et les 2 jours suivant une seule injection (A) d'Ago, (B) de MLT et (C) de S32006 à 5 mg/kg. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD 12 : 12.

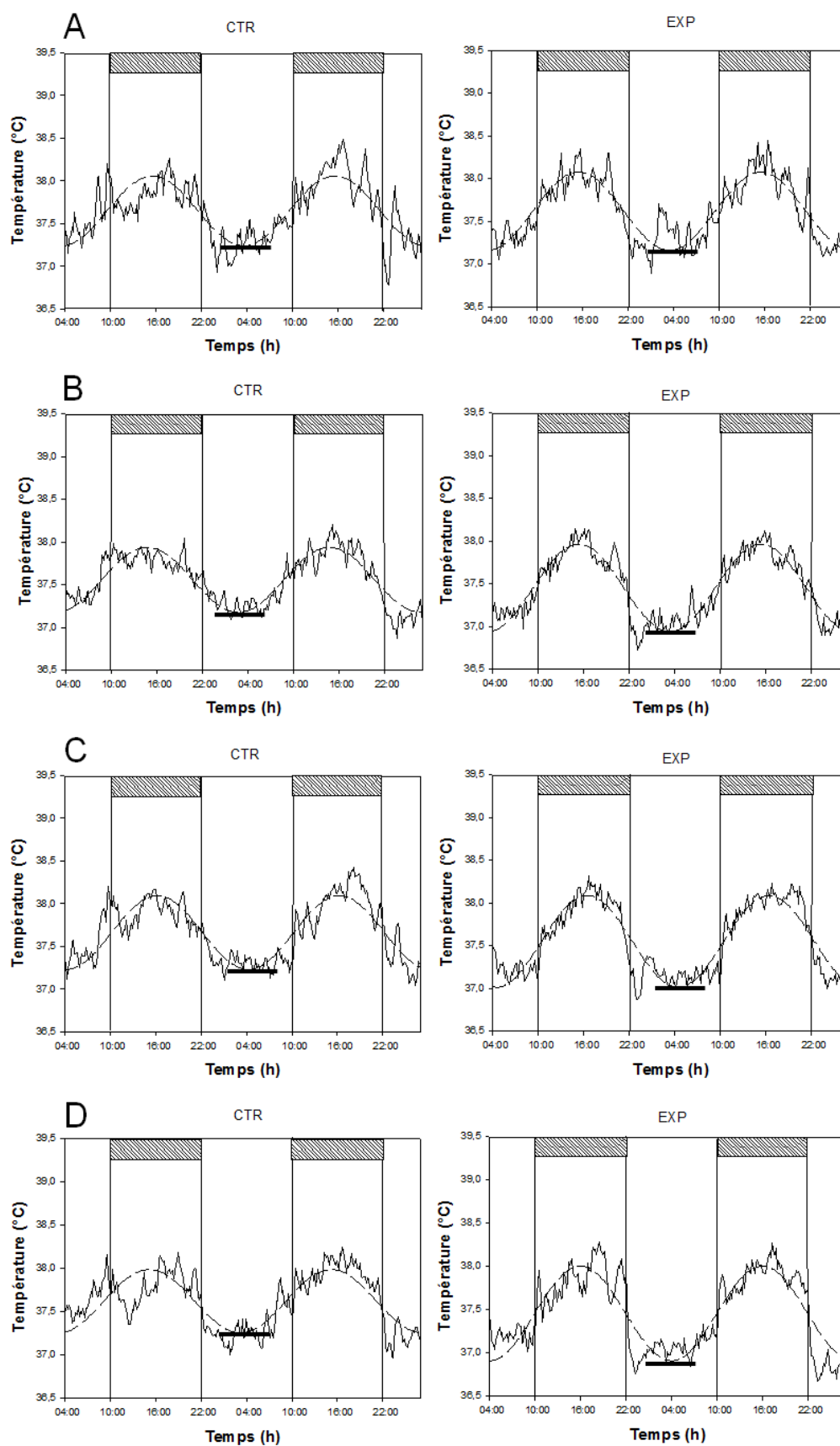


Figure 21 : Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) une seule injection de (A) véhicule, (B) Ago, (C) MLT et (D) S32006, à la dose de 2,5 mg/kg. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD. Le trait noir représente les valeurs minimales de la Tc pendant le jour. L'échelle de l'abscisse est exprimée en temps astronomique.

3.2. Profils journaliers de la température corporelle

Seule la dose de 2,5 mg/kg induit des effets notables sur l'amplitude du rythme de mélatonine endogène. De ce fait, les effets des différentes drogues sur l'amplitude du rythme de la Tc ont été analysés uniquement à cette même dose

La **Figure 21A** représente les profils obtenus les deux jours avant et les deux jours après l'injection du véhicule qui ne montrent aucune différence. Le véhicule n'induit pas d'effet significatif sur l'amplitude de la Tc. Pour l'ensemble des drogues administrées, une augmentation significative de l'amplitude du pic est observée après leur injection (Ago: $F = 9,731$, $p = 0,004$; MLT: $F = 6,591$, $p = 0,016$; S32006: $F = 22,397$, $p < 0,001$). Les variations moyennes de l'amplitude de la Tc, entre EXP et CTR (ligne de base), sont de $0,129 \pm 0,04^\circ\text{C}$, $0,106 \pm 0,03^\circ\text{C}$ et $0,185 \pm 0,05^\circ\text{C}$ respectivement après l'injection d'Ago, de MLT et du S32006 (**Figure 22**). Par rapport aux deux jours contrôles (CTR), le rythme de la Tc présente une diminution des valeurs durant la période diurne du cycle après traitement (EXP) et ceci uniquement chez les animaux traités avec les drogues (**Figure 21B, C et D**).

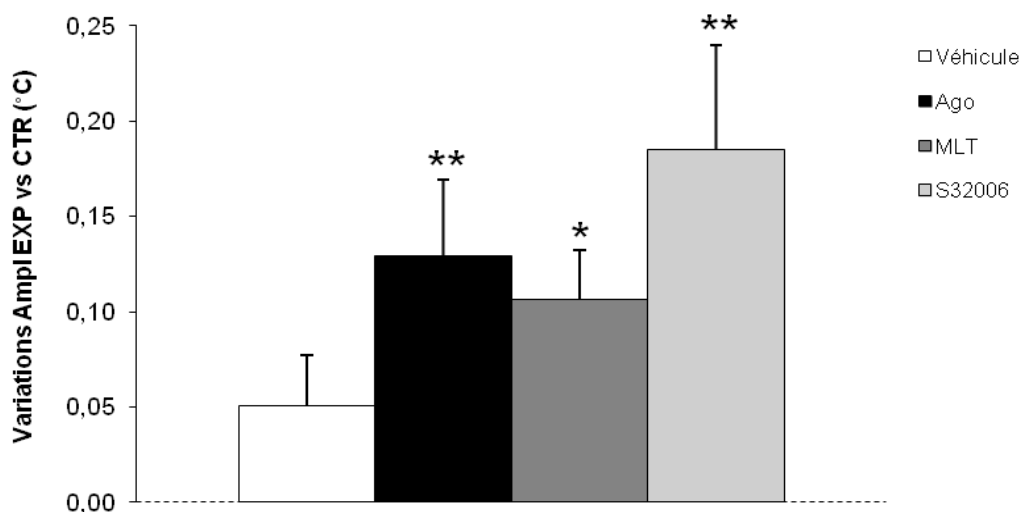


Figure 22 : Variations de l'amplitude (\pm SEM) de la Tc observées pour EXP vs CTR (ligne pointillée) suivant une seule injection des drogues (2,5 mg/kg) et du véhicule à ZT12 en condition LD 12 : 12, * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$.

4. Discussion

4.1. Augmentation de l'amplitude des oscillations après traitement

Nos travaux ont révélé une augmentation de l'amplitude de pic de mélatonine et de la Tc quand l'Ago et la MLT sont administrées à ZT12, à la dose de 2,5 mg/kg et cet effet est maintenu sur deux jours consécutifs. Dans une étude précédente de microdialyse intrapinéale, il a été montré qu'une seule injection de MLT est capable d'augmenter l'amplitude du rythme endogène de mélatonine sur deux jours consécutifs, mais ceci, à la dose de 1 mg/kg. La seule différence, remarquée entre cette présente étude et les travaux de Bothorel et al. (2002), réside dans le fournisseur des rats Wistar utilisés (Charles River vs Dépré). Une différence de sensibilité aux drogues pour les deux colonies de reproduction utilisées pourrait expliquer ces observations, d'autant plus qu'il a déjà été démontré au laboratoire que le profil du rythme de mélatonine peut varier chez des animaux de même espèce qui proviennent de colonies de reproduction différentes (Barassin *et al.*, 1999).

L'étude de Bothorel et coll. (2002) a également montrée une augmentation de l'amplitude du pic de mélatonine similaire à celle que l'on observe dans nos travaux, lorsque la MLT est administrée localement dans les NSC par double microdialyse, ce qui met en avant une action directe de la MLT sur l'horloge centrale. Ainsi, les présents résultats indiquent que l'Ago pourrait agir sur les NSC afin d'augmenter l'amplitude des sorties de l'horloge étudiées. En effet, il a été montré précédemment que les propriétés de l'Ago de resynchronisation des rythmes circadiens sont abolies suite à une lésion des NSC (Redman & Francis, 1998).

De manière intéressante, nous démontrons également dans ce présent travail que l'Ago, comme la MLT, augmente l'amplitude du rythme d'une seconde sortie de l'horloge centrale, le rythme de la Tc. Le fait que l'augmentation d'amplitude soit observée en même temps, pour deux sorties différentes de l'horloge, renforce notre hypothèse d'une action directe de ces drogues sur les NSC. Il faut également noter que l'augmentation d'amplitude du rythme de la Tc est en fait la conséquence d'une diminution de la température au cours de la journée, lorsque les NSC sont connus pour être très actifs. Ceci suggère fortement que l'augmentation d'amplitude observée avec l'Ago et la MLT, pour les deux sorties de l'horloge, est la conséquence d'un puissant effet de synchronisation sur les multiples oscillateurs cellulaires présents dans les NSC. Cependant, nous ne pouvons exclure une action de ces drogues à la périphérie qui pourrait également participer aux phénomènes décrits.

4.2. Propriétés rythmiques de l'Ago et de la MLT

Nos résultats sur les différentes variables rythmiques révèlent une avance de phase de l'*IT50* du pic de mélatonine, après une seule injection d'Ago ou de MLT. Les propriétés chronobiotiques ont été démontrées dans plusieurs études mais, le plus souvent, en conditions constantes de lumière (LL) ou d'obscurité (DD) et donc sans influence de l'alternance jour/nuit qui est un puissant synchroniseur de l'horloge circadienne (Chesworth *et al.*, 1987; Pitrosky *et al.*, 1999). Dans notre étude, les changements de phase sont observés en conditions LD, donc en présence du synchroniseur photique, confirmant ainsi les propriétés chronobiotiques de l'Ago et de la MLT et la pertinence de leur utilisation dans le traitement des perturbations circadiennes rencontrées chez l'Homme (Krauchi *et al.*, 1997). Toutefois, dans les conditions expérimentales actuelles, la situation semble plus complexe. Une importante avance de phase est observée en début de pic mais elle est beaucoup moindre en fin de rythme. Peut-on vraiment parler dans ce cas d'une avance de phase de l'horloge ? Cela semble difficile puisqu'une seule partie du rythme est concernée. À notre connaissance, ce type de régulation n'a jamais été décrit précédemment et peut avoir des conséquences physiologiques importantes. Après une administration, soit de MLT, soit d'Ago, l'avancée du début du pic conduit à un allongement de la durée du pic nocturne de mélatonine qui est observé sur 2 jours après l'injection. De plus, la MLT exerce cet effet durant une fenêtre de sensibilité spécifique, seulement lorsqu'elle est administrée en fin de jour quand la concentration de mélatonine endogène est encore faible (Gunduz & Stetson, 2001). Dans nos conditions expérimentales (LD 12 : 12), nos résultats montrent qu'une seule injection d'Ago ou de MLT en fin de jour, suffit à augmenter la durée du pic de mélatonine sur deux jours consécutifs. Cet allongement correspondrait à un signal de photopériode courte au cours de laquelle la durée du pic de mélatonine endogène est augmentée. Nous ne savons pas si l'allongement du pic résulte de l'action directe de la MLT sur les NSC ou s'il est lié à la distribution de l'hormone dans la circulation générale.

D'autre part, nous confirmons que les effets des drogues sur les variables rythmiques sont dépendants de la dose (Gunduz & Stetson, 2001). Néanmoins, la MLT présente des effets à des doses plus faibles (1 mg/kg) que pour l'Ago (5 mg/kg), ce qui pourrait s'expliquer par la double composante agoniste mélatoninergique et antagoniste sérotoninergique de l'Ago qui nécessiterait des doses plus élevées pour les effets rythmiques. Pourtant, des doses efficaces similaires pour ces deux substances ont été décrites mais en ce

qui concerne un autre paramètre, la resynchronisation des rythmes circadiens (Armstrong *et al.*, 1993; Redman *et al.*, 1995).

4.3. Effets du S32006

Contrairement à l'Ago, le S32006, un antagoniste 5-HT_{2C/2B}, n'induit aucun effet que ce soit sur l'amplitude, le début, la fin ou la durée du pic de mélatonine lorsqu'il est administré à ZT12. Dans ces conditions expérimentales, ce résultat suggère que les effets décrits pour l'Ago sur l'une des deux sorties de l'horloge, ne sont pas associés aux récepteurs 5-HT_{2C}. Néanmoins, le S32006 induit une augmentation de l'amplitude du rythme de la Tc qui pourrait être liée à un effet périphérique.

Une fenêtre de sensibilité adéquate pour l'administration du traitement est un facteur critique afin d'observer un effet sur les phénomènes dépendant de l'horloge. Dans un modèle de stress chronique, l'Ago présente un effet lorsqu'il est administré le soir mais également le matin, contrairement à la MLT (Papp *et al.*, 2003). Les auteurs suggèrent que l'effet obtenu lorsque l'Ago est administré dans la soirée serait lié à la synergie d'action agoniste mélatoninergique et antagoniste 5-HT_{2C} tandis que l'effet observé lorsque le traitement a lieu le matin serait dû seulement à ses propriétés 5-HT_{2C}. Ainsi, ils suggèrent que l'effet antidépresseur de l'Ago impliquerait deux mécanismes différents. L'action agoniste mélatonine serait dépendante du moment de l'administration et l'action antagoniste 5-HT_{2C} serait, quant à elle, indépendante du temps. Ceci pourrait être également le cas pour les effets sur la Tc.

En conclusion, cette étude montre que l'Ago présente des propriétés rythmiques après une seule injection à la transition jour/nuit, avec une réponse dépendante de la dose qui diffère de celle observée avec la MLT. De plus, notre travail montre pour la première fois, l'augmentation de l'amplitude de la mélatonine endogène avec l'Ago similaire à celle rencontrée avec la MLT et l'augmentation de l'amplitude du rythme de la Tc à la fois avec l'Ago et l'antagoniste 5-HT_{2C}. D'un point de vue thérapeutique, ces observations s'avèrent intéressantes pour le traitement des patients déprimés qui présentent de faibles amplitudes des rythmes circadiens. L'administration de l'Ago pourrait restaurer ces amplitudes, en agissant directement sur l'horloge, ce qui participerait ainsi à son action antidépressive.

Nous nous attendions à un effet plus prononcé en faveur de l'Ago par rapport à la MLT, en particulier sur l'amplitude, du fait de sa double composante agoniste mélatoninergique et

antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, mais cette dernière propriété pourrait agir seulement en périphérie. Cette hypothèse est appuyée par les résultats obtenus avec le S32006 qui n'induit aucun effet sur le rythme de la mélatonine contrairement à celui de la Tc.

De même, une saturation du système pourrait expliquer le manque de différence observée entre les effets induits sur l'amplitude par l'Ago et la MLT. En effet, nous savons que la synchronisation des oscillateurs est responsable de l'amplitude et de la robustesse des oscillations (Yamaguchi *et al.*, 2003). En se basant sur ce concept, il est possible que la synchronisation *via* les récepteurs de la mélatonine soit rapidement atteinte et ne permet pas alors de distinguer une différence entre les effets de l'Ago et de la MLT. L'utilisation de modèles désynchronisés, comme des rats âgés, pourrait être envisagée afin de tester cette hypothèse.

II. Études complémentaires

1. Effets d'un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C} sur le rythme de mélatonine endogène et de la température corporelle

1.1 Introduction

Les résultats obtenus précédemment ont soulevé plusieurs questions notamment sur les effets induits par l'antagoniste 5-HT_{2C}. Le S32006 n'influence pas le rythme de mélatonine, néanmoins à la dose de 2,5 mg/kg nous observons des résultats contrastés. En effet, l'injection de S32006 induit chez les animaux soit une augmentation, soit une diminution de l'amplitude du rythme de mélatonine. Le S32006 est un antagoniste à la fois des récepteurs 5-HT_{2C} et des récepteurs 5-HT_{2B}. Or, une étude de Kennaway et Moyer (2001) a mis en évidence la capacité du SB242084, un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}, à bloquer la diminution d'amplitude du rythme de mélatonine observée suite à l'application d'un créneau de lumière. À partir de ces observations, nous avons donc entrepris d'administrer le SB242084 afin de déterminer les effets induits par cet antagoniste.

1.2. Procédures expérimentales

Pour cette expérience, le protocole décrit précédemment (**voir Première partition, I-2. Matériels et méthodes**) a été appliqué afin d'analyser l'amplitude du rythme de la mélatonine endogène et de la Tc, suite à une injection de SB242084, chez des rats, à ZT12 et à la dose efficace de 2,5 mg/kg.

1.3. Résultats

a. Effets sur l'amplitude du rythme de mélatonine endogène

Les profils moyens de sécrétion de la mélatonine obtenus après l'injection du SB242084 montrent une augmentation de l'amplitude, à la dose de 2,5mg/kg (**Figure 23A**). La variation moyenne de *Yampl* est significativement différente à CTR4 ($F = 5,53$, $p = 0.025$) par rapport à CTR1. Toutefois, les variations d'amplitude obtenues montrent une grande dispersion (CTR3 vs CTR1 = $10,48 \pm 6.08$; CTR4 vs CTR1 = $12,77 \pm 7,72$). En effet, si l'on observe les variations individuelles de l'amplitude (**Figure 23B**), 2 animaux, sur un effectif total de 6 animaux, présentent une forte augmentation d'amplitude et sont responsables de l'augmentation moyenne de la variation d'amplitude du rythme de sécrétion de la mélatonine observées à CTR3 et CTR4.

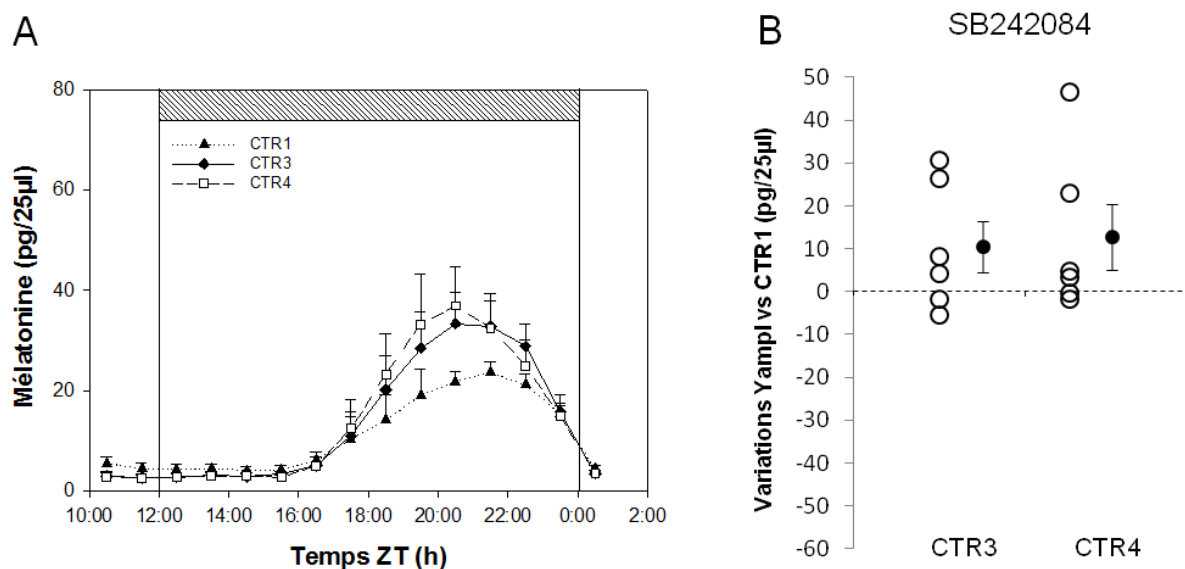


Figure 23 : Sécrétion de mélatonine mesurée durant le premier jour contrôle (CTR1) et les 2 jours (CTR3 et CTR4) suivant l'injection du SB242084, à 2,5 mg/kg. (A) Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale. Les données sont représentées comme la moyenne \pm SEM. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD. (B) Variations d'amplitude du rythme de mélatonine à CTR3 et CTR4 vs CTR1 (ligne pointillée). Symboles ouverts : valeurs individuelles. Symboles fermés : moyennes \pm SEM.

b. Effets sur l'amplitude du rythme de la température corporelle

La **Figure 24A** représente les profils moyens obtenus pour les deux jours avant et les deux jours suivant l'injection du SB 242084, à la dose de 2,5 mg/kg, profils sur lesquels nous observons une faible différence d'amplitude. La variation moyenne de cette amplitude entre CTR (ligne de base) et EXP (**Figure 24B**) n'est pas significative ($F = 1,86$, $p = 0,183$), sa valeur étant de $0,077 \pm 0,08^\circ\text{C}$. De plus, nous constatons une grande dispersion dans les résultats pour le rythme de la Tc. Pour comparaison avec le SB242084, les variations d'amplitude obtenues précédemment avec les autres drogues sont également représentées sur la **Figure 24B**.

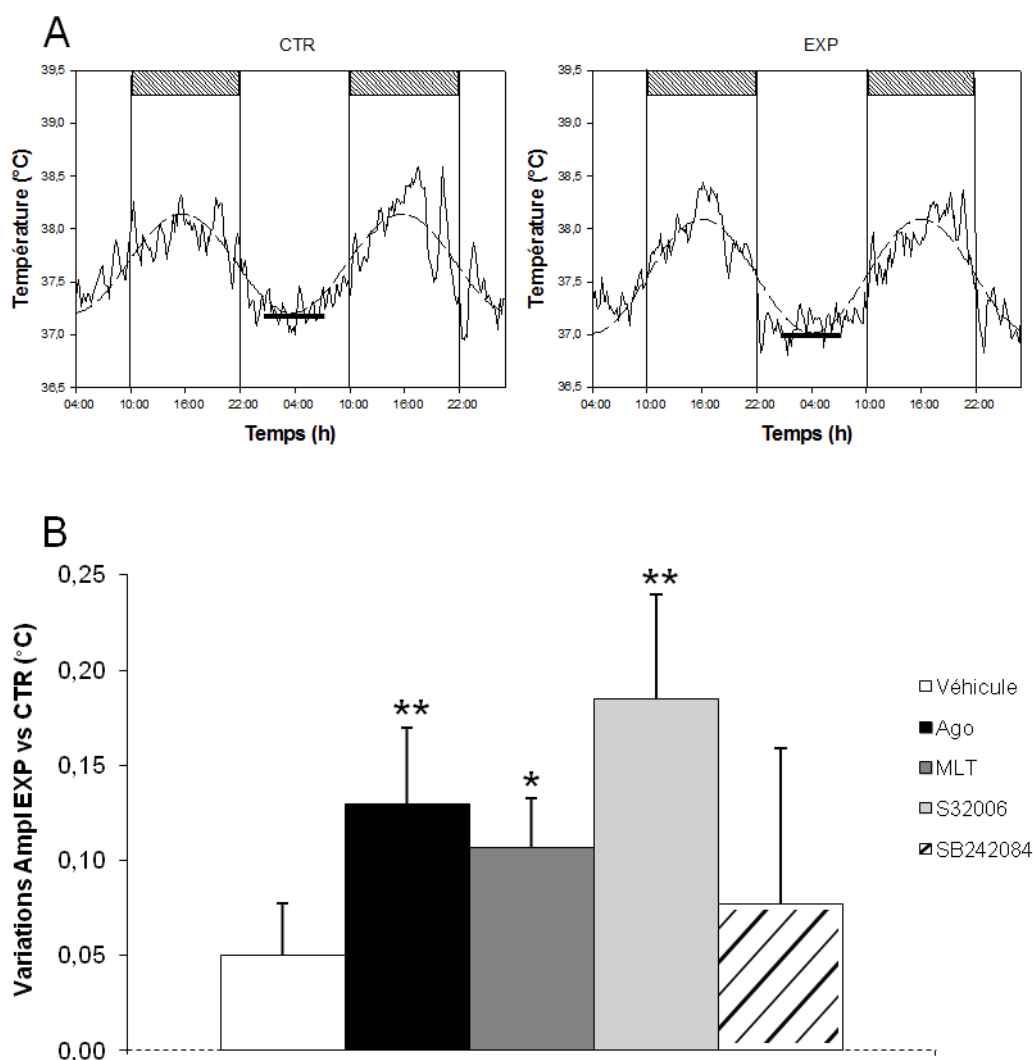


Figure 24 : (A) Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et les 2 jours après (EXP) une seule injection de SB242084. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD. Le trait noir représente les valeurs minimales de la Tc pendant le jour. (B) Variations de l'amplitude (\pm SEM) de la Tc observées pour EXP vs CTR (ligne pointillée) suivant une seule injection des drogues (2,5 mg/kg) et du véhicule à ZT12 en condition LD 12 : 12, * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$.

En conclusion, l'injection de SB242084, à la dose de 2,5 mg/kg lors de la transition jour/nuit, induit un effet très contrasté. Même si une augmentation d'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine est observée, une grande variabilité des résultats est présente dans le groupe d'animaux, ce qui est également retrouvé pour le rythme de la Tc.

2. Influence de l'heure d'administration des antagonistes sérotoninergiques sur le rythme de la température corporelle

2.1. Introduction

Les résultats obtenus avec le SB242084 sur les variations d'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine et de la Tc sont aussi contrastés que ceux observés après l'injection du S32006 sur le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène. Nous avons alors soulevé la question de la fenêtre de sensibilité pour l'administration des antagonistes 5-HT_{2C}.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'étude de Papp et coll. (2003) a montré que l'Ago agirait en tant qu'antidépresseur aussi bien quand il est administré le matin ou le soir. Les auteurs ont alors suggéré que l'effet de l'Ago, administrée le matin, est lié à ses propriétés antagonistes sérotoninergiques qui seraient indépendantes du moment d'administration de la drogue. Cependant, une seconde hypothèse peut être également envisagée, à savoir que la fenêtre de sensibilité pour les antagonistes 5-HT_{2C} se situerait le matin et non le soir comme pour la MLT. Suite aux effets contrastés induits par les antagonistes 5-HT_{2C} et connaissant l'importance du moment de l'administration des drogues dans le traitement des perturbations circadiennes, nous avons donc étudié les effets des antagonistes 5-HT_{2C} (le S32006 et le SB242084) sur le rythme de la Tc lorsqu'ils sont administrés à différents ZT.

2.2. Procédures expérimentales

Dans le cadre de cette expérience, nous avons choisi d'étudier uniquement le rythme de la Tc, car ceci a l'avantage de présenter moins de contraintes chirurgicales et expérimentales par rapport à l'étude du rythme de la mélatonine endogène qui nécessite une microdialyse intrapinéale plus difficile à mettre en place. De ce fait, l'étude a été réalisée en condition dite "sans microdialyse", seule l'implantation d'I-Buttons dans la cavité intrapéritonéale a été effectuée.

Animaux : des rats adultes mâles (~300g, Charles River, France) ont été utilisés. Les animaux sont placés dans une chambre à température contrôlée ($21 \pm 0,2^\circ\text{C}$) et maintenus en cycle LD 12 : 12 (obscurité de 19 h à 7 h) durant 1 semaine avant la chirurgie d'implantation des I-Buttons. La nourriture et l'eau étaient disponibles ad libitum

Protocole expérimental : après la chirurgie, les animaux sont placés dans des cages individuelles, dans lesquelles ils récupèrent pendant une semaine. Puis, l'injection soit de S32006 ($n = 10$), soit de SB 242084 ($n = 9$) a été réalisée à la dose de 2,5 mg/kg et à différents créneaux horaires (ZT12, ZT0, ZT6 et ZT18) avec un intervalle d'une semaine, entre chaque créneau testé. Les profils journaliers obtenus avant le traitement durant les deux jours contrôles (CTR) ont été comparés avec les deux jours suivant l'injection (EXP).

Analyses des données et statistiques : pour chaque profil, l'amplitude (*Ampl*) a été déterminée en appliquant un cosinor (**voir Première partition, I-2.6. Analyses des données et statistiques.**). Tout d'abord, les données sur *Ampl* ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance pour mesures répétées, pour chaque créneau horaire et avec deux facteurs : les drogues (S32006 et SB242084) et les jours expérimentaux (CTR et EXP). Puis, la comparaison entre CTR et EXP dans les différents groupes expérimentaux a été réalisée selon la méthode des contrastes planifiés pour tester les effets des traitements. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Toutes les données sont exprimées en moyennes \pm SEM.

2.3. Résultats

Pour l'ensemble des ZT, auxquels le S32006 a été injecté, aucune modification du profil moyen du rythme de la Tc n'a été observée (**Figure 25A**). Les variations moyennes d'amplitude observées (**Figure 26**) entre CTR (ligne de base) et EXP ne sont pas significatives (ZT12 : $F = 0,002$, $p = 0,966$; ZT0 : $F = 3,787$, $p = 0,068$, ZT6 : $F = 0,582$, $p = 0,455$; ZT18 : $F = 0,092$, $p = 0,765$). En ce qui concerne le SB242084, les profils moyens obtenus montrent une diminution d'amplitude uniquement lorsqu'il est administré à ZT12 (**Figure 25B**). En effet, la variation d'amplitude entre CTR et EXP est significative ($F = 5,6258$; $p = 0,03$). Néanmoins, cette significativité reste faible et le SB 242084 n'induit aucun effet pour les autres ZT auxquels il a été administré (**Figure 26**).

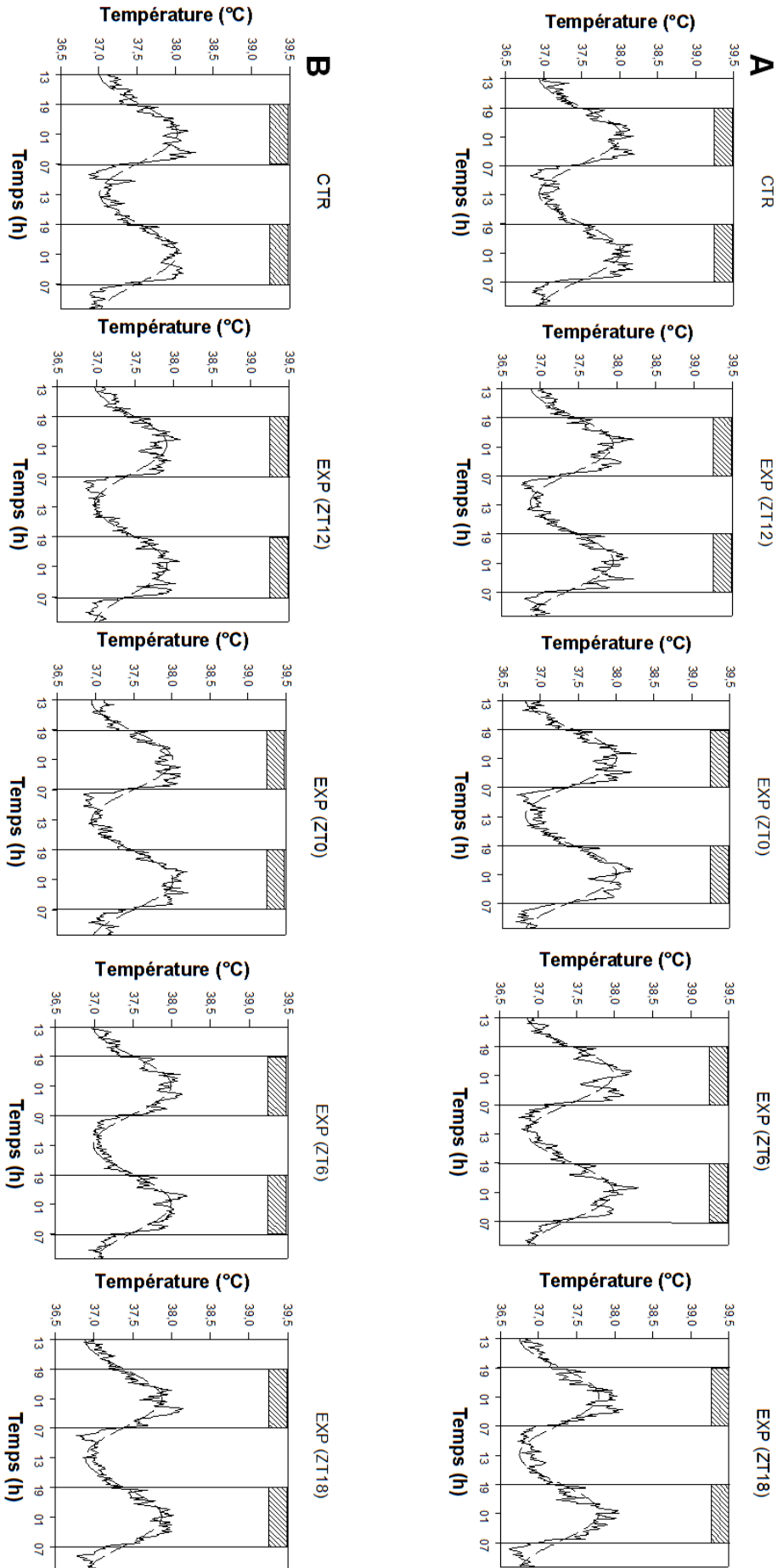


Figure 25 : Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) injection (A) du S32006 et (B) du SB242084 à différents créneaux horaires (ZT12, ZT0, ZT6 et ZT18) et à une dose de 2,5mg/kg. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD.

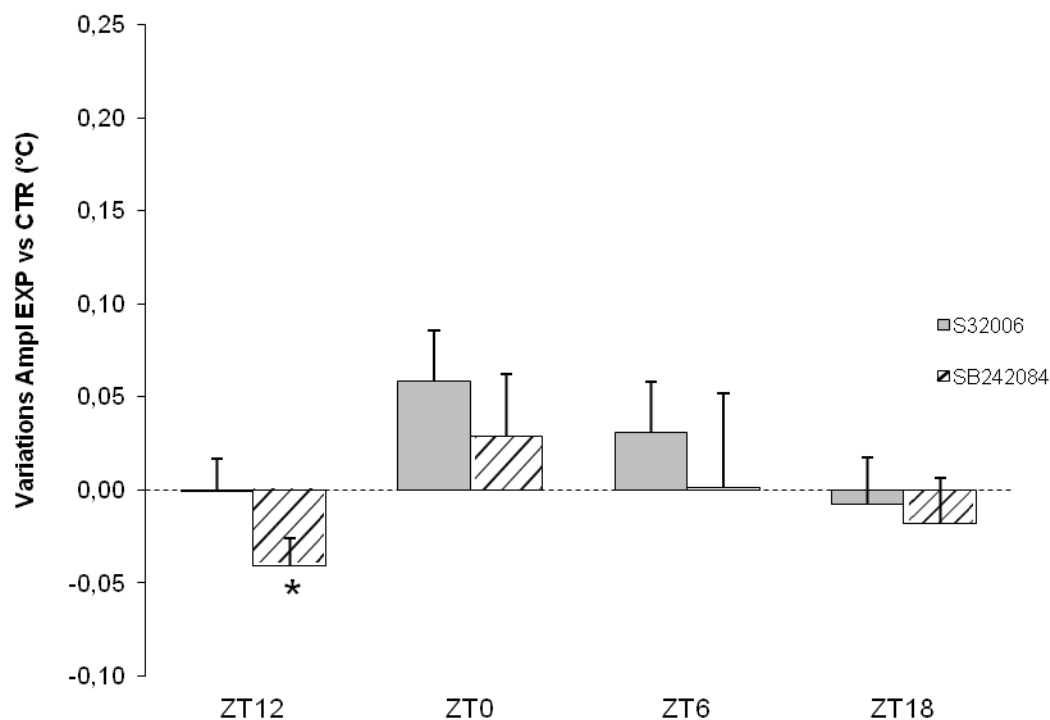


Figure 26 : Variations de l'amplitude (\pm SEM) de la Tc observées pour EXP vs CTR (ligne pointillée) suivant l'injection du S32006 et du SB242084 à 2,5 mg/kg et à différents créneaux horaires (ZT12, ZT0, ZT6 et ZT18) en condition LD 12 : 12, * $P < 0,05$.

En conclusion, l'injection des antagonistes 5-HT_{2C} n'induit aucun effet sur l'amplitude du rythme de la Tc lorsqu'ils sont injectés à ZT0, ZT6 et ZT18. Néanmoins, ce qu'il est intéressant de noter dans cette étude, sont les résultats obtenus lors de l'injection des antagonistes à ZT12 qui s'avèrent différents de ceux observés dans notre première étude avec la microdialyse intrapinéale. En effet, l'augmentation d'amplitude du rythme de la Tc que nous observions lors de l'injection du S32006 à ZT12 n'a plus lieu dans les conditions expérimentales sans microdialyse. De même, le SB242084 induit une diminution de l'amplitude du rythme de la Tc alors qu'aucun effet n'était observé en condition de microdialyse. Ainsi, les effets observés dans l'étude principale sur l'amplitude du rythme de la Tc, suite à l'injection des antagonistes 5-HT_{2C} (2,5 mg/kg) à ZT12, ne sont pas reproduits dans la présente expérience sans microdialyse.

3. Effets des différentes drogues sur le rythme de la température corporelle : étude sans microdialyse

3.1. Introduction

Nous venons de voir que le S32006 n'induit pas d'augmentation de l'amplitude du rythme de la Tc lorsqu'il est administré à ZT12 chez des animaux n'ayant pas subi de microdialyse. Or, nous avons montré, lors de l'étude initiale avec microdialyse, que le S32006 augmente significativement l'amplitude du rythme de la température corporelle à ZT12 et qu'il en était de même après injection d'Ago et de MLT. De plus, en sachant que le S32006 induit des effets contrastés sur le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène, nous nous sommes donc posé la question, à savoir si le fait de ne pas reproduire les résultats pour le rythme de la Tc était lié à l'antagoniste 5-HT_{2C} ou si un autre facteur devait être pris en considération, notamment les conditions expérimentales. Afin de répondre à cette question, nous avons donc reconduit le même type d'expérience sans microdialyse, en étudiant le rythme de la Tc, cette fois-ci après une injection des différentes drogues (Ago, MLT, S32006 et SB 242084), seulement à ZT12 à la dose de 2,5mg/kg.

3.2. Procédures expérimentales

Pour la réalisation de cette expérience, notre objectif était de respecter le plus fidèlement possible les conditions expérimentales de l'étude principale lorsque le rythme de la Tc était étudié parallèlement au rythme de la sécrétion de mélatonine. Ainsi, l'environnement expérimental qu'impose la microdialyse a été reproduit le plus fidèlement possible, même si la microdialyse n'a pas été réalisée sur les animaux.

Animaux : des rats adultes mâles (~300g, Charles River, France) ont été utilisés. Les animaux sont placés dans une chambre à température contrôlée ($21 \pm 0,2^\circ\text{C}$) et maintenus en cycle LD 12 : 12 (obscurité de 19 h à 7 h) durant 1 semaine avant la chirurgie d'implantation des I-Buttons. La nourriture et l'eau étaient disponibles ad libitum.

Protocole expérimental : après la chirurgie, les animaux sont placés dans des cages individuelles dans lesquelles ils récupèrent pendant une semaine. Les cages, dont nous nous sommes servis pour cette expérience, sont les mêmes que celles utilisées en microdialyse. Elles permettent la mise en place du dispositif expérimental nécessaire avec l'ensemble balancier, joint tournant et chaînette. Puis, l'injection des drogues (Ago : n = 7, MLT : n = 7, S32006 : n = 4, SB 242084 : n = 5) à la dose de 2,5 mg/kg et du véhicule (n = 4) a été réalisée

à ZT12. Les profils journaliers obtenus avant le traitement durant les deux jours contrôles (CTR) ont été comparés avec les deux jours suivant l'injection (EXP).

Analyses des données et statistiques : pour chaque profil, l'amplitude (*Ampl*) a été déterminée en appliquant un cosinor (voir **Première partition 1, I-2.6. Analyses des données et statistiques.**). Tout d'abord, les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de variance pour mesures répétées sur *Ampl*, avec deux facteurs les drogues (véhicule, Ago, MLT, S32006 et SB242084) et les jours expérimentaux (CTR et EXP). Puis, la comparaison entre CTR et EXP dans les différents groupes expérimentaux a été réalisée selon la méthode des contrastes planifiés pour tester les effets des traitements. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Toutes les données sont exprimées en moyennes \pm SEM.

3.3. Résultats

Lors de cette expérience sans microdialyse, l'injection du véhicule n'induit aucune différence d'amplitude du rythme de la Tc entre les deux jours avant et après injection. Cette observation est également constatée pour chaque drogue administrée à la dose de 2,5 mg/kg, à ZT12. En effet, les variations moyennes de l'amplitude obtenues les deux jours après l'injection des différentes drogues (EXP) ne sont pas significatives (Ago: $F = 0,001$, $p = 0,97$; MLT: $F = 0,683$, $p = 0,796$, S32006: $F = 0,01$, $p = 0,917$ et SB242084 : $F = 0,356$, $p = 0,556$) et sont très proches des deux jours contrôles (CTR) (**Figure 27**).

Ainsi, l'ensemble des drogues injectées n'induit aucun effet sur le rythme de la Tc lorsque la microdialyse n'est pas réalisée, alors qu'une augmentation d'amplitude de la Tc est observée après injection de l'Ago, la MLT et le S32006 lorsque les animaux ont subi une microdialyse. Ces résultats suggèrent une influence de la pratique de la microdialyse intrapinéale sur l'augmentation de l'amplitude du rythme de la Tc induite par l'Ago, la MLT et le S32006.

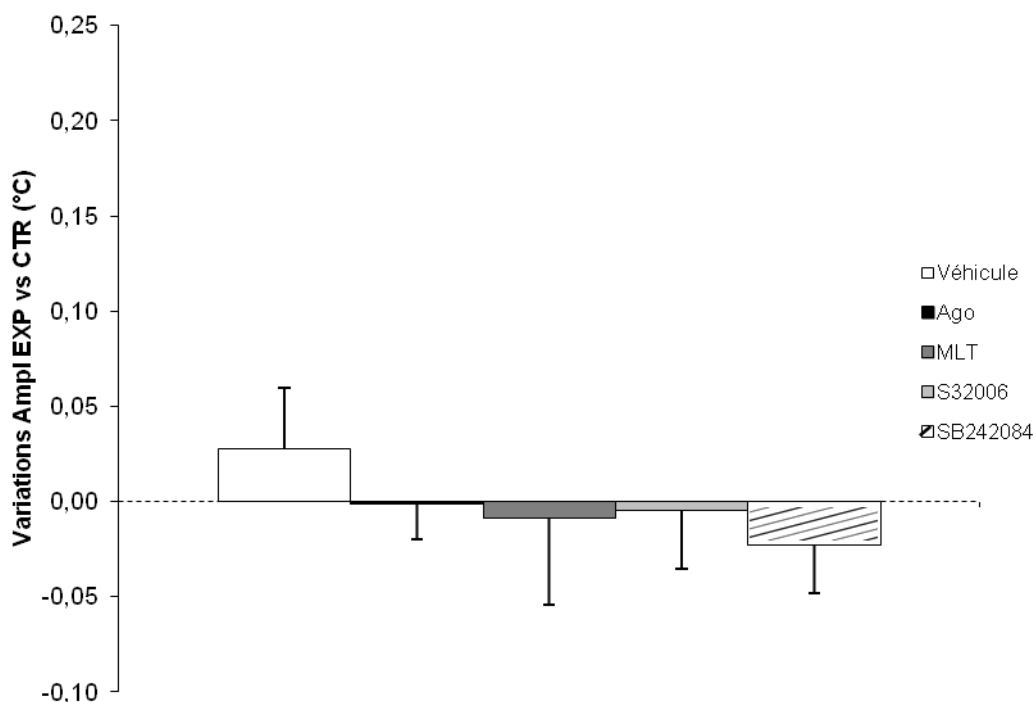


Figure 27 : Variations de l'amplitude (\pm SEM) de la Tc observées pour EXP vs CTR (ligne pointillée) suivant une seule injection des drogues (2,5 mg/kg) et du véhicule à ZT12, en condition LD 12 : 12, chez des animaux n'ayant pas subi de microdialyse.

4. Influence de la dose administrée sur le rythme de la température corporelle avec microdialyse

4.1. Introduction

Dans l'étude principale, nous avons analysé les effets des différentes drogues sur l'amplitude du rythme de la Tc uniquement lorsqu'elles étaient administrées à la dose de 2,5 mg/kg. De plus, l'Ago et la MLT présentent des effets sur les variables rythmiques de la sécrétion de mélatonine qui sont dépendants de la dose. Afin de déterminer si les effets induits par l'Ago, la MLT et le S32006 sur le rythme de la Tc sont dépendants de la dose, nous avons analysé les résultats obtenues pour la dose de 1 et 5 mg/kg, données enregistrées lors de l'étude principale. Cette analyse complémentaire va nous permettre d'appréhender l'impact de la microdialyse sur les résultats obtenus pour le rythme de la Tc, comme nous l'avons évoqué dans l'expérience précédente.

4.2. Procédures expérimentales

Cette étude constitue une analyse complémentaire des données I-Buttons sur le rythme de la Tc qui ont été enregistrées lors de l'étude principale, simultanément à la microdialyse intrapinéale. De ce fait, il s'agit du même protocole que celui utilisé dans l'étude principale (**voir Première partition, I-2. Matériels et méthodes**). Ainsi, les profils journaliers obtenus avant le traitement durant les deux jours contrôles (CTR) ont été comparés avec les deux jours suivant l'injection (EXP) d'Ago, MLT et de S32006, à la dose de 1 et 5 mg/kg.

4.3. Résultats

Pour l'ensemble des drogues, à la dose de 1 mg/kg, une augmentation de l'amplitude du rythme de la Tc est observée les deux jours après traitement (**Figure 28**). Les variations moyennes de l'amplitude sont significativement différentes après injection de la MLT et du S32006 (MLT: $F = 28,82$, $p < 0,001$; S32006: $F = 7,8645$, $p = 0,012$) par rapport aux jours contrôles (**Figure 30**). Pour l'Ago, l'augmentation d'amplitude induite tend à être significative ($F = 4,185$, $p = 0,057$).

Pour la dose de 5 mg/kg, les profils moyens du rythme de la Tc obtenus les deux jours après traitement ne présentent pas de variations significatives par rapport aux jours contrôles, et ce, quelque soit la drogue injectée (Ago: $F = 1,709$, $p = 0,21$; MLT: $F = 2,416$, $p = 0,14$ et S32006: $F = 0,719$, $p = 0,40$) (**Figure 29 et 30**). Les variations d'amplitudes sont reportées pour les 3 doses (1 ; 2,5 et 5 mg/kg) dans la **Figure 30**. Il faut noter qu'une grande variabilité est présente après injection de la MLT et du S32006.

De même, il est intéressant de constater que l'Ago, tout comme le S32006, induit une augmentation plus importante de l'amplitude du rythme de la Tc, à la dose de 2,5mg/kg. En revanche, pour la MLT, l'effet le plus élevé est observé à la dose de 1 mg/kg (**Figure 30**).

En conclusion, cette analyse complémentaire sur l'amplitude du rythme de la Tc a permis de mettre en évidence que les effets induits par l'Ago, la MLT et le S32006 sont dépendants de la dose administrée, et ce, en condition de microdialyse. En effet, les différentes drogues induisent une augmentation de l'amplitude du rythme de la Tc à 1 et 2,5 mg/kg mais celle-ci n'est pas reproduite lorsque les drogues sont administrées à 5 mg/kg.

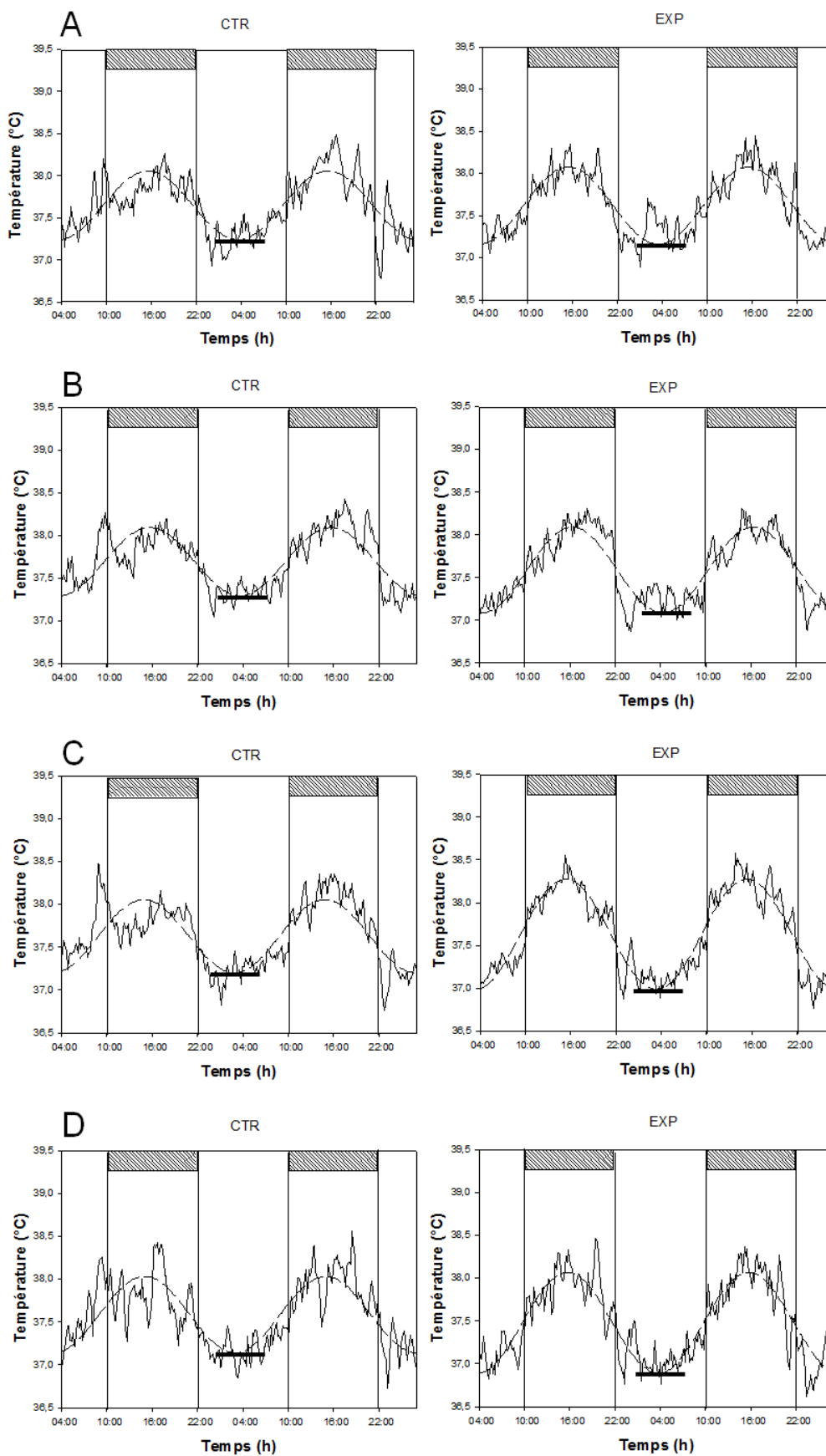


Figure 28 : Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) une seule injection de (A) véhicule, (B) Ago, (C) MLT et (D) S32006, à la dose de 1 mg/kg, en condition de microdialyse. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD. Le trait noir représente les valeurs minimales de la Tc pendant le jour.

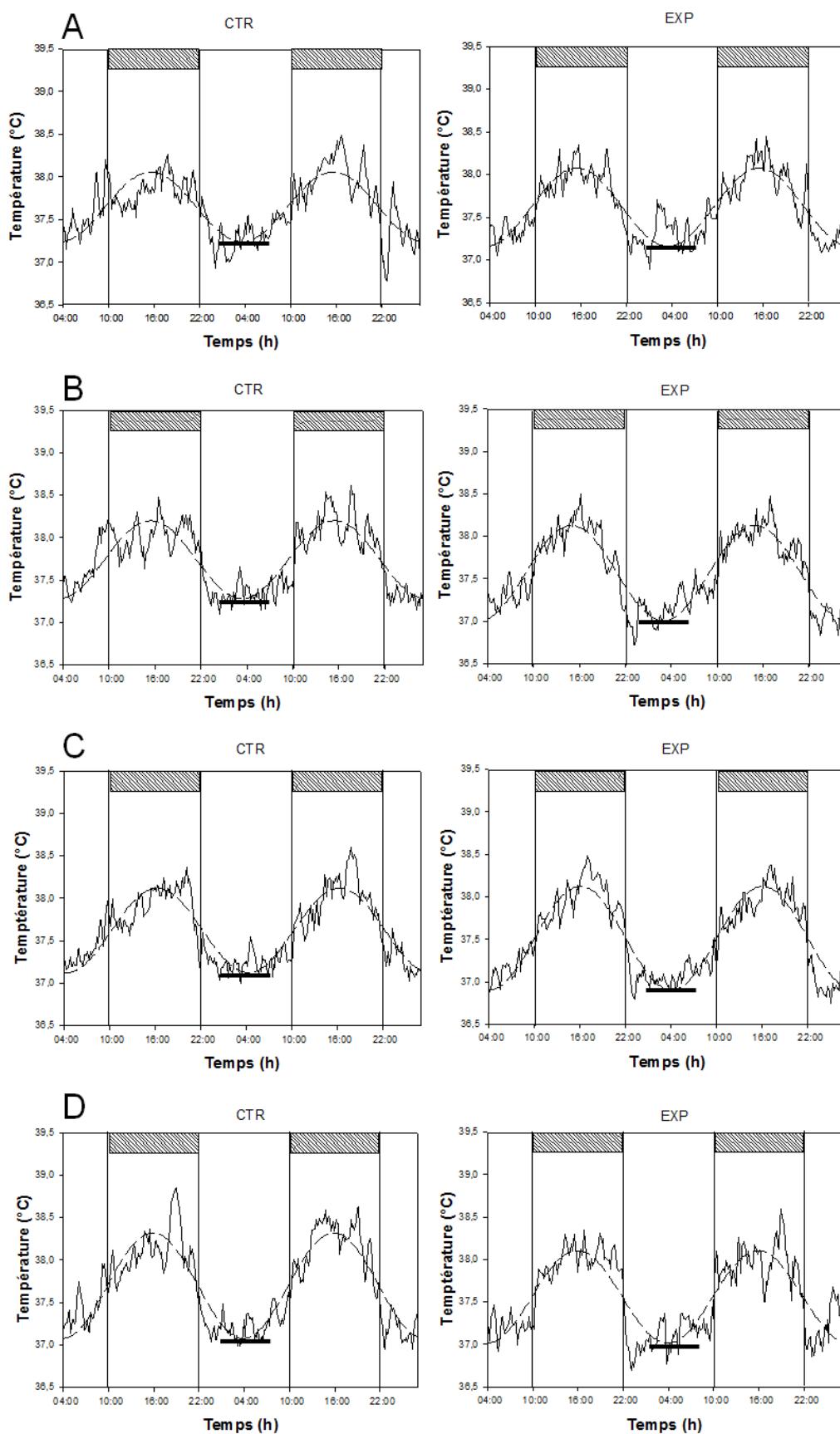


Figure 29 : Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) une seule injection de (A) véhicule, (B) Ago, (C) MLT et (D) S32006, à la dose de 5 mg/kg, en condition de microdialyse. La barre hachurée indique la période nocturne du cycle LD. Le trait noir représente les valeurs minimales de la Tc pendant le jour.

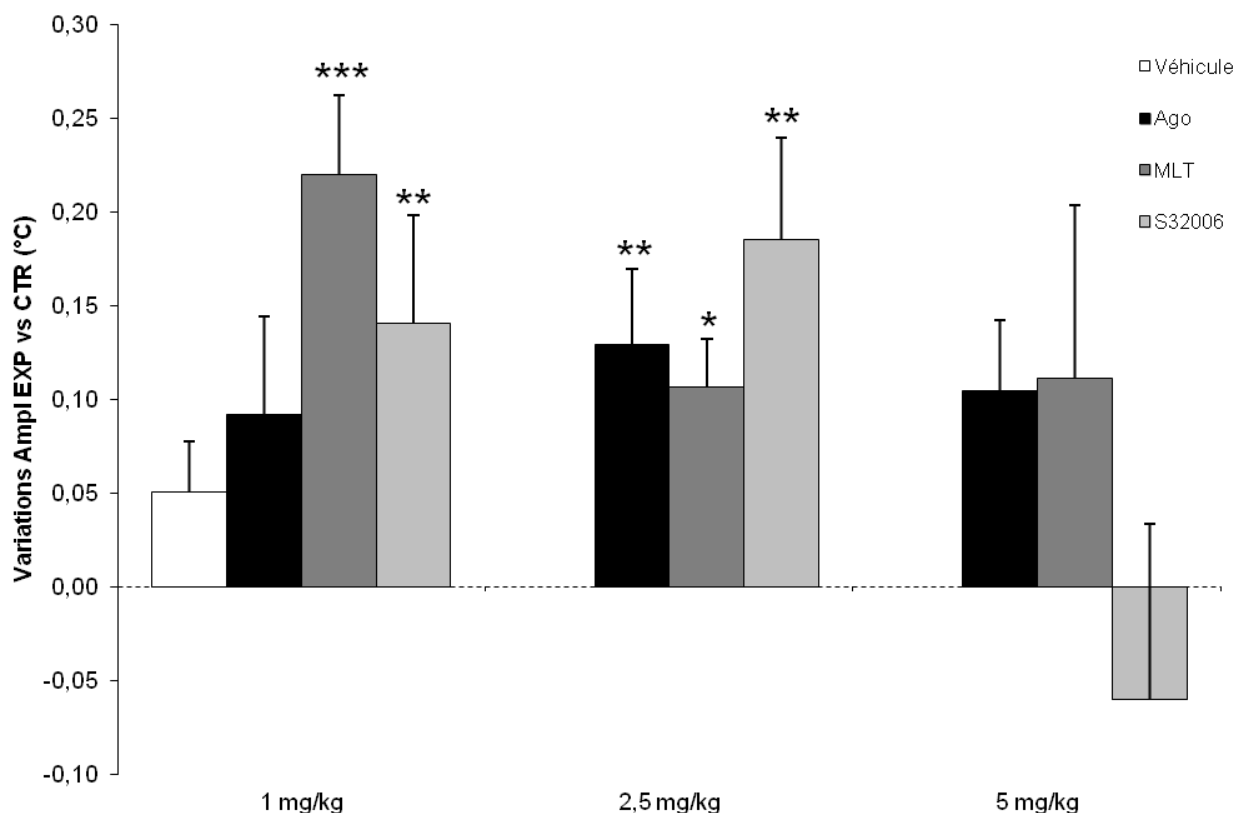


Figure 30 : Variations de l'amplitude (\pm SEM) de la Tc observées pour EXP vs CTR (ligne pointillée) suivant l'injection du véhicule et des drogues à différentes doses (1 ; 2,5 et 5 mg/kg), en condition LD 12 : 12 ; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$.

5. Discussion

Dans un premier temps, l'étude complémentaire réalisée avec un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{2C}, le SB242084, confirme les effets contrastés obtenus avec le S32006 (antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C/2B}) sur le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène. En revanche, l'augmentation d'amplitude observée avec le S32006 sur le rythme de la Tc n'est pas reproduite avec le SB242084. De plus, l'augmentation d'amplitude du rythme de la Tc induite par le S32006 et l'Ago est plus élevée à la dose de 2,5 mg/kg, contrairement à la MLT qui présente un effet supérieur à la dose de 1 mg/kg. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'effet de l'Ago sur le rythme de la Tc est lié à sa composante antagoniste sérotoninergique et plus particulièrement *via* les récepteurs 5-HT_{2B}. En effet, même si l'Ago présente une affinité pour les récepteurs 5-HT_{2C} (Millan *et al.*, 2003), elle se

lie également aux récepteurs 5-HT_{2B} qui selon nos résultats pourraient être responsables de l'effet de l'Ago sur le rythme de la Tc.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'injection des antagonistes 5-HT_{2C} n'induit aucun changement de l'amplitude du rythme de la Tc, et ce, quelque soit l'heure d'injection, y compris à ZT12 pour la dose de 2,5 mg/kg. De même, lorsque l'on a reproduit cette expérience en injectant l'Ago, la MLT, le S32006 et le SB242084, seulement à ZT12, les résultats obtenus n'ont montré aucune variation de l'amplitude du rythme de la Tc. Pour ces deux expériences, la microdialyse intrapinéale n'a pas été réalisée, seuls les I-Buttons ont été implantés afin d'étudier le rythme de la Tc. Ainsi, les résultats obtenus dans les deux études sans microdialyse nous ont amené à prendre en considération l'impact de la pratique de la microdialyse. En étudiant de manière plus approfondie les profils moyens du rythme de la Tc, nous avons remarqué qu'en situation contrôle (les deux jours avant l'injection), les valeurs minimales de la Tc sont plus élevées lorsque la microdialyse intrapinéale est réalisée simultanément à l'implantation des I-Buttons, par rapport aux valeurs obtenues sans microdialyse. Ainsi, la pratique d'une double chirurgie pourrait être responsable de l'augmentation du niveau basal de la Tc. De ce fait, en condition de microdialyse, nous suggérons que le niveau basal de la Tc étant plus élevé les deux jours avant traitement, les drogues seraient plus à même d'augmenter l'amplitude du rythme de la Tc par un abaissement de la température, comme nous l'avons démontré. Cet effet ne pourrait alors être reproduit en condition de simple chirurgie (implantation seule des I-Buttons) puisque le niveau basal de la Tc a atteint son minimum. Ainsi, en condition de microdialyse, l'Ago, la MLT et le S32006 agissent comme s'ils restauraient l'amplitude du rythme de la Tc. De ce fait, bien que chaque animal soit son propre contrôle, une attention particulière doit être apportée à la constitution d'un groupe d'animaux contrôle, pour lequel le véhicule est administré selon les mêmes conditions expérimentales que pour les drogues étudiées. Le groupe contrôle permet ainsi de déterminer la rigueur des résultats obtenus pour chaque drogue, comme il a été procédé dans notre étude.

De surcroît, l'impact de la microdialyse a pu être évalué, en étudiant les effets des drogues sur l'amplitude du rythme de la Tc aux différentes doses utilisées (1, 2,5 et 5mg/kg). Cette étude met en évidence un effet des drogues dépendant de la dose administrée. L'Ago, la MLT et le S32006 induisent une augmentation de l'amplitude de la Tc après leur injection à 1 mg/kg et 2,5 mg/kg tandis qu'aucun effet n'est observé à 5 mg/kg. Si l'on fait référence à l'hypothèse évoquée précédemment, du fait que la microdialyse intrapinéale pourrait être responsable de l'augmentation d'amplitude du rythme de la Tc, les différents effets induits par

les drogues en fonction de la dose administrée n'auraient pas pu être observés. En effet, l'augmentation d'amplitude aurait été également présente à la dose de 5 mg/kg. Ainsi, cette expérience sur l'effet de la dose, permet d'appuyer nos résultats obtenus sur le rythme de la Tc lors de la réalisation d'une microdialyse intrapinéale.

En résumé, ces différentes observations permettent d'appuyer les conclusions de notre étude principale mais apportent une attention particulière sur l'étude du rythme de la Tc en association avec celle de la sécrétion de mélatonine endogène qui nécessite la réalisation d'une double chirurgie. Toutefois, les effets des antagonistes sérotoninergiques sur la sécrétion de mélatonine endogène sont restés indéterminés, de par les résultats contrastés que nous avons obtenus. Des éléments de réponse pourraient être apportés en envisageant l'étude des effets de l'antagoniste SB242084 injecté à 1 et 5 mg/kg, puisque seule la dose de 2,5 mg/kg a été étudiée dans nos travaux.

Deuxième partition :
étude *in vitro* de l'amplitude
des oscillations du gène *Per1*
au sein de l'horloge centrale

I. Introduction

Chez les Mammifères l'horloge centrale se situe dans les NSC et contrôle la plupart des rythmes circadiens calés sur l'alternance jour/nuit (Kalsbeek & Buijs, 2002). Pour ce faire, les NSC possèdent une organisation cellulaire ainsi qu'une machinerie moléculaire complexe.

Au cours de ces dernières années, le fonctionnement moléculaire de l'horloge centrale a été bien établi, notamment avec l'identification des gènes horloge. Ces gènes sont impliqués dans des boucles de régulation transcriptionnelles avec une composante positive et négative. En effet, les gènes *Clock* et *Bmal1* vont être responsables de l'activation des gènes *Per (1-3)* et *Cry (1-2)*. La boucle négative fait, quant à elle, intervenir le gène *Per* dont la protéine PER, qui après dimérisation avec CRY, va inhiber sa propre synthèse (Reppert & Weaver, 2002). L'ensemble de ces boucles de régulation a été précédemment décrite de manière plus détaillée (**voir Introduction générale, II-2.2.a. Détermination génétique et mécanismes moléculaires**).

La régulation transcriptionnelle du gène *Per* semble être impliquée dans les mécanismes de synchronisation photique de l'horloge. En effet, il a été démontré que l'expression des gènes *Per1* et *Per2* se trouvait augmentée suite à l'application d'un créneau de lumière (Shearman *et al.*, 1997; Okamura *et al.*, 1999; Wakamatsu *et al.*, 2001). De même, les facteurs non photiques sont connus pour agir sur l'activité circadienne des NSC et sont également capables de modifier le profil d'expression des ARNm *Per1* et *Per2*. Contrairement à la lumière, les facteurs non photiques induisent un effet opposé en diminuant l'expression des ARNm *Per1* et *Per2* (Maywood *et al.*, 1999; Fukuhara *et al.*, 2001).

La sécrétion de mélatonine endogène représente une sortie d'intérêt de l'horloge centrale puisque cette hormone se trouve sous le contrôle direct des NSC et elle est également capable de rétroagir sur cette structure qui présente des récepteurs de la mélatonine. Des travaux ont montré que la mélatonine, dans certaines structures, contrôle directement l'expression rythmique du gène horloge *Per1* (Messenger *et al.*, 1999; Messenger *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'utilisation de la MLT permet la resynchronisation des rythmes biologiques telle que l'activité locomotrice (Pévet *et al.*, 2006 pour revue) mais elle est également capable d'augmenter l'amplitude des rythmes de la mélatonine endogène en agissant directement sur les NSC (Bothorel *et al.*, 2002).

L'Ago est un antidépresseur à la fois agoniste mélatoninergique (Ying *et al.*, 1996) et antagoniste sérotoninergique (Chagraoui *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2003), présentant des propriétés chronobiotiques semblables à celle de la MLT (Martinet *et al.*, 1996; Redman & Francis, 1998; Pitrosky *et al.*, 1999). Lors de nos travaux nous avons également démontré que l'Ago est capable d'induire une augmentation de l'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine et de la Tc, tout comme la MLT. Ces effets seraient liés à une action *via* les NSC.

Dans le présent travail, nous avons étudié les effets de l'Ago et de la MLT sur le fonctionnement moléculaire de l'horloge grâce au développement des nouvelles techniques moléculaires mis à notre disposition dans le laboratoire. Nos travaux ont pour but de déterminer les effets *in vitro* de l'Ago et de la MLT sur les oscillations du gène *Per1*, directement au sein des NSC en culture, par bioluminescence chez des rats transgéniques *Per1-luciférase*.

II. Matériels et méthodes

1. Animaux

Des rats Wistar *Per1-luciférase* (Yamazaki *et al.*, 2000) adultes mâles, âgés de 10 à 12 semaines, ont été utilisés. Cette lignée a été générée par le laboratoire du Dr Menaker (University of Virginia). Les animaux, obtenus à partir de cette lignée, ont été élevés au sein de la plate-forme d'expérimentation et de ressource animale, Chronobiotron de Strasbourg (UMS 3415). Ils ont été placés dans une chambre à température contrôlée ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) et maintenus en cycle LD 12 : 12 (lumière de 7 h à 19 h). La nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*.

Le protocole a été approuvé par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS, n° AL/12/19/02/13). Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec la directive 2010/63/E4 du Conseil Européen.

2. Enregistrement de la bioluminescence

Les rats *Per1-luciférase* sont des animaux pour lesquels le gène de la luciférase est inséré dans leur génome, sous la dépendance du promoteur du gène *Per1*. La luciférase mise en présence de son substrat, la luciférine, catalyse une réaction bioluminescente. Ainsi, la

quantité de lumière émise liée à l'activité de la luciférase reflète, le niveau d'expression du gène *Per1*. L'expression du gène *Per1*, sur des coupes de NSC *in vitro*, a donc été déterminée en mesurant la bioluminescence des NSC chez les rats transgéniques *Per1-luciférase*, selon une méthode décrite précédemment (Yamazaki & Takahashi, 2005). Tout d'abord, les rats sont euthanasiés et leurs cerveaux sont rapidement prélevés et placés dans une solution tampon froide de Hanks (HBSS, H1641, Sigma), contenant 0,035% de bicarbonate de sodium (S8761, Sigma), du HEPES (10mM, H0887, Sigma) et des antibiotiques (100 pg/ml de pénicilline et 100 U/ml de streptomycine, P433, Sigma). Des coupes coronales de la région suprachiasmatique (1 coupe par animal, épaisseur 500 μm) ont été réalisées en utilisant une matrice en acier inoxydable pour les cerveaux de rat (Harvard Apparatus). Puis, une petite coupe est délimitée avec précision dans les NSC (1,5 à 2 mm^2 de surface), à l'aide de lames de rasoirs. Ensuite, les tissus ont été placés sur des membranes de culture Millicell (Millipore), à l'intérieur d'une boîte de Pétri (diamètre de 35 mm) contenant 1 ml de milieu de culture. Ce milieu se compose de DMEM (Sigma) supplémenté avec du D (+) glucose (0,35%), du bicarbonate de sodium (0,035%), de l'HEPES (10 mM), de la vitamine B27 (2%, Invitrogen), des antibiotiques (25 pg/ml de pénicilline et 25 U/ml de streptomycine) et 0, 1 mM de luciférine de coléoptère (Promega). Les couvercles des boîtes de culture sont scellés avec de la graisse à vide (graisse silicone, Dow corning) et les boîtes sont ensuite placées dans le Lumicycle (Actimetrics, **Figure 31**). Il s'agit de l'appareil qui permet de mesurer la quantité de bioluminescence émise par les NSC. Le Lumicycle est constitué d'une chambre noire étanche à la lumière, placée dans un incubateur à 37°C, qui contient 4 tubes photomultiplicateurs qui vont mesurer la bioluminescence.

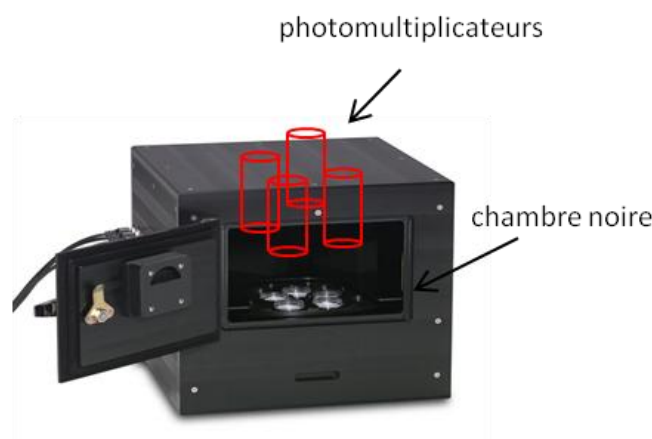


Figure 31 : Photographie du Lumicycle. Appareil permettant d'enregistrer la bioluminescence des échantillons dans les boîtes de culture. Les 4 tubes photomultiplicateurs (schématisé en rouge) vont détecter les photons émis par chaque échantillon.

3. Drogues

L'Ago (S20098) utilisée dans cette étude a été fournie par l'Institut de Recherches Internationales Servier. La MLT et le polyéthylène glycol 400 (PEG) proviennent de chez Sigma. Toutes les drogues ont été dissoutes dans une solution véhicule constituée de 30% d'éthanol, 20% de PEG et 50% d'eau stérile.

4. Procédure expérimentale

L'expression du gène *Per1* est enregistrée durant 4 jours consécutifs. Puis le milieu contenu dans les boîtes de culture est remplacé par un milieu de culture frais auquel on a ajouté soit de l'Ago ($n = 7$), soit de la MLT ($n = 8$), à une concentration finale de 50 μM et un volume de 1 $\mu\text{l/ml}$. Un groupe contrôle ($n = 5$) a également été constitué en ajoutant un volume équivalent de solution véhicule au milieu de culture (éthanol à 0.03%, polyéthylène glycol 400 à 0,02% et eau stérile à 0,05%). Les boîtes de culture, contenant les différents traitements, ont ensuite été replacées pour plusieurs jours dans le Lumicycle. Ainsi, dans un premier temps, les 3 oscillations obtenues avant le traitement (CTR) sont comparées avec les 3 oscillations après traitement (EXP), afin de déterminer l'effet de l'Ago et de la MLT. Dans un deuxième temps, nous avons porté une attention particulière à l'expression du gène *Per1* correspondant au jour du traitement. En effet, une comparaison des résultats obtenus uniquement le jour du traitement dans chaque groupe, va permettre de déterminer l'effet immédiat des différentes drogues.

5. Analyses des données et statistiques

L'enregistrement des données pour l'expression du gène *Per1* correspond au nombre de photons détectés par unité de temps et sont donc exprimées en coups/s. Le logiciel LumiCycle Analysis a été utilisé pour calculer l'amplitude (AMPL) des oscillations *Per1*. Pour se faire, une soustraction de la ligne de base moyennée sur 24 h a été réalisée sur la courbe brute par la méthode "Running average". Cette méthode permet de compenser la diminution progressive de l'activité de la luciférase et d'aligner les oscillations sur une ligne horizontale. L'amplitude des oscillations est ensuite déterminée à l'aide de la formule "Periodogram".

Pour la première analyse, prenant en compte les 3 oscillations avant et après traitement, une ANOVA pour mesures répétées a été effectuée sur AMPL, avec deux facteurs : les drogues (véhicule, Ago et MLT) et les jours expérimentaux (CTR et EXP). Ces analyses ont été effectuées afin de déterminer si un effet était au moins présent dans un des groupes d'animaux. Puis, pour les différents groupes expérimentaux, les comparaisons de l'amplitude à CTR et EXP ont été réalisées selon la méthode des contrastes planifiés pour tester les effets des traitements. Pour la deuxième analyse, où seule l'oscillation correspondant au jour du traitement est étudiée, une ANOVA à un facteur a été réalisée, suivie d'une comparaison *post hoc* avec le test LSD de Fisher pour tester l'effet des différents groupes expérimentaux. Le seuil de significativité est fixé à 0,05. Toutes les données sont exprimées en moyennes \pm SEM.

III. Résultats

1. Effets à moyen terme de l'agomélatine et de la mélatonine sur l'amplitude des oscillations du gène *Per1*

La **Figure 32A** représente un profil individuel caractéristique de l'expression du gène *Per1* du groupe véhicule avant (CTR) et après traitement (EXP). Sur ce profil, nous n'observons aucune différence d'amplitude sur les oscillations suite à l'administration du véhicule par rapport aux oscillations contrôles. En effet, la variation moyenne de AMPL pour le groupe véhicule obtenue à EXP ($2,41 \pm 2,97$ coups/s) est proche de CTR (ligne de base = 0), cependant les variations individuelles présentent une grande dispersion (**Figure 33**). Ainsi, l'administration du véhicule dans le milieu de culture n'induit pas d'effet significatif sur l'expression du gène *Per1* des NSC ($F = 1,16$; $p = 0,29$).

L'Ago et la MLT n'induisent pas de modifications de l'amplitude des profils d'expression du gène *Per1* après le traitement (**Figure 32B et 32C**). Les variations moyennes de AMPL ne sont pas significativement différentes entre EXP et CTR (Ago : $F = 0,94$; $p = 0,34$ et MLT : $F = 0,30$; $p = 0,58$; **Figure 33**). Les valeurs de la variation d'AMPL restent très proches de la ligne de base (Ago : $1,84 \pm 1,32$ coups/s ; MLT : $0,98 \pm 1,90$ coups/s). Ainsi l'Ago, tout comme la MLT, n'induit aucun effet à moyen terme sur l'amplitude des oscillations du gène *Per1*.

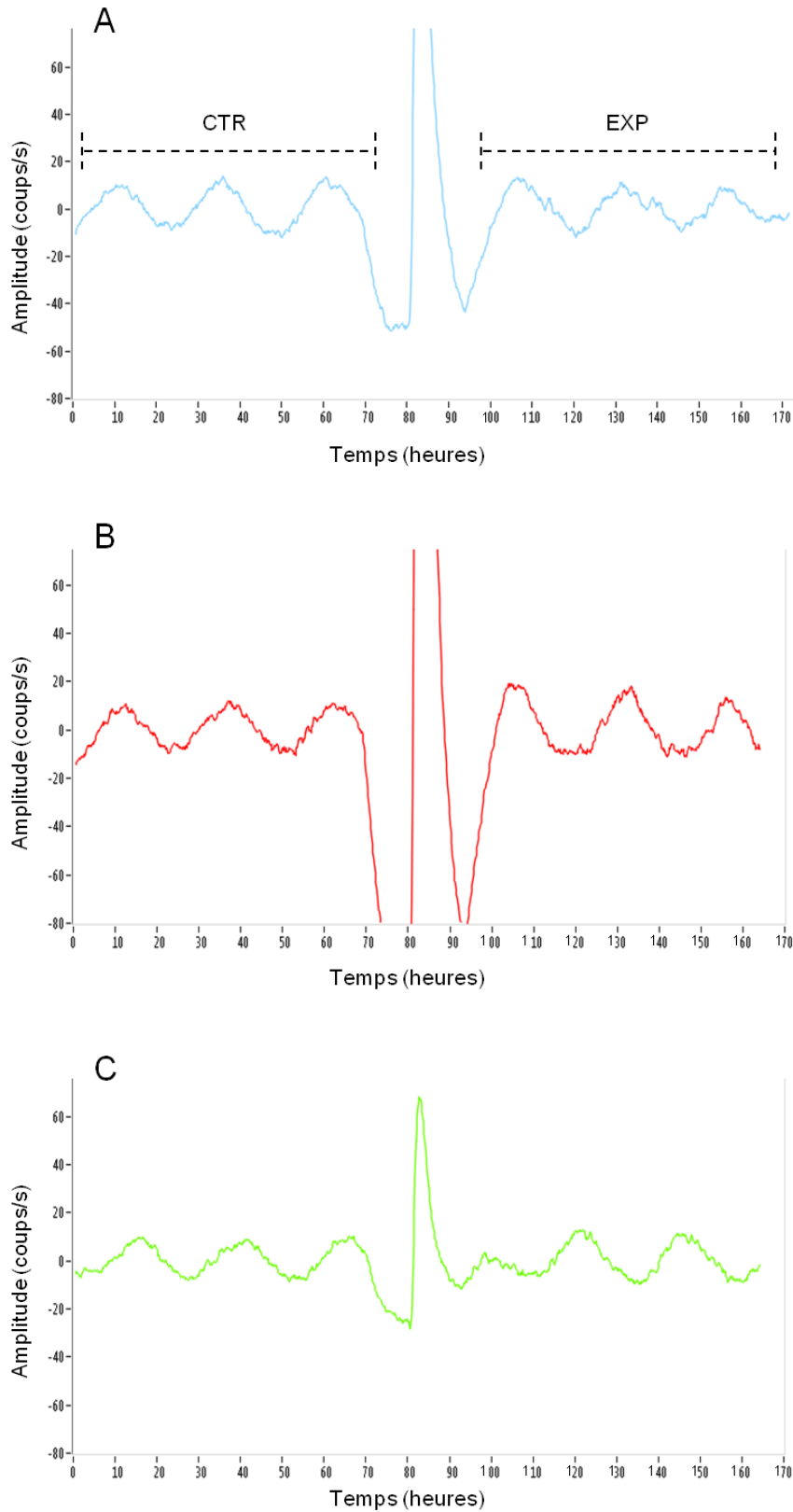


Figure 32 : Profils individuels représentatifs de chaque groupe de l'expression du gène *Per1* des NSC enregistrée durant les 3 oscillations avant (CTR) et après (EXP) administration (A) du véhicule, (B) d'Ago et (C) de MLT, à une concentration de 50 μ M.

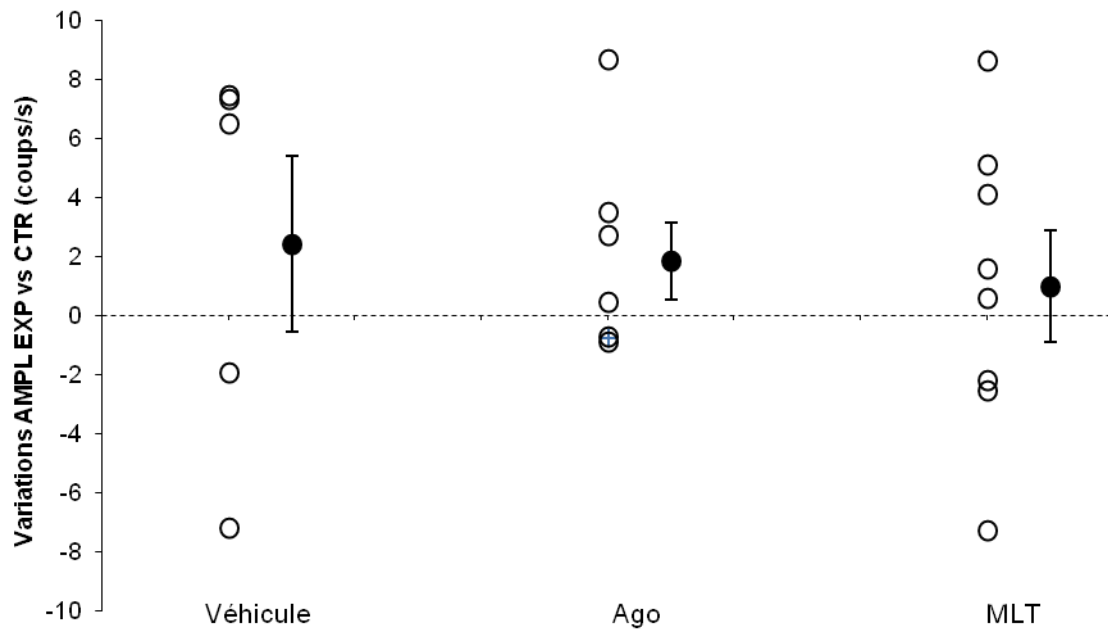


Figure 33 : Variations d'amplitude de l'expression du gène *Per1* entre EXP et CTR (ligne pointillée), après administration du véhicule, de l'Ago et de la MLT. Symboles ouverts : valeurs individuelles. Symboles fermés : moyennes \pm SEM.

2. Effet immédiat de l'agomélatine et la mélatonine sur l'expression du gène *Per1*

Dans le cadre de cette étude nous nous sommes focalisés sur les résultats obtenus le jour des traitements. La **Figure 34A** représente les profils individuels qui sont représentatifs de chaque groupe. Nous observons que le jour du traitement l'Ago, par rapport à la MLT et le véhicule, induit une forte augmentation d'amplitude de l'expression du gène *Per1*. La variation moyenne d'AMPL obtenue avec l'Ago est de $107,07 \pm 17,31$ coups/s, est significativement plus élevée ($p < 0,01$) que pour celle obtenue avec la MLT ($38,52 \pm 8,87$) (**Figure 34B**). L'augmentation obtenue avec l'Ago n'est pas significative par rapport à celle observée pour le groupe véhicule ($p = 0,10$). Ceci s'explique par le fait que, dans le groupe véhicule, un seul animal présente une forte augmentation de l'amplitude le jour du traitement et de ce fait, la valeur moyenne de la variation de AMPL est élevée ($65,27 \pm 25,90$). Ainsi, l'effet observé dans le groupe véhicule est supérieur à la MLT mais n'est pas significatif ($p = 0,27$).

L'Ago induit un effet significatif le jour du traitement sur l'expression du gène *Per1* par rapport à la MLT, qui ne montre aucun effet immédiat.

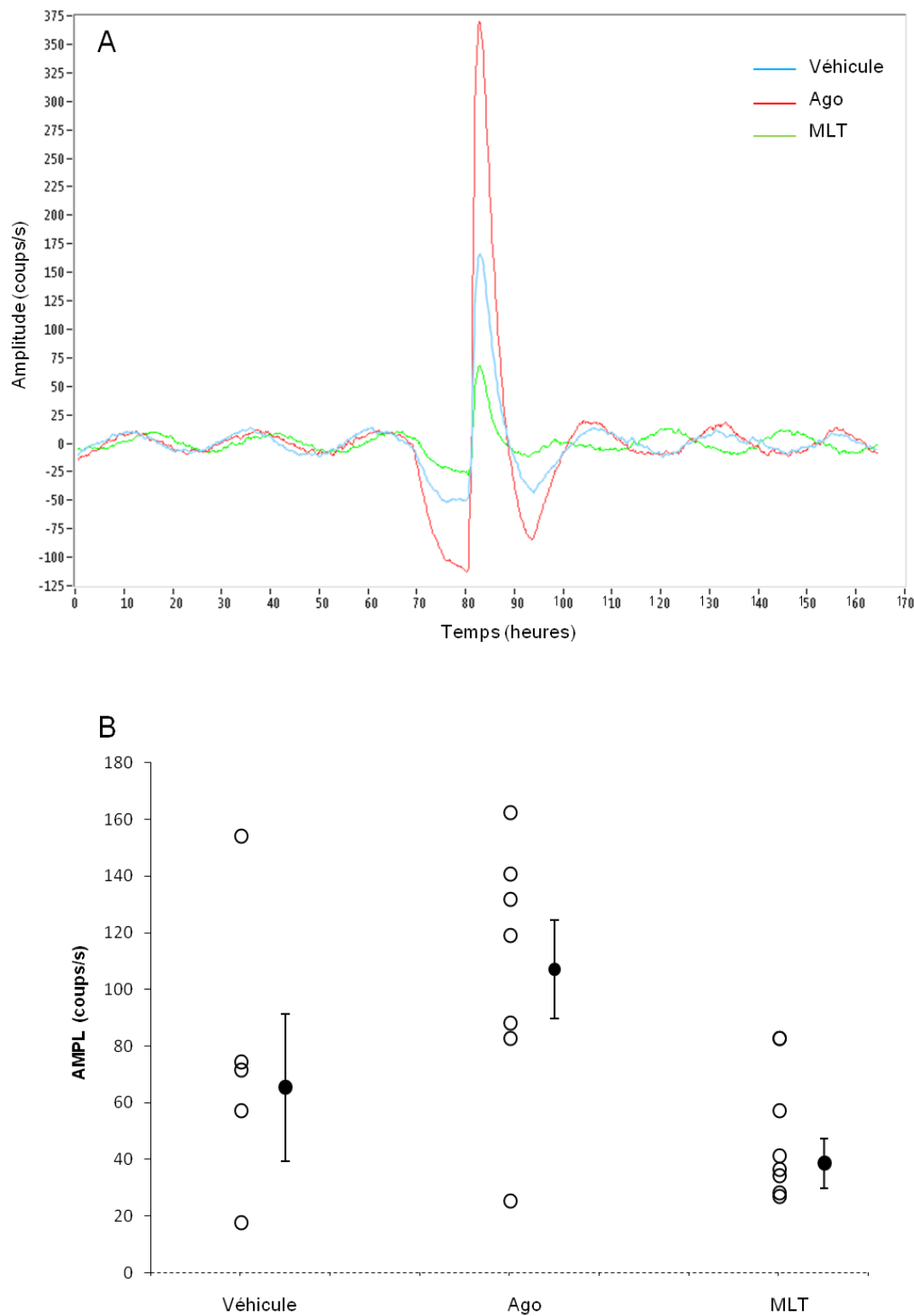


Figure 34 : (A) Profils individuels représentatifs de chaque groupe de l'expression du gène *Per1* des NSC enregistrée lors des différents traitements (véhicule, Ago et MLT). (B) Amplitude de l'oscillation du gène *Per1* enregistrée le jour des différents traitements (AMPL \pm SEM).

IV. Discussion

Plusieurs études ont montré que la lumière est capable de moduler l'expression des ARNm *Per1* et *Per2*. *In vivo*, l'application de créneau de lumière durant la nuit subjective induit une augmentation de l'expression de *Per1* (Albrecht et al., 1997; Zylka et al., 1998; Wakamatsu et al., 2001). De même, l'utilisation de facteurs non photiques est également reconnu pour moduler l'expression des gènes horloge *Per1* et *Per2* (Maywood et al., 1999; Yokota et al., 2000; Caldelas et al., 2005).

Dans notre étude, nous avons montré que la MLT n'induisait aucun effet sur l'amplitude de l'expression du gène *Per1* lorsqu'elle est administrée de manière chronique sur les tranches de NSC en culture et ce, aussi bien de manière instantanée qu'à plus long terme (jusqu'à 3 jours après le traitement). Or, au vu de nos résultats obtenus précédemment, lors de nos études *in vivo*, qui montrent une augmentation de l'amplitude de la sécrétion de mélatonine endogène et de la Tc induite par la MLT, nous nous attendions à obtenir un effet similaire sur l'amplitude des oscillations circadiennes du gène *Per1* directement au sein des NSC. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus corroborent les travaux réalisés *in vivo* par Poirel et coll. (2003) qui ont montré que l'injection aiguë de MLT n'induit pas de modification de l'amplitude du profil d'expression du gène *Per1*.

Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas pu démontrer que la MLT pouvait moduler les oscillations du gène *Per1*. Toutefois, il a été montré que la MLT induit une avance de phase de l'expression du *Rev-erba* (Agez et al., 2007), ainsi l'action de la MLT pourrait être gène spécifique. Il serait donc intéressant d'étudier *in vitro* l'expression d'autres gènes horloge, notamment *Rev-erba* avec l'utilisation de souris *Rev-erba-luciférase*. De même, il n'est pas à exclure que la MLT pourrait intervenir dans des mécanismes plus en aval de la machinerie moléculaire, telles que les modifications post-traductionnelles que l'on sait maintenant indispensables au bon fonctionnement de l'horloge centrale (Lee et al., 2001).

Nos travaux montrent que l'application chronique d'Ago n'induit pas d'effet sur l'amplitude des oscillations du gène *Per1* à moyen terme mais une augmentation de l'expression du gène *Per1* le jour du traitement est observée. Ainsi, l'Ago est capable de provoquer un puissant effet immédiat sur l'expression du gène *Per1*, par rapport à la MLT. Ces résultats suggèrent que l'action de l'Ago sur les oscillations *Per1* pourrait être liée à sa deuxième composante, ses propriétés antagonistes 5-HT_{2C}. Une étude complémentaire pourrait être envisagée en appliquant l'antagoniste 5-HT_{2C/2B} (S32006) afin d'observer si

l'effet immédiat induit par l'Ago sur l'expression du gène *Per1* serait reproduite avec le S32006.

Nous avons constaté lors de cette étude que malgré les effets immédiats que présente l'Ago sur l'expression de *Per1*, aucun effet n'est observé sur l'amplitude des 3 oscillations de l'expression de *Per1* après traitement. Ceci pourrait s'expliquer par une saturation du système liée à la présence continue de l'Ago dans le milieu de culture des NSC. De la même manière que dans nos études *in vivo*, il serait alors possible d'envisager l'application de l'Ago de façon aiguë dans le milieu de culture afin de déterminer si l'effet observé le jour du traitement aurait lieu sur plusieurs jours consécutifs, comme observés pour le rythme de la sécrétion endogène de la mélatonine et de la Tc. Si le temps d'application peut influencer sur la présence d'effet à long terme de l'Ago sur l'expression de *Per1*, il serait également intéressant de prendre en considération le moment où les différentes drogues ont été administrées dans le milieu de culture. Des travaux ont montré que la MLT est capable d'augmenter l'amplitude des oscillations *Per1*, lorsque celle-ci est appliquée durant 30 min sur des fibroblastes en culture, 3 h après l'acrophase des oscillations tandis qu'aucun effet n'est rencontré quand la MLT est administrée 2 h avant l'acrophase (Liu *et al.*, communication personnelle). Comme nous l'avons déjà évoqué dans le cadre de nos études *in vivo*, la fenêtre de sensibilité est un critère important à prendre en considération lors d'études pharmacologiques impliquant les rythmes circadiens (Bothorel *et al.*, 2002; Slotten *et al.*, 2002). Une étude, portant sur la durée du traitement et le moment auquel l'Ago et la MLT doivent être administrées, a été entreprise afin de démontrer si ces facteurs pourraient avoir un impact sur les effets induits par les différentes drogues sur l'amplitude des oscillations *Per1*. L'apparition, dernièrement, d'un défaut dans la lignée des rats transgéniques *Per1-luciférase* utilisée, n'a pas permis de poursuivre ces investigations et restent à l'heure actuelle en suspens.

De même, nous avons montré dans nos études *in vivo* que l'effet induit par les différentes drogues varie en fonction de la dose administrée. Dans le cas de cette étude *in vitro* une seule concentration a été administrée (50 μ M), nous pouvons également envisager d'étudier les effets de l'Ago et de la MLT administrées à différentes doses.

En conclusion, cette étude montre que l'Ago, en comparaison à la MLT, augmente de manière immédiate l'amplitude de l'expression du gène *Per1* des NSC. De plus, l'absence d'effet induit par la MLT amène à prendre en considération la composante antagoniste sérotoninergique de l'Ago qui pourrait être responsable des effets sur l'expression du gène *Per1*.

Très peu de travaux, montrant l'impact de l'Ago sur le fonctionnement moléculaire de l'horloge circadienne, ont été jusqu'ici réalisés. Cette étude *in vitro* a permis d'aborder, selon une nouvelle approche, l'effet de l'Ago sur les oscillations de l'horloge et renforce l'idée de son action centrale, au cœur même des NSC. Malheureusement, les altérations rencontrées dans la lignée des rats transgéniques *Per1-luciférase* (de manière concomitante dans au moins deux laboratoires), ne nous a pas permis d'aller plus en avant dans notre étude. Il faudrait reprendre ces travaux, par exemple, avec la lignée de souris *Per2-luciférase* ou encore *Rev-erba-luciférase* qui semble plus stable et dont les colonies sont présentes au Chronobiotron.

Discussion générale et perspectives

À l'heure actuelle, il est bien établi que l'Ago présente une action antidépressive intimement liée à ses effets sur les rythmes circadiens (Cardinali *et al.*, 2012 pour revue). Depuis ces dernières années, de nombreuses études appuient cette interprétation, notamment en reconnaissant le pouvoir chronobiotique de l'Ago, lié à ses propriétés agonistes mélatoninergiques (Armstrong *et al.*, 1993; Martinet *et al.*, 1996; Pitrosky *et al.*, 1999; Van Reeth *et al.*, 2001). De plus, la connaissance de l'influence de la sérotonine sur les rythmes circadiens a largement été rapportée (Prosser *et al.*, 1990; Kennaway *et al.*, 2001; Cuesta *et al.*, 2009). Ainsi, les propriétés antagonistes sérotoninergiques de l'Ago sont loin d'être dénuées d'intérêt dans l'action de cette drogue sur l'horloge circadienne. Si, à ce jour, les propriétés de l'Ago ne sont plus à démontrer, les mécanismes sous-jacents restent encore à être élucidés. Notre projet de thèse s'est inscrit dans cette problématique, à savoir, une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'Ago sur le système circadien, avec un regard particulier en ce qui concerne les effets sur l'horloge centrale.

I. Effets de l'agomélatine sur l'amplitude des oscillations de l'horloge

1. Rythme de la sécrétion de mélatonine endogène

Des travaux précédents ont mis en avant l'importance de la mélatonine au sein du système circadien en agissant directement sur le fonctionnement de l'horloge. En effet, de par ses propriétés chronobiotiques, la MLT est capable de resynchroniser l'horloge centrale (Pévet *et al.*, 2002 pour revue), mais également d'augmenter l'amplitude des oscillations de cette horloge (Bothorel *et al.*, 2002).

L'Ago est un puissant agoniste des récepteurs de la mélatonine, dont les effets chronobiotiques ont été jusqu'ici particulièrement étudiés (Van Reeth *et al.*, 1998; Pitrosky *et al.*, 1999). L'originalité de notre étude a été de déterminer les effets de l'Ago, cette fois-ci, sur l'amplitude des oscillations de l'horloge. Dans le cadre de nos travaux, la première sortie de l'horloge que nous avons décidé de prendre en considération est le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène. La sécrétion de mélatonine est connue pour dépendre directement des NSC, qui de ce fait, s'avère être un marqueur de choix pour étudier le fonctionnement de l'horloge circadienne. Nos travaux révèlent que l'Ago est capable, comme la MLT,

d'augmenter l'amplitude des oscillations du rythme de la sécrétion de mélatonine endogène avec une dose efficace de 2,5 mg/kg. À première vue, cet effet de l'Ago semble être lié uniquement à ses propriétés mélatoninergiques. L'étude menée sur les propriétés antagonistes sérotoninergiques de l'Ago, en utilisant le S32006, ne montre effectivement pas de modification significative de l'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine. Néanmoins, nous avons été interpellés par les résultats contrastés obtenus à la dose de 2,5 mg/kg pour laquelle le S32006 induit une augmentation de l'amplitude du pic de mélatonine pour la moitié des animaux et une diminution de l'amplitude pour l'autre moitié des animaux. Il est donc possible, pour le S32006, que la dose de 2,5 mg/kg soit une dose limite. Dans les études sur les modèles de dépression animaux, la dose utilisée pour l'Ago et la MLT est supérieure par rapport à celle utilisée pour le S32006, lors d'injections intrapéritonéales (Tardito *et al.*, 2010; Norman *et al.*, 2012). De manière similaire, nous pourrions envisager d'injecter une dose inférieure et intermédiaire entre 1 et 2,5 mg/kg afin de déterminer un éventuel effet de l'antagoniste 5-HT_{2C} sur l'amplitude du pic de mélatonine.

Dans nos travaux, nous confirmons l'effet de l'Ago et de la MLT sur les variables rythmiques de la sécrétion de mélatonine, avec notamment un allongement de la durée du pic de mélatonine endogène et ce, en condition LD 12 : 12, alors que le facteur photique est reconnu comme le plus puissant des synchroniseurs. Jusqu'à présent, les propriétés chronobiotiques de l'Ago et de la MLT ont été démontrées en conditions constantes (Redman & Francis, 1998; Pitrosky *et al.*, 1999). Dans les présentes conditions expérimentales, nous reconnaissons donc une action puissante de l'Ago et de la MLT sur les variables rythmiques du pic de sécrétion de la mélatonine, malgré l'influence du facteur photique. Ces observations nous amènent à poser la question de l'impact de l'environnement lumineux sur les effets rythmiques des deux drogues. Autrement dit, dans quelles proportions les effets sur les variables circadiennes du pic de mélatonine seraient-ils encore présents, si on faisait varier la photopériode. Ainsi, nous pourrions déterminer si les effets de l'Ago sur les variables circadiennes sont dépendantes des conditions photopériodiques. Pour se faire, l'injection d'Ago et de MLT pourrait être réalisée sur des animaux placés en conditions LD 16 : 8 (photopériode longue) ou bien LD 8 : 16 (photopériode courte), ces différentes conditions photopériodiques étant connues pour influencer le rythme de sécrétion de la mélatonine endogène (Illnerova *et al.*, 1986; Ribelayga *et al.*, 1999, Tritschler *et al.*, communication personnelle). Ces réponses s'avèreraient importante dans l'approche thérapeutique de certains troubles saisonniers, par exemple la dépression saisonnière.

2. Rythme de la température corporelle

L'augmentation d'amplitude provoquée par l'Ago et la MLT constitue un argument fort de l'action de ces drogues sur les NSC. Si cette conclusion est avérée, un effet similaire devrait être observé pour une autre sortie de l'horloge. D'où l'intérêt d'étudier l'effet des différentes drogues sur une deuxième sortie de l'horloge, le rythme de la Tc qui présente l'avantage de pouvoir être suivi simultanément avec le rythme de sécrétion de mélatonine. Pour l'Ago et la MLT, une augmentation d'amplitude a été retrouvée sur le rythme de la Tc, tout comme sur le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène, ce qui semble appuyer nos conclusions d'une action des deux drogues sur l'horloge. En revanche, le S32006 provoque une augmentation d'amplitude sur le rythme de la Tc alors que cet effet n'est pas reproduit sur le rythme de sécrétion de la mélatonine endogène. De ce fait, il est possible de suggérer que les propriétés sérotoninergiques de l'Ago puissent agir davantage en périphérie que sur l'horloge centrale elle-même.

Chez l'Homme, une étude a montré que l'infusion de MLT renforce la baisse de la Tc qui se produit durant la nuit (phase de repos) (Strassman *et al.*, 1991). Ces effets pourraient être liés à une vasodilatation induite par la MLT, en périphérie, sur les vaisseaux présentant des récepteurs de la mélatonine (van der Helm-van Mil *et al.*, 2003). De même, il a été montré que l'Ago est également capable d'augmenter l'amplitude du rythme de la Tc, par une baisse de la température en début de nuit lorsqu'il est administré chez l'Homme (Krauchi *et al.*, 1997). Dans le cas de notre étude, nous ne pouvons pas négliger que l'augmentation d'amplitude, induite par les différentes drogues, *via* une baisse de la Tc durant la phase de repos des animaux, pourrait être liée à une action en périphérie. Même si, les résultats obtenus sur le rythme de la Tc (sortie robuste de l'horloge circadienne) confortent notre hypothèse d'une action de l'Ago et de la MLT sur les NSC, ces données demandent à être approfondies. Pour confirmer que l'effet sur la Tc induit par l'Ago et le S32006 est bien lié à une action des drogues directement sur l'horloge, nous pourrions envisager une injection des différentes substances directement dans les NSC en pratiquant une microdialyse inverse, comme cela a déjà été réalisé avec la MLT pour le rythme de sécrétion de la mélatonine endogène (Bothorel *et al.*, 2002)

3. Expression du gène *Per1*

Afin d'apporter la confirmation d'une action directe de l'Ago sur l'horloge elle-même, nous avons porté notre intérêt sur une technique prometteuse basée sur la bioluminescence et récemment développée au laboratoire. Ainsi, l'utilisation des rats *Per1-luciférase* nous a permis de réaliser une étude *in vitro* de l'expression du gène horloge *Per1* directement sur les NSC. Un certain temps de mise au point a été nécessaire afin d'adapter le protocole de bioluminescence dans le cadre de l'étude pharmacologique que nous avons décidé d'entreprendre (durée d'enregistrement des oscillations, choix du solvant à utiliser pour les drogues). Cette étude, dans les présentes conditions expérimentales, n'a pas permis de mettre en évidence d'effet de l'Ago ou de la MLT sur l'amplitude des oscillations du gène *Per1*. Toutefois, une observation particulière a retenu notre attention. En effet, le jour du traitement, l'expression du gène *Per1* est caractérisée par une augmentation brutale et importante suite à l'administration de l'Ago, comparée à la MLT. Ce résultat suggère que l'Ago présenterait un effet sur l'expression du gène *Per1*, mais actuellement, il est difficile de déterminer si cet effet est spécifique au gène *Per1* ou s'il est lié à une action sur l'ensemble du fonctionnement moléculaire de l'horloge. Pour répondre à cette question, une étude sur différents gènes horloge, par exemple sur *Per2* ou *Rev-erba*, devrait être envisagée.

Dans nos conditions expérimentales, l'Ago induit un effet immédiat supérieur à celui obtenu avec la MLT mais ceci ne se répercute pas sur les oscillations suivantes. Il se pourrait donc que l'effet observé ne relève pas des propriétés mélatoninergiques de l'Ago mais plutôt de ses propriétés sérotoninergiques qui seraient alors responsables de cette réponse. L'administration d'un antagoniste 5-HT_{2C} permettrait de vérifier cela et par la même d'appuyer notre hypothèse, à savoir que les propriétés sérotoninergiques de l'Ago agissent directement dans les NSC.

La réalisation de cette étude *in vitro* et les résultats obtenus encouragent à approfondir les investigations en faisant varier différents paramètres expérimentaux, telle que la concentration ou bien encore le mode d'administration. Les problèmes rencontrés dans la lignée de rats utilisés nous incitent, dans les futures études, à envisager les effets *in vitro* de l'Ago sur d'autres modèles animaux (rats *Per2-luciférase*, souris *Rev-erba*, souris *Per2-luciférase*). De même, le développement au laboratoire d'un nouveau système d'enregistrement de la bioluminescence (le Luminoview) permettrait d'administrer les drogues sans avoir à manipuler les boîtes de culture, ce qui jusqu'à présent était incontournable avec l'utilisation du Lumicycle. L'optimisation de ces conditions

expérimentales pourrait alors dévoiler un effet à moyen terme de l'Ago sur l'expression des gènes horloge.

À l'heure actuelle, les mécanismes d'action de l'Ago sur le fonctionnement moléculaire sont très peu étudiés. Seuls les travaux de Koresh et coll. (2011) ont montré, chez des animaux présentant un trouble post-traumatique, un effet significatif de l'Ago qui restaure l'expression des gènes *Per1* et *Per2* dans les NSC. Ainsi, de par nos premiers résultats obtenus *in vitro* sur les effets de l'Ago, nous pensons que les différentes voies d'études ici proposées s'avèrent prometteuses et ouvrent des perspectives.

4. Mécanismes d'action de l'agomélatine : vue d'ensemble

L'Ago présente des propriétés agonistes mélatoninergiques et antagonistes sérotoninergiques qui agiraient selon un mode d'action neurones spécifiques. Bien que cela ne soit pas encore démontré, il est actuellement suggéré que la partie dorso-médiane des NSC, constituée essentiellement des neurones à AVP, contiendrait la plupart des récepteurs de la mélatonine (Maywood *et al.*, 1995). Nous avons donc considéré que les propriétés agonistes mélatoninergiques pourraient agir sur la partie dorso-médiane des NSC.

Par ailleurs, la partie ventro-latérale des NSC, constituée de neurones à VIP et à GRP, est impliquée dans l'intégration des signaux photiques et non photiques puisqu'elle reçoit les afférences des NSC. Les fibres sérotoninergiques en provenance du raphé médian constituent l'une des trois afférences nerveuses majeures des NSC (Challet & Pévet, 2003 pour revue). De manière expérimentale, il a été montré que ces fibres sont impliquées dans la modulation des effets photiques et dans la transmission des informations non photiques à l'horloge. Ainsi, de par ses propriétés sérotoninergiques, l'Ago pourrait agir sur la partie ventro-latérale des NSC.

Dans notre hypothèse de travail, nous avons suggéré que les propriétés à la fois agonistes mélatoninergiques et antagonistes sérotoninergiques de l'Ago, agiraient **en synergie** sur les oscillations de l'horloge en provoquant une augmentation de l'amplitude des rythmes circadiens. Suite à nos travaux, cette hypothèse reste toujours valide mais n'a pas pu être expérimentalement démontrée. Nous avons bien confirmé que l'Ago, comme la MLT, augmente l'amplitude du rythme de la sécrétion de la mélatonine endogène et du rythme de la Tc. L'effet immédiat de l'Ago sur l'amplitude de l'expression du gène *Per1* serait également un argument en faveur d'une action de la drogue directement sur les oscillations de l'horloge. Par contre, nous n'avons pas démontré que les effets induits par l'Ago sur l'amplitude des

différents rythmes étudiés, résultent d'une action synergique de ses propriétés agoniste mélatonnergique et antagoniste sérotonnergique. Pour le rythme de sécrétion de la mélatonine endogène, seules les propriétés mélatonnergiques de l'Ago semblent être impliquées puisque l'injection de S32006, contrairement à la MLT, n'induit pas d'effet sur l'amplitude. Toutefois, il est possible que l'augmentation d'amplitude observée sur le rythme de la Tc soit liée à un effet synergique des propriétés agoniste mélatonnergique et antagoniste sérotonnergique sur l'horloge centrale. En effet, l'étude sur le rythme de la Tc a effectivement révélé une augmentation de l'amplitude aussi bien après l'injection d'Ago, de MLT ou du S32006. Néanmoins, cet éventuel effet synergique sur le rythme de la Tc reste à approfondir en déterminant si cet effet n'est pas lié à une action en périphérie.

À partir de nos travaux et des résultats obtenus, nous proposons donc un nouveau schéma hypothétique des mécanismes d'action de l'Ago sur l'horloge centrale (**Figure 35**). En résumé, cette approche des mécanismes d'action de l'Ago suggère une action neurone spécifique de l'Ago qui induirait **un effet distinct** pour ses propriétés agonistes mélatonnergiques et antagonistes sérotonnergiques dont la résultante est une augmentation de l'amplitude des oscillations de l'horloge. D'autres éléments de réponse pourront venir appuyer cette hypothèse, en explorant davantage la porte que nous avons entrouverte à l'issue de nos travaux, notamment avec les résultats sur l'expression du gène horloge *Perl*. Toutefois, l'effet distinct observé pour chaque propriété de l'Ago n'empêche pas une action simultanée des ses deux composantes agoniste mélatonnergique et antagoniste sérotonnergique. De plus, un effet synergique des propriétés de l'Ago, au niveau central et/ou périphérique, pourrait être envisagé sur le rythme de la Tc mais ceci reste encore à être déterminé.

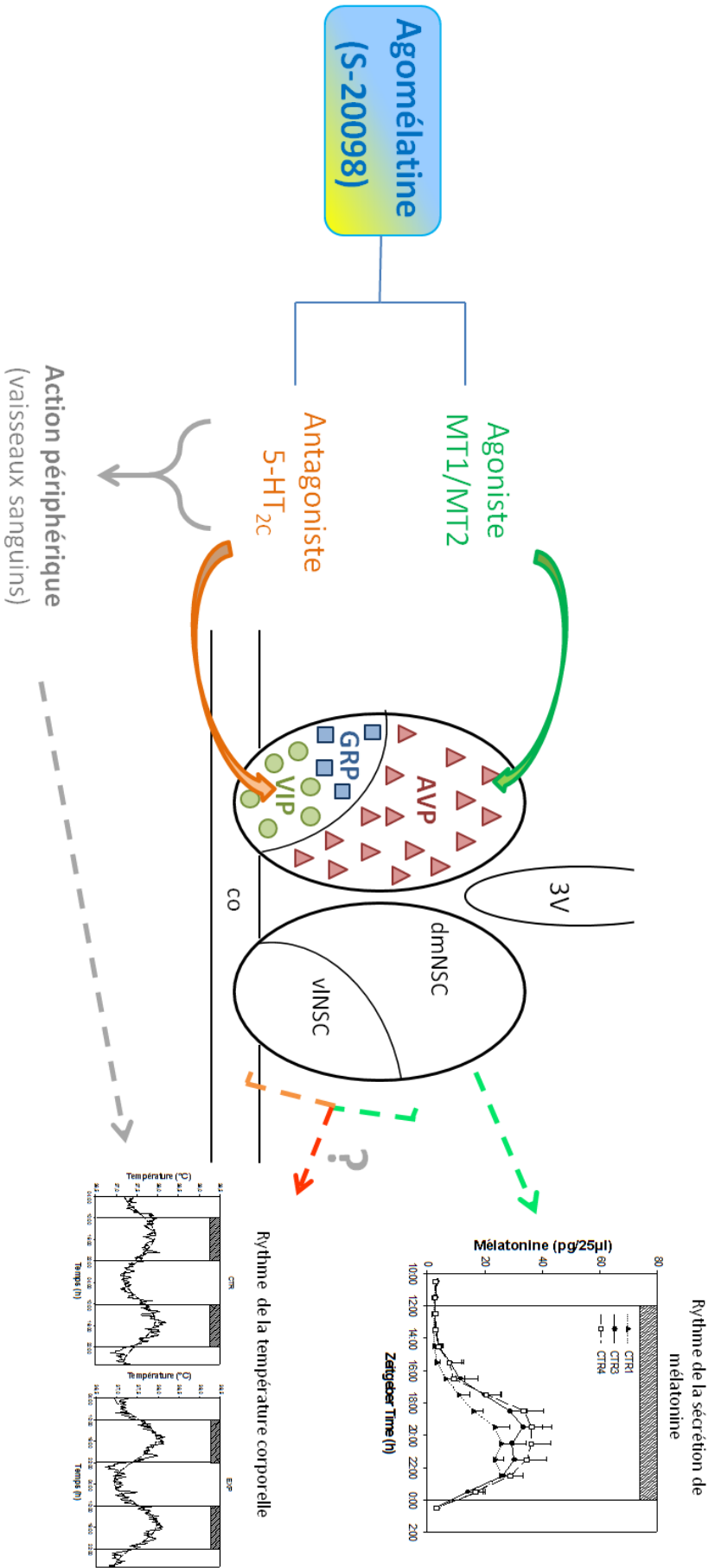


Figure 35 : Représentation schématique des mécanismes d'action de l'Ago sur l'horloge centrale. L'action neuronale spécifique de l'Ago provoque une augmentation de l'amplitude des oscillations de l'horloge (rythme de sécrétion de la mélatonine et rythme de la Tc) selon un effet distinct pour chaque propriété considérée de l'Ago, soit agoniste mélatonnergique, soit antagoniste sérotonnergique. Seul un effet synergique des propriétés de l'Ago, au niveau central et/ou périphérique, pourrait être envisagé sur le rythme de la Tc. AVP : Arginine Vasopressine, VIP : Vasoactif Intestinal Peptide, GRP : Gastrin Releasing Peptide, 3V : 3^{ème} ventricule, co : chiasma optique, dmNSC : partie dorso-médiane des NSC, vNSC : partie ventro-latérale des NSC.

II Relation entre rythmes circadiens et dépression chez l'Homme

Lors d'épisodes dépressifs majeurs (EDM), il a été noté que certains paramètres biologiques présentent des modifications de leur rythmicité circadienne. Le lien entre rythmes et dépressions est bien établi, ceci explique les innovations thérapeutiques récentes, par exemple avec le développement d'antidépresseurs de nouvelle génération.

Des effets antidépresseurs ont été obtenus lors des traitements non pharmacologiques, notamment avec l'utilisation de la photothérapie (Golden *et al.*, 2005) ou bien encore, suite à une privation de sommeil (Wu & Bunney, 1990). Toutefois, les effets thérapeutiques de ces différents traitements semblent transitoires et présentent un taux de rechute important (Svestka, 2008). Ce taux s'avère diminué lorsque le traitement est associé à un antidépresseur (Wu & Bunney, 1990). Ainsi, le développement d'antidépresseur, capable de moduler les rythmes circadiens, telle que l'Ago, a constitué une nouvelle approche d'intérêt dans le traitement de la dépression.

Parmi les modifications des rythmes circadiens recensées chez les patients déprimés, une baisse de l'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine endogène (Crasson *et al.*, 2004) ainsi que de la Tc a pu être constatée (Souetre *et al.*, 1989). Dans le cadre de nos travaux, nous avons mis en évidence que l'Ago augmente l'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine et de la Tc. Ainsi, l'action antidépressive de l'Ago proviendrait en partie de sa capacité à restaurer l'amplitude des rythmes. De surcroît, les propriétés chronobiotiques connues de l'Ago constituent une valeur ajoutée à son action antidépressive. L'ensemble de ces caractéristiques permet à l'Ago de restructurer les rythmes biologiques et ainsi d'avoir des effets thérapeutiques.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons vu que la dose est un facteur important à prendre en considération. Certes, nous avons étudié les effets de l'Ago sur l'amplitude des rythmes circadiens mais dans quelle mesure les doses que nous avons utilisées sur les animaux peuvent-elles être mises en relation avec celles utilisées lors du traitement chez l'Homme. Dans notre étude *in vivo*, les effets induits par l'Ago, sur l'amplitude du rythme de la sécrétion de mélatonine et de la Tc, obtenus à la dose de 2,5 mg/kg, présentent un résultat cohérent avec ce qui est utilisé chez l'Homme dans le traitement de la dépression. En effet, lorsque nous rapportons cette mesure à une dose équivalente chez l'Homme, sur la base de la

surface corporelle (Reagan-Shaw *et al.*, 2008), nous obtenons une dose de 28,5 mg/j pour une personne de 70 kg. Dans les études cliniques, il a été établi que la dose efficace, pour les patients souffrant d'épisodes dépressifs majeurs, est de 25 mg/j (de Bodinat *et al.*, 2010 pour revue).

De plus, chez l'Homme, il a été montré que l'administration de MLT en début de nuit est capable de provoquer une avance de phase, ces effets sont encore présents 3 jours après traitement. Ces données appuient les résultats que nous avons obtenus chez le rat qui montrent un effet de l'Ago et de la MLT sur les variables rythmiques du pic de sécrétion de la mélatonine durant plusieurs jours consécutifs (Mallo *et al.*, 1988).

En revanche, les études que nous avons menées ont été réalisées chez une espèce nocturne. Dans ce cas, il faut être prudent dans la transposition de nos résultats à l'Homme. Nos études ont apporté effectivement des données qui pourraient être mises en relation avec le traitement des patients déprimés, notamment en ce qui concerne le rythme de sécrétion de la mélatonine endogène. En effet, la sécrétion de mélatonine se produit toujours durant la nuit que ce soit chez les espèces nocturnes ou bien diurnes. En revanche, ceci n'est pas le cas lorsque l'on considère les autres sorties de l'horloge, comme par exemple le rythme de la Tc. Ainsi, une étude des effets de l'Ago sur l'amplitude des rythmes circadiens devrait être envisagée sur des espèces diurnes, par exemple l'Arvicanthis, afin d'aller plus loin dans nos conclusions sur les effets de l'Ago et de les rapprocher aux effets observés chez l'Homme. De plus, cette étude viendrait appuyer les résultats obtenus dans les travaux de Van Reeth et coll. (1998) où les auteurs rapportent une resynchronisation de l'activité locomotrice suite à l'administration l'Ago chez l'Arvicanthis.

III. Perspectives à plus long terme

Afin de déterminer les effets de l'Ago sur les oscillations de l'horloge, nous avons étudié deux sorties : le rythme de la sécrétion de mélatonine endogène et le rythme de la Tc. De manière parallèle, nous aurions pu également suivre d'autres sorties de l'horloge, notamment le rythme d'activité locomotrice, ce qui apporterait des éléments de réponse complémentaires, particulièrement en ce qui concerne les effets induits par l'Ago sur le rythme de la Tc. De même, nous savons que la sécrétion de corticostérone est également sous le contrôle de l'horloge centrale (Kalsbeek *et al.*, 1996). Afin d'appuyer nos conclusions,

l'étude des effets de l'Ago sur le rythme de la corticostérone, en tant que sortie de l'horloge, serait intéressante à envisager.

De par notre hypothèse de départ, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés au comportement des oscillations de l'horloge centrale. Or, nous savons que la synchronisation des oscillateurs périphériques est importante à prendre en considération afin d'assurer le bon fonctionnement de l'ensemble des tissus au sein de l'organisme. Il serait alors intéressant d'aller explorer les effets induits sur les oscillateurs périphériques (Dibner *et al.*, 2010). Cette étude pourrait être abordée selon une expérience *in vitro*, du même type que celle que nous avons réalisé pour l'expression du gène *Per1* dans les NSC, sur des oscillateurs périphériques présentant des récepteurs MT1/MT2 et 5-HT_{2C} (foie, reins, poumons, fibroblastes, etc.)

En conclusion, les deux approches complémentaires (*in vivo* et *in vitro*), abordées durant ce projet de thèse, ont permis de conclure que l'Ago est capable d'augmenter l'amplitude des oscillations de l'horloge. Pour autant, l'effet synergique attendu des composantes mélatoninergiques et sérotoninergiques de l'Ago n'a pas été démontré dans le cadre de l'augmentation de l'amplitude du rythme de mélatonine endogène mais n'est pas exclu pour le rythme de la Tc *via* une action périphérique. Les nouveaux résultats apportés durant ces travaux ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes d'action de l'Ago.

Références bibliographiques

A

- Agez, L., Laurent, V., Pevet, P., Masson-Pevet, M. & Gauer, F. (2007) Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*, **144**, 522-530.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. & Nishida, E. (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 1693-1703.
- 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., Liou, S.Y., Stopa, E.G. & Zoeller, R.T. (1991) Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J Neurosci*, **11**, 846-851.
- 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.H., Larkin, D., Sun, Z.S. & Lee, C.C. (2001) mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, **16**, 100-104.
- Albus, H., Bonnefont, X., Chaves, I., Yasui, A., Doczy, J., van der Horst, G.T. & Meijer, J.H. (2002) Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol*, **12**, 1130-1133.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D. & Meijer, J.H. (2005) A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol*, **15**, 886-893.
- Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H. & Takahashi, J.S. (1997) Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, **89**, 655-667.
- Arima, H., House, S.B., Gainer, H. & Aguilera, G. (2002) Neuronal activity is required for the circadian rhythm of vasopressin gene transcription in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Endocrinology*, **143**, 4165-4171.
- Armstrong, S.M. (1989) Melatonin and circadian control in mammals. *Experientia*, **45**, 932-938.

- Armstrong, S.M., McNulty, O.M., Guardiola-Lemaitre, B. & Redman, J.R. (1993) Successful use of S20098 and melatonin in an animal model of delayed sleep-phase syndrome (DSPS). *Pharmacol Biochem Behav*, **46**, 45-49.
- Armstrong, S.M. & Redman, J. (1985) Melatonin administration: effects on rodent circadian rhythms. *Ciba Found Symp*, **117**, 188-207.
- Avery, D.H., Shah, S.H., Eder, D.N. & Wildschiodtz, G. (1999) Nocturnal sweating and temperature in depression. *Acta Psychiatr Scand*, **100**, 295-301.
- Azekawa, T., Sano, A., Aoi, K., Sei, H. & Morita, Y. (1990) Concurrent on-line sampling of melatonin in pineal microdialysates from conscious rat and its analysis by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr*, **530**, 47-55.

B

- Bae, K. & Weaver, D.R. (2003) Light-induced phase shifts in mice lacking mPER1 or mPER2. *J Biol Rhythms*, **18**, 123-133.
- Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, **93**, 929-937.
- 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.
- Barassin, S., Saboureau, M., Kalsbeek, A., Bothorel, B., Vivien-Roels, B., Malan, A., Buijs, R.M., Guardiola-Lemaitre, B. & Pevet, P. (1999) Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. *J Pineal Res*, **27**, 193-201.
- Barden, N., Shink, E., Labbe, M., Vacher, R., Rochford, J. & Mocaer, E. (2005) Antidepressant action of agomelatine (S 20098) in a transgenic mouse model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **29**, 908-916.
- Barrett, P., Conway, S. & Morgan, P.J. (2003) Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res*, **35**, 221-230.
- Berton, O. & Nestler, E.J. (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 137-151.
- Boissin, J. & Canguilhem, B. (1998) *Les rythmes du vivant: origine et contrôle des rythmes biologiques*, Paris.
- Boivin, D.B., Czeisler, C.A., Dijk, D.J., Duffy, J.F., Folkard, S., Minors, D.S., Totterdell, P. & Waterhouse, J.M. (1997) Complex interaction of the sleep-wake cycle and circadian phase modulates mood in healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry*, **54**, 145-152.

- Booij, L., Van der Does, A.J.W. & Riedel, W.J. (2003) Monoamine depletion in psychiatric and healthy populations: review. *Molecular Psychiatry*, **8**, 951-973.
- Bothorel, B., Barassin, S., Saboureau, M., Perreau, S., Vivien-Roels, B., Malan, A. & Pevet, P. (2002) In the rat, exogenous melatonin increases the amplitude of pineal melatonin secretion by a direct action on the circadian clock. *Eur J Neurosci*, **16**, 1090-1098.
- Bourin, M., Mocaer, E. & Porsolt, R. (2004) Antidepressant-like activity of S 20098 (agomelatine) in the forced swimming test in rodents: involvement of melatonin and serotonin receptors. *J Psychiatry Neurosci*, **29**, 126-133.
- Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G. & Delagrangé, P. (2005) Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 412-419.
- Brydon, L., Roka, F., Petit, L., de Coppet, P., Tissot, M., Barrett, P., Morgan, P.J., Nanoff, C., Strosberg, A.D. & Jockers, R. (1999) Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*, **13**, 2025-2038.
- Buysse, D.J., Frank, E., Lowe, K.K., Cherry, C.R. & Kupfer, D.J. (1997) Electroencephalographic sleep correlates of episode and vulnerability to recurrence in depression. *Biol Psychiatry*, **41**, 406-418.
- Buysse, D.J., Nofzinger, E.A., Germain, A., Meltzer, C.C., Wood, A., Ombao, H., Kupfer, D.J. & Moore, R.Y. (2004) Regional brain glucose metabolism during morning and evening wakefulness in humans: preliminary findings. *Sleep*, **27**, 1245-1254.

C

- 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.
- Card, J.P., Brecha, N., Karten, H.J. & Moore, R.Y. (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci*, **1**, 1289-1303.
- Cardinali, D.P., Vidal, M.F. & Vigo, D.E. (2012) Agomelatine: Its Role in the Management of Major Depressive Disorder. *Clinical Medicine Insights: Psychiatry*, **4**, 1-23.
- Casper, R.C., Redmond, D.E., Jr., Katz, M.M., Schaffer, C.B., Davis, J.M. & Koslow, S.H. (1985) Somatic symptoms in primary affective disorder. Presence and relationship to the classification of depression. *Arch Gen Psychiatry*, **42**, 1098-1104.
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J. & Armstrong, S.M. (1986) Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiology & Behavior*, **36**, 1111-1121.

- Cassone, V.M. & Natesan, A.K. (1997) Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time. *J Biol Rhythms*, **12**, 489-497.
- Cassone, V.M., Roberts, M.H. & Moore, R.Y. (1988) Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-¹⁴C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol*, **255**, R332-337.
- 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.
- Chagraoui, A., Protais, P., Filloux, T. & Mocaer, E. (2003) Agomelatine(S 20098) antagonizes the penile erections induced by the stimulation of 5-HT_{2C} receptors in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **170**, 17-22.
- Challet, E., Malan, A. & Pevet, P. (1996) Daily hypocaloric feeding entrains circadian rhythms of wheel-running and body temperature in rats kept in constant darkness. *Neurosci Lett*, **211**, 1-4.
- Challet, E. & Pévet, P. (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci*, **8**, s246-257.
- Chen, D., Buchanan, G.F., Ding, J.M., Hannibal, J. & Gillette, M.U. (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 13468-13473.
- Cheng, M.Y., 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.
- Chesworth, M.J., Cassone, V.M. & Armstrong, S.M. (1987) Effects of daily melatonin injections on activity rhythms of rats in constant light. *Am J Physiol*, **253**, R101-107.
- Claustrat, B., Brun, J., David, M., Sassolas, G. & Chazot, G. (1992) Melatonin and jet lag: confirmatory result using a simplified protocol. *Biol Psychiatry*, **32**, 705-711.
- Claustrat, B., Chazot, G., Brun, J., Jordan, D. & Sassolas, G. (1984) A chronobiological study of melatonin and cortisol secretion in depressed subjects: plasma melatonin, a biochemical marker in major depression. *Biol Psychiatry*, **19**, 1215-1228.
- 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.
- Crasson, M., Kjiri, S., Colin, A., Kjiri, K., L'Hermite-Baleriaux, M., Ansseau, M. & Legros, J.J. (2004) Serum melatonin and urinary 6-sulfatoxymelatonin in major depression. *Psychoneuroendocrinology*, **29**, 1-12.
- Cuesta, M., Clesse, D., Pevet, P. & Challet, E. (2009) New light on the serotonergic paradox in the rat circadian system. *J Neurochem*, **110**, 231-243.

Cui, L.N., Coderre, E. & Renaud, L.P. (2001) Glutamate and GABA mediate suprachiasmatic nucleus inputs to spinal-projecting paraventricular neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **281**, R1283-1289.

D

Dardente, H. & Cermakian, N. (2005) [How many pieces to build a circadian clock?]. *Med Sci (Paris)*, **21**, 66-72.

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

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

de Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaër, E., Renard, P., Muñoz, C. & Millan, M.J. (2010) Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat Rev Drug Discov*, **9**, 628-642.

de la Iglesia, H.O., Meyer, J., Carpino, A., Jr. & Schwartz, W.J. (2000) Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science*, **290**, 799-801.

Dekeyne, A., Mannoury la Cour, C., Gobert, A., Brocco, M., Lejeune, F., Serres, F., Sharp, T., Daszuta, A., Soumier, A., Papp, M., Rivet, J.M., Flik, G., Cremers, T.I., Müller, O., Lavielle, G. & Millan, M.J. (2008) S32006, a novel 5-HT_{2C} receptor antagonist displaying broad-based antidepressant and anxiolytic properties in rodent models. *Psychopharmacology (Berl)*, **199**, 549-568.

deVries, M.W. & Peeters, F.P. (1997) Melatonin as a therapeutic agent in the treatment of sleep disturbance in depression. *J Nerv Ment Dis*, **185**, 201-202.

Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, **72**, 517-549.

Dolberg, O.T., Hirschmann, S. & Grunhaus, L. (1998) Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder. *Am J Psychiatry*, **155**, 1119-1121.

Drijfhout, W.J., Grol, C.J. & Westerink, B.H. (1993) Microdialysis of melatonin in the rat pineal gland: methodology and pharmacological applications. *J Neurochem*, **61**, 936-942.

Dubocovich, M.L., Rivera-Bermudez, M.A., Gerdin, M.J. & Masana, M.I. (2003) Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*, **8**, d1093-1108.

F

- Falcon, J. (1999) Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol*, **58**, 121-162.
- Fava, M., McCall, W.V., Krystal, A., Wessel, T., Rubens, R., Caron, J., Amato, D. & Roth, T. (2006) Eszopiclone Co-Administered With Fluoxetine in Patients With Insomnia Coexisting With Major Depressive Disorder. *Biological Psychiatry*, **59**, 1052-1060.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M. & Hastings, M.H. (2000) Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, **25**, 437-447.
- Fournier, I., Ploye, F., Cottet-Emard, J.M., Brun, J. & Claustrat, B. (2002) Folate deficiency alters melatonin secretion in rats. *J Nutr*, **132**, 2781-2784.
- Frank, E., Hlastala, S., Ritenour, A., Houck, P., Tu, X.M., Monk, T.H., Mallinger, A.G. & Kupfer, D.J. (1997) Inducing lifestyle regularity in recovering bipolar disorder patients: results from the maintenance therapies in bipolar disorder protocol. *Biol Psychiatry*, **41**, 1165-1173.
- Fukuhara, C., Brewer, J.M., Dirden, J.C., Bittman, E.L., Tosini, G. & Harrington, M.E. (2001) Neuropeptide Y rapidly reduces Period 1 and Period 2 mRNA levels in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, **314**, 119-122.

G

- Gauer, F., Masson-Pevet, M., Stehle, J. & Pevet, P. (1994) Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res*, **641**, 92-98.
- Gauer, F., Schuster, C., Poirel, V.J., Pevet, P. & Masson-Pevet, M. (1998) Cloning experiments and developmental expression of both melatonin receptor Mel1A mRNA and melatonin binding sites in the Syrian hamster suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Mol Brain Res*, **60**, 193-202.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. & Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-1569.
- Gervasoni, N., Bertschy, G., Osiek, C., Perret, G., Denis, R., Golaz, J., Rossier, M.F., Bondolfi, G. & Aubry, J.M. (2004) Cortisol responses to combined dexamethasone/CRH test in outpatients with a major depressive episode. *J Psychiatr Res*, **38**, 553-557.

- Gibbs, F.P. & Vriend, J. (1981) The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology*, **109**, 1796-1798.
- Giles, D.E., Jarrett, R.B., Roffwarg, H.P. & Rush, A.J. (1987) Reduced rapid eye movement latency. A predictor of recurrence in depression. *Neuropsychopharmacology*, **1**, 33-39.
- Godson, C. & Reppert, S.M. (1997) The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology*, **138**, 397-404.
- Golden, R.N., Gaynes, B.N., Ekstrom, R.D., Hamer, R.M., Jacobsen, F.M., Suppes, T., Wisner, K.L. & Nemeroff, C.B. (2005) The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence. *Am J Psychiatry*, **162**, 656-662.
- Goodwin, G.M., Emsley, R., Rembry, S. & Rouillon, F. (2009) Agomelatine prevents relapse in patients with major depressive disorder without evidence of a discontinuation syndrome: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*, **70**, 1128-1137.
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E. & Saper, C.B. (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*, **4**, 1165.
- Gooley, J.J., Lu, J., Fischer, D. & Saper, C.B. (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci*, **23**, 7093-7106.
- Gordijn, M.C., Beersma, D.G., Bouhuys, A.L., Reinink, E. & Van den Hoofdakker, R.H. (1994) A longitudinal study of diurnal mood variation in depression; characteristics and significance. *J Affect Disord*, **31**, 261-273.
- Graff, C., Challet, E., PÅ©vet, P. & Wollnik, F. (2007) 5-HT₃ receptor-mediated photic-like responses of the circadian clock in the rat. *Neuropharmacology*, **52**, 662-671.
- Graff, C., Kohler, M., PÅ©vet, P. & Wollnik, F. (2005) Involvement of the retinohypothalamic tract in the photic-like effects of the serotonin agonist quipazine in the rat. *Neuroscience*, **135**, 273-283.
- Green, D.J. & Gillette, R. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res*, **245**, 198-200.
- Groos, G. & Hendriks, J. (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett*, **34**, 283-288.
- Grosse, J. & Davis, F.C. (1998) Melatonin entrains the restored circadian activity rhythms of syrian hamsters bearing fetal suprachiasmatic nucleus grafts. *J Neurosci*, **18**, 8032-8037.
- Grosse, J., Velickovic, A. & Davis, F.C. (1996) Entrainment of Syrian hamster circadian activity rhythms by neonatal melatonin injections. *Am J Physiol*, **270**, R533-540.

- Guardiola-Lemaitre, B. (2005) [Melatonergic receptor agonists and antagonists: pharmacological aspects and therapeutic perspective]. *Ann Pharm Fr*, **63**, 385-400.
- Gunduz, B. & Stetson, M.H. (2001) A test of the coincidence and duration models of melatonin action in Siberian hamsters: the effects of 1-hr melatonin infusions on testicular development in intact and pinealectomized prepubertal *Phodopus sungorus*. *J Pineal Res*, **30**, 97-107.
- Guo, H., Brewer, J.M., Lehman, M.N. & Bittman, E.L. (2006) Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J Neurosci*, **26**, 6406-6412.

H

- Hack, L.M., Lockley, S.W., Arendt, J. & Skene, D.J. (2003) The effects of low-dose 0.5-mg melatonin on the free-running circadian rhythms of blind subjects. *J Biol Rhythms*, **18**, 420-429.
- Haffen, E. & Sechter, D. (2006) Perturbations des rythmes biologiques et troubles de l'humeur. *L'Encéphale*, **32**, 795-801.
- Haimov, I. & Arendt, J. (1999) The prevention and treatment of jet lag. *Sleep Med Rev*, **3**, 229-240.
- Hamada, T., Antle, M.C. & Silver, R. (2004) The role of Period1 in non-photic resetting of the hamster circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, **362**, 87-90.
- Hamada, T., Yamanouchi, S., Watanabe, A., Shibata, S. & Watanabe, S. (1999) Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythm in vitro. *Brain Res*, **836**, 190-193.
- Hannibal, J. (2002) Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*, **309**, 73-88.
- Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.C., Kelly, J.S., Maywood, E.S. & Hastings, M.H. (2002) The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, **109**, 497-508.
- Harrington, M.E. & Rusak, B. (1986) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, **1**, 309-325.
- Harrington, M.E. & Rusak, B. (1991) Luminance coding properties of intergeniculate leaflet neurons in the golden hamster and the effects of chronic clorgyline. *Brain Res*, **554**, 95-104.

- Harvey, A.G. (2011) Sleep and Circadian Functioning: Critical Mechanisms in the Mood Disorders? *Annual Review of Clinical Psychology*, **7**, 297-319.
- Hastings, M.H., Field, M.D., Maywood, E.S., Weaver, D.R. & Reppert, S.M. (1999) Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci*, **19**, RC11.
- Hastings, M.H., Mead, S.M., Vindlacheruvu, R.R., Ebling, F.J., Maywood, E.S. & Grosse, J. (1992) Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res*, **591**, 20-26.
- 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.
- Hermes, M.L., Coderre, E.M., Buijs, R.M. & Renaud, L.P. (1996) GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol*, **496 (Pt 3)**, 749-757.
- Herwig, A., Pevet, P., Bothorel, B., Steinlechner, S. & Saboureau, M. (2006) Trans-pineal microdialysis in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*): a tool to study seasonal changes of circadian clock activities. *J Pineal Res*, **40**, 177-183.
- Herzog, E.D., Grace, M.S., Harrer, C., Williamson, J., Shinohara, K. & Block, G.D. (2000) The role of Clock in the developmental expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol*, **424**, 86-98.
- Herzog, E.D., Takahashi, J.S. & Block, G.D. (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci*, **1**, 708-713.
- Hindmarch, I. (2002) Beyond the monoamine hypothesis: mechanisms, molecules and methods. *Eur Psychiatry*, **17 Suppl 3**, 294-299.
- Hirata, F. & Hayaishi, O. (1972) New degradative routes of 5-hydroxytryptophan and serotonin by intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **47**, 1112-1119.
- 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.
- Honma, S., Ikeda, M., Abe, H., Tanahashi, Y., Namihira, M., Honma, K. & Nomura, M. (1998) Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun*, **250**, 83-87.
- Honma, S., Shirakawa, T., Nakamura, W. & Honma, K. (2000) Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neurosci Lett*, **294**, 113-116.

Hughes, A.T., Fahey, B., Cutler, D.J., Coogan, A.N. & Piggins, H.D. (2004) Aberrant gating of photic input to the suprachiasmatic circadian pacemaker of mice lacking the VPAC2 receptor. *J Neurosci*, **24**, 3522-3526.

I

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

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

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

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

J

Jackson, F.R. (2011) Glial cell modulation of circadian rhythms. *Glia*, **59**, 1341-1350.

Jacob, N., Vuillez, P., Lakdhar-Ghazal, N. & PÅ©vet, P. (1999) Does the intergeniculate leaflet play a role in the integration of the photoperiod by the suprachiasmatic nucleus? *Brain Research*, **828**, 83-90.

Jauhar, P. & Weller, M.P. (1982) Psychiatric morbidity and time zone changes: a study of patients from Heathrow airport. *Br J Psychiatry*, **140**, 231-235.

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.

Johnson, M.S. (1939) Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (*Peromyscus*). *Journal of Experimental Zoology*, **82**, 315-328.

Johnson, R.F., Moore, R.Y. & Morin, L.P. (1988) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res*, **460**, 297-313.

K

- 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.
- 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., Cutrera, R.A., Van Heerikhuize, J.J., Van Der Vliet, J. & Buijs, R.M. (1999) GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience*, **91**, 453-461.
- Kalsbeek, A., van der Vliet, J. & Buijs, R.M. (1996) Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol*, **8**, 299-307.
- Karatsoreos, I.N., Yan, L., LeSauter, J. & Silver, R. (2004) Phenotype matters: identification of light-responsive cells in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, **24**, 68-75.
- Kennaway, D.J. & Moyer, R.W. (1998) Serotonin 5-HT_{2c} agonists mimic the effect of light pulses on circadian rhythms. *Brain Res*, **806**, 257-270.
- Kennaway, D.J., Moyer, R.W., Voultsios, A. & Varcoe, T.J. (2001) Serotonin, excitatory amino acids and the photic control of melatonin rhythms and SCN c-FOS in the rat. *Brain Res*, **897**, 36-43.
- Kennedy, S.H. (2009) Agomelatine: efficacy at each phase of antidepressant treatment. *CNS Drugs*, **23 Suppl 2**, 41-47.
- Kennedy, S.H. & Emsley, R. (2006) Placebo-controlled trial of agomelatine in the treatment of major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*, **16**, 93-100.
- Kessler, R.C., Chiu, W.T., Demler, O., Merikangas, K.R. & Walters, E.E. (2005) Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, **62**, 617-627.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. & Takahashi, J.S. (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, **89**, 641-653.
- Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Begay, V., Falcon, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M. & Baler, R. (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res*, **52**, 307-357; discussion 357-308.

- Klein, D.C. & Weller, J. (1970) Input and output signals in a model neural system: the regulation of melatonin production in the pineal gland. *In Vitro*, **6**, 197-204.
- Knowles, J.B., Cairns, J., MacLean, A.W., Delva, N., Prowse, A., Waldron, J. & Letemendia, F.J. (1986) The sleep of remitted bipolar depressives: comparison with sex and age-matched controls. *Can J Psychiatry*, **31**, 295-298.
- Ko, C.H. & Takahashi, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, **15 Spec No 2**, R271-277.
- Konopka, R.J. & Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2112-2116.
- Kopin, I.J., Pare, C.M., Axelrod, J. & Weissbach, H. (1961) The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem*, **236**, 3072-3075.
- Koresh, O., Kozlovsky, N., Kaplan, Z., Zohar, J., Matar, M.A. & Cohen, H. (2011) The long-term abnormalities in circadian expression of Period 1 and Period 2 genes in response to stress is normalized by agomelatine administered immediately after exposure. *Eur Neuropsychopharmacol*.
- 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.
- Krauchi, K., Cajochen, C., Mori, D., Graw, P. & Wirz-Justice, A. (1997) Early evening melatonin and S-20098 advance circadian phase and nocturnal regulation of core body temperature. *Am J Physiol*, **272**, R1178-1188.
- Kripke, D.F., Mullaney, D.J., Atkinson, M. & Wolf, S. (1978) Circadian rhythm disorders in manic-depressives. *Biol Psychiatry*, **13**, 335-351.
- 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.
- Kupfer, D.J., Frank, E., McEachran, A.B. & Grochocinski, V.J. (1990) Delta sleep ratio. A biological correlate of early recurrence in unipolar affective disorder. *Arch Gen Psychiatry*, **47**, 1100-1105.

L

- Lam, R.W., Terman, M. & Wirz-Justice, A. (1997) Light therapy for depressive disorders: indications and efficacy. *Mod Probl Pharmacopsychiatry*, **25**, 215-234.

- Leak, R.K. & Moore, R.Y. (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol*, **433**, 312-334.
- Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S. & Reppert, S.M. (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, **107**, 855-867.
- Lemoine, P., Guilleminault, C. & Alvarez, E. (2007) Improvement in subjective sleep in major depressive disorder with a novel antidepressant, agomelatine: randomized, double-blind comparison with venlafaxine. *J Clin Psychiatry*, **68**, 1723-1732.
- Leproult, R., Van Onderbergen, A., L'Hermite-Baleriaux, M., Van Cauter, E. & Copinschi, G. (2005) Phase-shifts of 24-h rhythms of hormonal release and body temperature following early evening administration of the melatonin agonist agomelatine in healthy older men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **63**, 298-304.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. & Mori, W. (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc*, **80**, 2587.
- Lewy, A.J., Ahmed, S., Jackson, J.M. & Sack, R.L. (1992) Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int*, **9**, 380-392.
- Liu, C. & Reppert, S.M. (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, **25**, 123-128.
- Liu, C., Weaver, D.R., Strogatz, S.H. & Reppert, S.M. (1997) Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*, **91**, 855-860.
- Lockley, S.W., Skene, D.J., James, K., Thapan, K., Wright, J. & Arendt, J. (2000) Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *J Endocrinol*, **164**, R1-6.
- Long, M.A., Jutras, M.J., Connors, B.W. & Burwell, R.D. (2005) Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci*, **8**, 61-66.
- Loo, H., Dalery, J., Macher, J.P. & Payen, A. (2003) [Pilot study comparing in blind the therapeutic effect of two doses of agomelatine, melatonin- agonist and selective 5HT_{2c} receptors antagonist, in the treatment of major depressive disorders]. *Encephale*, **29**, 165-171.
- Loo, H., Hale, A. & D'Haenen, H. (2002) Determination of the dose of agomelatine, a melatonergic agonist and selective 5-HT_{2C} antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study. *Int Clin Psychopharmacol*, **17**, 239-247.
- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M. & Takahashi, J.S. (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, **288**, 483-492.

M

- Malek, Z.S., PÃ©vet, P. & Raison, S. (2004) Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience*, **125**, 749-758.
- Mallo, C., Zaidan, R., Faure, A., Brun, J., Chazot, G. & Claustrat, B. (1988) Effects of a four-day nocturnal melatonin treatment on the 24 h plasma melatonin, cortisol and prolactin profiles in humans. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **119**, 474-480.
- 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. & Mistlberger, R.E. (1997) Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res*, **765**, 273-282.
- Martinet, L., Guardiola-Lemaitre, B. & Mocaer, E. (1996) Entrainment of circadian rhythms by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacol Biochem Behav*, **54**, 713-718.
- Masson-PÃ©vet, 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.
- Maywood, E.S., Bittman, E.L., Ebling, F.J., Barrett, P., Morgan, P. & Hastings, M.H. (1995) Regional distribution of iodomelatonin binding sites within the suprachiasmatic nucleus of the Syrian hamster and the Siberian hamster. *J Neuroendocrinol*, **7**, 215-223.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 15211-15216.
- 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.
- Maywood, E.S., O'Neill, J.S., Chesham, J.E. & Hastings, M.H. (2007) Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei--analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology*, **148**, 5624-5634.
- McCord, C.P. & Allen, F.P. (1917) Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *Journal of Experimental Zoology*, **23**, 207-224.
- Meijer, J.H., Albus, H., Weidema, F. & Ravesloot, J.H. (1993) The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Res*, **603**, 284-288.

- Meijer, J.H., Rusak, B. & Ganshirt, G. (1992) The relation between light-induced discharge in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts of hamster circadian rhythms. *Brain Res*, **598**, 257-263.
- Meijer, J.H., Watanabe, K., Schaap, J., Albus, H. & Detari, L. (1998) Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus: long-term multiunit and single-unit recordings in freely moving rats. *J Neurosci*, **18**, 9078-9087.
- Mendlewicz, J. (2009) Sleep disturbances: Core symptoms of major depressive disorder rather than associated or comorbid disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry*, **10**, 269-275.
- Mendlewicz, J., Van Cauter, E., Linkowski, P., L'Hermite, M. & Robyn, C. (1980) Current concepts: I. The 24-hour profile of prolactin in depression. *Life Sci*, **27**, 2015-2024.
- 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., Ross, A.W., Barrett, P. & Morgan, P.J. (1999) Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9938-9943.
- 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.
- Millan, M.J., Brocco, M., Gobert, A. & Dekeyne, A. (2005) Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5-HT_{2C} receptor blockade. *Psychopharmacology (Berl)*, **177**, 448-458.
- Millan, M.J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Rivet, J.M. & Cussac, D. (2003) The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, **306**, 954-964.
- Mintz, E.M. & Albers, H.E. (1997) Microinjection of NMDA into the SCN region mimics the phase shifting effect of light in hamsters. *Brain Res*, **758**, 245-249.
- Mistlberger, R.E. (1994) Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, **18**, 171-195.
- Moga, M.M. & Moore, R.Y. (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, **389**, 508-534.
- Moller, M. & Baeres, F.M. (2002) The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res*, **309**, 139-150.

- Moller, M. & Korf, H.W. (1983) Central innervation of the pineal organ of the Mongolian gerbil. A histochemical and lesion study. *Cell Tissue Res*, **230**, 259-272.
- Moller, M. & Liu, W. (1999) Innervation of the rat pineal gland by nerve fibres originating in the sphenopalatine, otic and trigeminal ganglia. A retrograde in vivo neuronal tracing study. *Reprod Nutr Dev*, **39**, 345-353.
- Monteleone, P., Martiadis, V. & Maj, M. (2011) Circadian rhythms and treatment implications in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **35**, 1569-1574.
- Moore, R.Y. (1983) Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc*, **42**, 2783-2789.
- Moore, R.Y. (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res*, **111**, 103-119.
- Moore, R.Y. & Card, J.P. (1994) Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J Comp Neurol*, **344**, 403-430.
- Moore, R.Y. & Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, **42**, 201-206.
- Moore, R.Y. & Speh, J.C. (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters*, **150**, 112-116.
- Moore, R.Y., Speh, J.C. & Leak, R.K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, **309**, 89-98.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E. & Helliwell, R. (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*, **24**, 101-146.
- Morgan, P.J. & Hazlerigg, D.G. (2008) Photoperiodic signalling through the melatonin receptor turns full circle. *J Neuroendocrinol*, **20**, 820-826.
- Morin, A., Denoroy, L. & Jouvet, M. (1991) Daily variations in concentration of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in discrete brain areas of the rat. *Brain Res*, **538**, 136-140.
- Morin, L.P., Shivers, K.Y., Blanchard, J.H. & Muscat, L. (2006) Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **137**, 1285-1297.
- Moyer, R.W. & Kennaway, D.J. (1999) Immunohistochemical localization of serotonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, **271**, 147-150.
- Murray, G. (2007) Diurnal mood variation in depression: a signal of disturbed circadian function? *J Affect Disord*, **102**, 47-53.

N

- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F. & Schibler, U. (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, **119**, 693-705.
- Nelson, C.S., Marino, J.L. & Allen, C.N. (1996) Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport*, **7**, 717-720.
- Nelson, D.E. & Takahashi, J.S. (1991) Comparison of visual sensitivity for suppression of pineal melatonin and circadian phase-shifting in the golden hamster. *Brain Res*, **554**, 272-277.
- Niles, L.P. & Hashemi, F. (1990) Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus. *Cell Mol Neurobiol*, **10**, 553-558.
- Norman, T.R., Cranston, I., Irons, J.A., Gabriel, C., Dekeyne, A., Millan, M.J. & Mocaer, E. (2012) Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats: a comparison to melatonin and to the 5-HT(2c) antagonist, S32006. *Eur J Pharmacol*, **674**, 27-32.
- Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrangé, P., Canet, E. & Boutin, J.A. (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, **275**, 31311-31317.

O

- Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J.H. & van der Horst, G.T. (1999) Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science*, **286**, 2531-2534.
- Olie, J.P. & Kasper, S. (2007) Efficacy of agomelatine, a MT1/MT2 receptor agonist with 5-HT2C antagonistic properties, in major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, **10**, 661-673.

P

- 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.
- Pando, M.P., Morse, D., Cermakian, N. & Sassone-Corsi, P. (2002) Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. *Cell*, **110**, 107-117.

- Papp, M., Gruca, P., Boyer, P.A. & Mocaer, E. (2003) Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 694-703.
- Papp, M., Litwa, E., Gruca, P. & Mocaer, E. (2006) Anxiolytic-like activity of agomelatine and melatonin in three animal models of anxiety. *Behav Pharmacol*, **17**, 9-18.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1982) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic press, New York.
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Pevet, P. & Buijs, R.M. (2004) Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci*, **19**, 318-324.
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Van Der Vliet, J., Pévet, P. & Buijs, R.M. (2005) In vivo evidence for a controlled offset of melatonin synthesis at dawn by the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neuroscience*, **130**, 797-803.
- Pévet, P. (2003) Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J Neuroendocrinol*, **15**, 422-426.
- Pévet, P., Agez, L., Bothorel, B., Saboureau, M., Gauer, F., Laurent, V. & Masson-Pévet, M. (2006) Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int*, **23**, 39-51.
- Pévet, P., Bothorel, B., Sloten, H. & Saboureau, M. (2002) The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res*, **309**, 183-191.
- Pévet, P. & Challet, E. (2011) Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J Physiol Paris*, **105**, 170-182.
- Pickard, G.E., Ralph, M.R. & Menaker, M. (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, **2**, 35-56.
- Pickard, G.E. & Rea, M.A. (1997) Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biology of the Cell*, **89**, 513-523.
- 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.
- Poirel, V.J., Boggio, V., Dardente, H., Pevet, P., Masson-Pévet, M. & Gauer, F. (2003) Contrary to other non-photoc cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience*, **120**, 745-755.
- 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., Miller, J.D. & Heller, H.C. (1990) A serotonin agonist phase-shifts the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Brain Res*, **534**, 336-339.

Q

Quintero, J.E., Kuhlman, S.J. & McMahon, D.G. (2003) The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J Neurosci*, **23**, 8070-8076.

R

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

Reagan-Shaw, S., Nihal, M. & Ahmad, N. (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*, **22**, 659-661.

Redman, J., Armstrong, S. & Ng, K.T. (1983) Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science*, **219**, 1089-1091.

Redman, J.R. & Armstrong, S.M. (1988) Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin. *J Pineal Res*, **5**, 203-215.

Redman, J.R. & Francis, A.J. (1998) Entrainment of rat circadian rhythms by the melatonin agonist S-20098 requires intact suprachiasmatic nuclei but not the pineal. *J Biol Rhythms*, **13**, 39-51.

Redman, J.R., Guardiola-Lemaitre, B., Brown, M., Delagrangé, P. & Armstrong, S.M. (1995) Dose dependent effects of S-20098, a melatonin agonist, on direction of re-entrainment of rat circadian activity rhythms. *Psychopharmacology (Berl)*, **118**, 385-390.

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.

Reinberg, A.E. & Ashkenazi, I.E. (1993) Interindividual differences in chronopharmacologic effects of drugs: a background for individualization of chronotherapy. *Chronobiol Int*, **10**, 449-460.

Reiter, R.J. (1993) The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, **49**, 654-664.

Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slangenaupt, S.A. & Gusella, J.F. (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human

- retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8734-8738.
- Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-941.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Ebisawa, T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, **13**, 1177-1185.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Godson, C. (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*, **17**, 100-102.
- 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.
- Ribelayga, C., Pevet, P. & Simonneaux, V. (2000) HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **278**, R1339-1345.
- Richter, C.P. (1967) Sleep and activity: their relation to the 24-hour clock. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, **45**, 8-29.
- Riedel, W.J., Klaassen, T., Griez, E., Honig, A., Menheere, P.P. & van Praag, H.M. (2002) Dissociable hormonal, cognitive and mood responses to neuroendocrine challenge: evidence for receptor-specific serotonergic dysregulation in depressed mood. *Neuropsychopharmacology*, **26**, 358-367.
- Riemann, D., Berger, M. & Voderholzer, U. (2001) Sleep and depression--results from psychobiological studies: an overview. *Biol Psychol*, **57**, 67-103.
- Ritzenthaler, T., Nighoghossian, N., Berthiller, J., Schott, A.M., Cho, T.H., Derex, L., Brun, J., Trouillas, P. & Claustrat, B. (2009) Nocturnal urine melatonin and 6-sulphatoxymelatonin excretion at the acute stage of ischaemic stroke. *J Pineal Res*, **46**, 349-352.
- Rollag, M.D., Berson, D.M. & Provencio, I. (2003) Melanopsin, ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms*, **18**, 227-234.
- Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C. & O'Hara, B.F. (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, **298**, 2211-2213.
- Rusak, B. & Yu, G.D. (1993) Regulation of melatonin-sensitivity and firing-rate rhythms of hamster suprachiasmatic nucleus neurons: pinealectomy effects. *Brain Res*, **602**, 200-204.

S

- Sakkas, P.N., Soldatos, C.R., Bergiannaki, J.D., Paparrigopoulos, T.J. & Stefanis, C.N. (1998) Growth hormone secretion during sleep in male depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **22**, 467-483.
- Sandu, C., Dumas, M., Malan, A., Sambakhe, D., Marteau, C., Nizard, C., Schnebert, S., Perrier, E., Challet, E., Pevet, P. & Felder-Schmittbuhl, M.P. (2012) Human skin keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts contain distinct circadian clock machineries. *Cell Mol Life Sci*, **69**, 3329-3339.
- 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.
- 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.
- Shaffery, J., Hoffmann, R. & Armitage, R. (2003) The neurobiology of depression: perspectives from animal and human sleep studies. *Neuroscientist*, **9**, 82-98.
- 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.
- 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.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. & Hattori, K. (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res*, **247**, 154-158.
- Shibata, S., Watanabe, A., Hamada, T., Ono, M. & Watanabe, S. (1994) N-methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN in vitro. *Am J Physiol*, **267**, R360-364.
- 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.
- Shinohara, K., Tominaga, K., Isobe, Y. & Inouye, S.T. (1993) Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the suprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide, gastrin-releasing peptide, and neuropeptide Y. *J Neurosci*, **13**, 793-800.

- Shiotani, Y., Yamano, M., Shiosaka, S., Emson, P.C., Hillyard, C.J., Girgis, S. & MacIntyre, I. (1986) Distribution and origins of substance P (SP)-, calcitonin gene-related peptide (CGRP)-, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)- and neuropeptide Y (NPY)-containing nerve fibers in the pineal gland of gerbils. *Neurosci Lett*, **70**, 187-192.
- Siegrist, C., Benedetti, C., Orlando, A., Beltran, J.M., Tuchscher, L., Nosedà, C.M., Brusco, L.I. & Cardinali, D.P. (2001) Lack of changes in serum prolactin, FSH, TSH, and estradiol after melatonin treatment in doses that improve sleep and reduce benzodiazepine consumption in sleep-disturbed, middle-aged, and elderly patients. *J Pineal Res*, **30**, 34-42.
- 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.
- 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.
- Slotten, H., Pitrosky, B. & Pevet, P. (1999) Entrainment of rat circadian rhythms by daily administration of melatonin. Influence of the mode of administration. *Adv Exp Med Biol*, **460**, 279-281.
- Slotten, H.A., Krekling, S., Sicard, B. & Pevet, P. (2002) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent *Arvicanthis ansorgei*. *Behav Brain Res*, **133**, 11-19.
- Souetre, E., Salvati, E., Belugou, J.L., Pringuey, D., Candito, M., Krebs, B., Ardisson, J.L. & Darcourt, G. (1989) Circadian rhythms in depression and recovery: evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry Res*, **28**, 263-278.
- Souetre, E., Salvati, E., Wehr, T.A., Sack, D.A., Krebs, B. & Darcourt, G. (1988) Twenty-four-hour profiles of body temperature and plasma TSH in bipolar patients during depression and during remission and in normal control subjects. *Am J Psychiatry*, **145**, 1133-1137.
- Srinivasan, V., Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Spence, D.W., Hardeland, R., Poeggeler, B. & Cardinali, D.P. (2009) Pathophysiology of depression: role of sleep and the melatonergic system. *Psychiatry Res*, **165**, 201-214.
- Stehle, J., Vanecek, J. & Vollrath, L. (1989) Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm*, **78**, 173-177.
- Stehle, J.H., von Gall, C. & Korf, H.W. (2002) Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res*, **309**, 173-182.

- 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.
- Strassman, R.J., Qualls, C.R., Lisansky, E.J. & Peake, G.T. (1991) Elevated Rectal Temperature Produced by All-Night Bright Light Is Reversed by Melatonin Infusion in Men. *Journal of Applied Physiology*, **71**, 2178-2182.
- Sumova, A. & Illnerova, H. (2005) Effect of photic stimuli disturbing overt circadian rhythms on the dorsomedial and ventrolateral SCN rhythmicity. *Brain Res*, **1048**, 161-169.
- Svestka, J. (2008) Sleep deprivation therapy. *Neuro Endocrinol Lett*, **29 Suppl 1**, 65-92.

T

- Takahashi, Y., Okamura, H., Yanaihara, N., Hamada, S., Fujita, S. & Ibata, Y. (1989) Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. *Brain Res*, **497**, 374-377.
- Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N. & Okamura, H. (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, **3**, 167-176.
- 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.
- Tardito, D., Milanese, M., Bonifacino, T., Musazzi, L., Grilli, M., Mallei, A., Mocaer, E., Gabriel-Gracia, C., Racagni, G., Popoli, M. & Bonanno, G. (2010) Blockade of stress-induced increase of glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex by agomelatine involves synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptor-dependent pathways. *BMC Neurosci*, **11**, 68.
- Thompson, C., Franey, C., Arendt, J. & Checkley, S.A. (1988) A comparison of melatonin secretion in depressed patients and normal subjects. *Br J Psychiatry*, **152**, 260-265.
- 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.
- Tolle, R. & Goetze, U. (1987) On the daily rhythm of depression symptomatology. *Psychopathology*, **20**, 237-249.
- Tominaga, K., Shinohara, K., Otori, Y., Fukuhara, C. & Inouye, S.T. (1992) Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport*, **3**, 809-812.

Toutou, Y. & Haus, E. (1994) *Biological rhythms in clinical and laboratory medicine*. SPRINGER-VERLAG Berlin.

Tsuno, N., Besset, A. & Ritchie, K. (2005) Sleep and depression. *J Clin Psychiatry*, **66**, 1254-1269.

Turek, F.W. (1989) Effects of stimulated physical activity on the circadian pacemaker of vertebrates. *J Biol Rhythms*, **4**, 135-147.

U

Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Ino, M., Shigeyoshi, Y. & Hashimoto, S. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, **418**, 534-539.

Underwood, H. & Goldman, B.D. (1987) Vertebrate circadian and photoperiodic systems: role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms*, **2**, 279-315.

V

Van Cauter, E., Leproult, R. & Kupfer, D.J. (1996) Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 2468-2473.

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

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

Van den Top, M., Buijs, R.M., Ruijter, J.M., Delagrange, P., Spanswick, D. & Hermes, M.L.H.J. (2001) Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic nucleus neurones in vitro independent of their circadian rhythm. *Neuroscience*, **107**, 99-108.

van der Helm-van Mil, A.H.M., van Someren, E.J.W., van den Boom, R., van Buchem, M.A., de Craen, A.J.M. & Blauw, G.J. (2003) No influence of melatonin on cerebral blood flow in humans. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **88**, 5989-5994.

Van Reeth, O., Olivares, E., Turek, F.W., Granjon, L. & Mocaer, E. (1998) Resynchronisation of a diurnal rodent circadian clock accelerated by a melatonin agonist. *Neuroreport*, **9**, 1901-1905.

- Van Reeth, O., Olivares, E., Zhang, Y., Zee, P.C., Mocaer, E., DeFrance, R. & Turek, F.W. (1997) Comparative effects of a melatonin agonist on the circadian system in mice and Syrian hamsters. *Brain Res*, **762**, 185-194.
- Van Reeth, O. & Turek, F.W. (1989) Administering triazolam on a circadian basis entrains the activity rhythm of hamsters. *Am J Physiol*, **256**, R639-645.
- Van Reeth, O., Weibel, L., Olivares, E., Maccari, S., Mocaer, E. & Turek, F.W. (2001) Melatonin or a melatonin agonist corrects age-related changes in circadian response to environmental stimulus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280**, R1582-1591.
- Vanecek, J., Pavlik, A. & Illnerova, H. (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*, **435**, 359-362.
- Varcoe, T.J. & Kennaway, D.J. (2008) Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces Per1 gene expression in the rat SCN in vitro. *Brain Res*, **1209**, 19-28.
- 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.
- von Gall, C., Stehle, J.H. & Weaver, D.R. (2002) Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res*, **309**, 151-162.

W

- 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.
- Watts, A.G. & Swanson, L.W. (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol*, **258**, 230-252.
- Watts, A.G., Swanson, L.W. & Sanchez-Watts, G. (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol*, **258**, 204-229.
- Weaver, D.R. (1999) The roles of melatonin in development. *Adv Exp Med Biol*, **460**, 199-214.
- Wehr, T.A., Muscettola, G. & Goodwin, F.K. (1980) Urinary 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol circadian rhythm. Early timing (phase-advance) in manic-depressives compared with normal subjects. *Arch Gen Psychiatry*, **37**, 257-263.

- Weibel, L., Rettori, M.C., Lesieur, D., Delagrangé, P., Renard, P. & Van Reeth, O. (1999) A single oral dose of S 22153, a melatonin antagonist, blocks the phase advancing effects of melatonin in C3H mice. *Brain Res*, **829**, 160-166.
- 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.
- Welsh, D.K., Yoo, S.H., Liu, A.C., Takahashi, J.S. & Kay, S.A. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*, **14**, 2289-2295.
- 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.
- Wilkinson, M., Arendt, J., Bradtke, J. & de Ziegler, D. (1977) Determination of a dark-induced increase of pineal N-acetyl transferase activity and simultaneous radioimmunoassay of melatonin in pineal, serum and pituitary tissue of the male rat. *J Endocrinol*, **72**, 243-244.
- Wirz-Justice, A. & Van den Hoofdakker, R.H. (1999) Sleep deprivation in depression: what do we know, where do we go? *Biol Psychiatry*, **46**, 445-453.
- Wu, J.C. & Bunney, W.E. (1990) The biological basis of an antidepressant response to sleep deprivation and relapse: review and hypothesis. *Am J Psychiatry*, **147**, 14-21.

Y

- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G.T. & Okamura, H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, **292**, 278-281.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M. & Okamura, H. (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science*, **302**, 1408-1412.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. & Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, **288**, 682-685.
- Yamazaki, S. & Takahashi, J.S. (2005) Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals. *Methods Enzymol*, **393**, 288-301.
- Yan, L. & Silver, R. (2002) Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci*, **16**, 1531-1540.
- Ying, S.W., Rusak, B., Delagrangé, P., Mocaer, E., Renard, P. & Guardiola-Lemaitre, B. (1996) Melatonin analogues as agonists and antagonists in the circadian system and other brain areas. *Eur J Pharmacol*, **296**, 33-42.

- 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.
- Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepkka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. & Takahashi, J.S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5339-5346.
- Yous, S., Andrieux, J., Howell, H.E., Morgan, P.J., Renard, P., Pfeiffer, B., Lesieur, D. & Guardiola-Lemaitre, B. (1992) Novel naphthalenic ligands with high affinity for the melatonin receptor. *J Med Chem*, **35**, 1484-1486.

Z

- Zhang, E.T., Mikkelsen, J.D. & Moller, M. (1991) Tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in the pineal complex of untreated rats and rats following removal of the superior cervical ganglia. *Cell Tissue Res*, **265**, 63-71.
- Zupancic, M. & Guilleminault, C. (2006) Agomelatine: a preliminary review of a new antidepressant. *CNS Drugs*, **20**, 981-992.
- 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.

Liste des figures et des tableaux

Figures

Figure 1 :	Paramètres caractéristiques des rythmes biologiques	2
Figure 2 :	Abolition des rythmes circadiens après destruction des NSC.....	6
Figure 3 :	Actogrammes obtenus après greffes de NSC chez des hamsters syriens sauvages et mutants <i>tau</i>	7
Figure 4 :	Localisation et anatomie des NSC chez les Mammifères.....	9
Figure 5 :	Modèle de boucles moléculaires de régulation translationnelle et traductionnelle des gènes horloge d'une cellule de NSC, chez les Mammifères.....	11
Figure 6 :	Traitement de l'information photique par le tractus rétino-hypothalamique....	16
Figure 7 :	Représentation schématique des trois afférences majeures des SCN.....	17
Figure 8 :	Représentation des décalages de phases induits par la lumière sur l'activité locomotrice.....	19
Figure 9 :	La restriction alimentaire temporelle induit une activité locomotrice anticipatoire.....	22
Figure 10 :	Voie polysynaptique impliquée dans la transmission du message temporel jusqu'à la glande pinéale.....	27
Figure 11 :	Voie de biosynthèse de la mélatonine dans la glande pinéale.....	27
Figure 12 :	Actogramme représentant l'entraînement du rythme de l'activité locomotrice par la mélatonine exogène (MLT).....	32
Figure 13 :	Rythmes circadiens des paramètres biologiques dans l'épisode dépressif majeur.....	38
Figure 14 :	Structures de la mélatonine et de l'agomélatine.....	39
Figure 15 :	Effets de l'Ago sur la consommation de sucrose chez des rats stressés.....	43

Figure 16 :	(A) Représentation de la sonde intrapinéale. (B) Coupe frontale du cerveau illustrant l'implantation transversale de la sonde dans la glande pinéale.	51
Figure 17 :	Sécrétion de mélatonine mesurée durant le premier jour contrôle (CTR1) et les 2 jours (CTR3 et CTR4) suivant l'injection de véhicule, à ZT12. (A) Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale. (B) Variations d'amplitude du rythme de mélatonine à CTR3 et CTR4 vs CTR1.	54
Figure 18 :	Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale mesurée durant le premier jour contrôle et les 2 jours suivant une seule injection (A) d'Ago, (B) de MLT et (C) de S32006 à 1 mg/kg..	58
Figure 19 :	Sur la gauche : profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale mesurée durant le premier jour contrôle et les 2 jours suivant une seule injection (A) d'Ago, (B) de MLT et (C) de S32006 à 2,5 mg/kg. Sur la droite : variations d'amplitude du rythme de mélatonine à CTR3 et CTR4 vs CTR1 suivant une injection d'Ago, MLT et S32006 à 2,5 mg/kg	59
Figure 20 :	Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale mesurée durant le premier jour contrôle et les 2 jours suivant une seule injection (A) d'Ago, (B) de MLT et (C) de S32006 à 5 mg/kg.	60
Figure 21 :	Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) une seule injection de (A) véhicule, (B) Ago, (C) MLT et (D) S32006, à la dose de 2,5 mg/kg..	61
Figure 22 :	Variations de l'amplitude de la Tc observées pour EXP vs CTR suivant une seule injection des drogues (2,5 mg/kg) et du véhicule à ZT12	62
Figure 23 :	Sécrétion de mélatonine mesurée durant le premier jour contrôle (CTR1) et les 2 jours (CTR3 et CTR4) suivant l'injection du SB242084, à 2,5 mg/kg. (A) Profils moyens de la concentration de mélatonine dans la glande pinéale. (B) Variations d'amplitude du rythme de mélatonine à CTR3 et CTR4 vs CTR1.	67

Figure 24 :	(A) Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et les 2 jours après (EXP) une seule injection de SB242084. (B) Variations de l'amplitude de la Tc observées pour EXP vs CTR suivant une seule injection des drogues (2,5 mg/kg) et du véhicule à ZT12	68
Figure 25 :	Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) injection (A) du S32006 et (B) du SB242084 à différents créneaux horaires (ZT12, ZT0, ZT6 et ZT18) et à une dose de 2,5mg/kg.....	71
Figure 26 :	Variations de l'amplitude de la Tc observées pour EXP vs CTR suivant l'injection du S32006 et du SB242084 à 2,5 mg/kg et à différents créneaux horaires (ZT12, ZT0, ZT6 et ZT18).	72
Figure 27 :	Variations de l'amplitude de la Tc observées pour EXP vs CTR suivant une seule injection des drogues (2,5 mg/kg) et du véhicule à ZT12, en condition LD 12 : 12, chez des animaux n'ayant pas subi de microdialyse.	75
Figure 28 :	Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) une seule injection de (A) véhicule, (B) Ago, (C) MLT et (D) S32006, à la dose de 1 mg/kg, en condition de microdialyse.	77
Figure 29 :	Profils moyens de la Tc enregistrée durant les 2 jours avant (CTR) et après (EXP) une seule injection de (A) véhicule, (B) Ago, (C) MLT et (D) S32006, à la dose de 5 mg/kg, en condition de microdialyse.	78
Figure 30 :	Variations de l'amplitude de la Tc observées pour EXP vs CTR suivant l'injection du véhicule et des drogues à différentes doses.....	79
Figure 31 :	Photographie du Lumicycle.....	85
Figure 32 :	Profils individuels représentatifs de chaque groupe de l'expression du gène <i>Per1</i> des NSC enregistrée durant les 3 oscillations avant (CTR) et après (EXP) administration (A) du véhicule, (B) d'Ago et (C) de MLT, à une concentration de 50 µM.	88
Figure 33 :	Variations d'amplitude de l'expression du gène <i>Per1</i> entre EXP et CTR, après administration du véhicule, de l'Ago et de la MLT.	89

Figure 34 :	(A) Profils individuels représentatifs de chaque groupe de l'expression du gène <i>Per1</i> des NSC enregistrée lors des différents traitements (véhicule, Ago et MLT). (B) Amplitude de l'oscillation du gène <i>Per1</i> enregistrée le jour des différents traitements	90
Figure 35 :	Représentation schématique des mécanismes d'action de l'Ago sur l'horloge centrale.....	101

Tableaux

Tableau 1 :	Valeurs moyennes des variations d'amplitude du pic de mélatonine, déterminées à partir des profils individuels, entre CTR3 vs CTR1, CTR4 vs CTR1.....	55
Tableau 2 :	Valeurs moyennes des variations des deux marqueurs de phase (<i>IT50</i> , <i>DT50</i>) et de la durée du pic de mélatonine, déterminées à partir des profils individuels, entre CTR3 vs CTR1, CTR4 vs CTR1.....	57



Effets de l'agomélatine et de la mélatonine sur les oscillations de l'horloge circadienne

Résumé

La mélatonine est connue pour agir directement sur l'horloge circadienne. L'agomélatine est un antidépresseur présentant des propriétés agonistes MT1/MT2 et antagonistes 5-HT_{2C}. Tout d'abord, nous avons évalué les effets de l'agomélatine, de la mélatonine et d'un antagoniste 5-HT_{2C} sur deux sorties de l'horloge (rythme de la mélatonine endogène et de la température corporelle). Les résultats obtenus suggèrent une action centrale de l'agomélatine et de la mélatonine, directement sur l'horloge *via* les récepteurs MT1/MT2, en induisant une augmentation de l'amplitude et une avance de phase du rythme de mélatonine. Pour la température corporelle, l'ensemble des drogues augmente l'amplitude du rythme, suggérant une action des propriétés agonistes MT1/MT2 et/ou antagonistes 5-HT_{2C} de l'agomélatine. Puis, l'étude sur l'expression du gène horloge *Per1*, a révélé un effet supérieur de l'agomélatine par rapport à la mélatonine, mais seulement le jour du traitement. L'agomélatine pourrait agir sur la machinerie moléculaire de l'horloge, ce qui reste à exploiter davantage. Ces nouvelles données contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'agomélatine.

Mots clés : agomélatine, rythmes circadiens, mélatonine, température corporelle, microdialyse, gène *Per1*

Summary

Melatonin is known to act directly on the circadian clock. Agomelatine is an antidepressant with MT1/MT2 agonist and antagonist 5-HT_{2C} properties. First, we evaluated the effects of agomelatine, melatonin and 5-HT_{2C} antagonist on two clock outputs (rhythm of endogenous melatonin and body temperature). The results suggest a central action of agomelatine and melatonin, directly on the circadian clock *via* MT1/MT2 receptors, inducing an increase on the amplitude and a phase advance of the rhythm of melatonin. For body temperature, all drugs increased the amplitude of the rhythm, this suggest an action of MT1/MT2 agonist and antagonist 5-HT_{2C} properties of agomelatine. Secondly, the study on the expression of clock gene *Per1* revealed a greater effect of agomelatine compared to melatonin, but only on the day of treatment. Agomelatine could act on the molecular machinery of the clock, but requires further investigations. These new data allow a better understand of the mechanisms action of agomelatine.

Key words: agomelatine, circadian rhythms, melatonin, body temperature, microdialysis, gene *Per1*