

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
(ED414)**

**Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives
(CNRS UPR3212)**

THÈSE

présentée par

Catherine JAEGER

Soutenue le 11 juin 2014

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences de la vie / Neurosciences

Organisation tissulaire de l'horloge circadienne dans la rétine de rongeur

THÈSE dirigée par :

Mme FELDER-SCHMITTBUHL Marie-Paule

Chargée de recherche, Institut des Neurosciences
Cellulaires et Intégratives (CNRS UPR3212), Strasbourg

RAPPORTEURS :

M RIBELAYGA Christophe

Assistant professor, The University of Texas Health
Science Center at Houston

Mme DKHISSI-BENYAHYA Ouria

Chargée de recherche, Institut Cellules Souches et
Cerveau (INSERM U846), Bron

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M CHALLET Etienne

Directeur de recherche, Institut des Neurosciences
Cellulaires et Intégratives (CNRS UPR3212), Strasbourg

Ces travaux ont été financièrement supportés par :

- Le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
- L'association Retina France

Remerciements

L'aventure de ma thèse commence à Besançon, sur les bancs de la fac. Au fur et à mesure des semestres qui défilent, parsemés d'UE de neurosciences et des "Cerveaux & Psycho" de la BU que je dévore, je me rends compte que tout ce qui touche au cerveau me passionne.

C'est grâce à **Valérie**, qui m'accueille dans son équipe et me confie aux bons soins de **Laura** pour mon stage de M1, que je mets un premier pied à Strasbourg et à l'INCI, et c'est grâce à **Julien**, alors stagiaire au labo, que je découvre les filières de neurosciences de Strasbourg. Sans ces rencontres, je n'aurais pas fait le grand saut, et je les en remercie de tout cœur.

Et puis vient le stage de M2, et là c'est **Marie-Paule** qui, en retenant ma candidature, met la machine en route. Il faut dire qu'en venant toutes deux du domaine de la biologie moléculaire, on devait s'entendre ! Au cours de ce stage, il devient évident pour moi de poursuivre par une thèse, et de poursuivre avec Marie-Paule, bien entendu.

Alors c'est parti pour la thèse. J'ai aimé ces années autant que j'ai détesté mes années de fac (enfin surtout les examens qui y sont associés). Un beau jour je me suis rendu compte que je ne disais jamais « je vais au boulot » mais toujours « je vais au labo » ! Quand on a la chance de baigner dans un milieu aussi riche et aussi passionnant on n'a pas l'impression de travailler, et se lever le matin ou rester la nuit et le weekend n'est (presque) pas une corvée. D'ailleurs, on ne peut pas dire que j'étais particulièrement pressée de la finir cette thèse... mais avec l'encadrement, l'entourage et les activités dont j'ai bénéficié, ça se comprend.

D'abord j'ai eu la chance d'avoir **Marie-Paule** : que dire d'autre sinon que tout était parfait ? Le problème c'est que question encadrement tu m'as habituée au grand luxe. Merci de m'avoir offert des conditions aussi optimales pour mon immersion dans le monde de la recherche ! Tes qualités humaines sont indéniables, et je ne me risquerais pas à tenter d'en faire la liste. Tu sais être très présente tout en laissant libre ; épauler, encourager et soutenir sans forcer ni freiner ; toujours disponible et à l'écoute, tu t'investis sans compter (combien de mails échangés minuit passé, le dimanche ou pendant tes vacances ?) pour valoriser le meilleur de chacun (humainement comme scientifiquement). Je te souhaite de toujours trouver les ressources humaines et financières nécessaires à l'épanouissement de tes projets de recherche, et d'en obtenir beaucoup de satisfaction. Je souhaite aussi le meilleur à toute la petite famille.

Et bien sûr il y a eu **Cristina** aussi, qui m'a accompagnée de mes premiers balbutiements à la paillasse jusqu'à la soutenance. Et tous les concerts partagés ! Merci pour tout ce que tu m'as appris, pour l'appui que tu as représenté pour moi. Je te souhaite de trouver, enfin, la place à part entière que tu mérites dans la recherche.

Ah la joyeuse bande des doctorants, stagiaires, et postdocs ! Ce sont les bons moments passés avec vous, au labo et en-dehors (vive l'opéra, les pique-niques et les soirées surprise !), qui contribueront à me laisser un si bon souvenir de ces années : ma chère **Coralie** (on a bien fait de partager mon bureau à ton arrivée à l'INCI !), mon irremplaçable jumelle blondinette **Caro**, **Edith** et **David** que j'aime toujours malgré le traumatisme de l'abandon de bureau, les compères **Julien** et **Laurent**, mon stagiaire souffre-douleur et tortionnaire préféré **Vy**, **Cristina**, **JBS**, **Jo**, **Rajae**, **Hanan**, **Mio**, **Ned**, **Caroline** (ma compagne de galère MRT et notre mémorable périple en Inde avec **Ibtissam**) ! Mais aussi **Antoine**, **Laetitia** et **Joseph** les camarades de promo du 2^{ème}, **Claire**, **Madah**, **Tounes**, **Firuzeh**, **Domitille** (je me rappelle les tests TUNEL en catastrophe à la toute fin de ta thèse et alors que j'étais encore en stage, parfait pour bien me mettre dans le bain !), **Aurea** et **Jacob** grâce à qui le bureau n'était pas vide à la fin de ma thèse, ...

REMERCIEMENTS

Je remercie tout spécialement **Ouafaa**, pour sa présence immuable et serviable dans le bureau des étudiants (mais tu as réussi à arriver au bout de ta thèse malgré tout, bravo et bonne continuation !) mais aussi pour son précieux protocole d'extraction d'ARN des échantillons rétiniens (tu ne l'as de loin pas mis au point pour rien !) ; **Katell** qui m'a sauvé la vie avec ses superpouvoirs de mathématicienne (je te souhaite de trouver chaussure à ton pied en cette période charnière de fin de Master !) ; **André** qui m'a beaucoup accompagnée pour l'aspect analyses et statistiques de mes travaux (si vous n'aviez pas pensé que j'étais capable de faire par moi-même ces démarches, je pense que je n'aurais pas osé l'imaginer !).

Je remercie également toutes les personnes qui ont mis la main à la pâte pour mes manips et mon travail au laboratoire : mes fournisseurs d'agents pharmacologiques (en tête de liste **Antoine**, mon conseiller attitré, **Fred**, **Laetitia**, **Anaïs**, **Rémy**, **Daniel** et **Béatrice**) ; **Sylvette** pour les essais au microscope confocal ; **Claudine** pour son travail du quotidien qui décharge de la préoccupation du matériel de base ; **Martine** et **Frank** pour la collaboration trop vite abandonnée sur la bioluminescence des cellules ganglionnaires isolées ; les personnes de l'animalerie qui se mette en quatre pour que la variable "animal" soit aussi peu que possible un facteur limitant (**Dom**, **Sophie**, **Laurence**, **Nicolas**, **Aurore**) ; **Félix** pour son coup de main vraiment bienvenu lors de l'impression de ma thèse ; **Mildred** et **Hugo** pour leurs efforts sur les tests TUNEL sur couches rétiniennes (Hugo c'était un plaisir de suivre tes progrès avec le Luminowiew, je te souhaite bon succès dans ta thèse à Lyon !).

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui ont préparé mon pot de thèse (**Monchéri** [cé ki çui-là ?], **Edith**, **Célia**, **Caro**, **Jo**, **Mio**, **Ouafaa**, **Haïdi**, mes **famille** et **belle-famille**) et qui en ont fait une très belle fête, en venant (parfois de loin) ou en étant présentes de loin. Je remercie les membres du jury qui ont fait de mon passage à la casserole un moment par trop désagréable, et pour leurs utiles remarques et conseils.

Mes années de thèse vont de pair avec mes années de médiation scientifique au Jardin des sciences : une expérience qui m'a enthousiasmée, grâce à **Anne-Catherine** qui m'a recrutée et m'a aiguillée sur des projets fabuleux. Près de 3 ans de coopération avec **Stéphanie** : merci pour tout, c'était génial de travailler avec toi, j'ai beaucoup appris et pris mon pied dans tout ce qu'on a fait ensemble, je te souhaite de t'épanouir dans tes nouveaux projets. Le Jardin des sciences, c'était aussi **Saïd**, **Milène**, **Christelle** et **Thérèse**, et les projets partagés avec **Chokri**, **Isabelle**, **Guillaume**, **Olivier**, **Mike**, **Shai** et **Housseem** : bonne continuation, bon vent à chacun !

Et toutes les semaines, il y avait aussi le temps pour la musique. La musique qui transporte autant que la science. C'était du travail et du plaisir avec les **Voy'Elles**, **Sylvie** et **Emma**, **Bernard**, **Anaïs**, **Marianne**, **Anne-Flo**, **Vera**, **Christian**, **Anne**. Que de moments vécus ensemble ! Vous faites partie intégrante de ma thèse par la musique partagée, mais aussi par les concerts de collecte de fonds pour Retina France. C'est comme si vous aviez directement contribué au fait que j'aie financièrement pu aller au bout de ma thèse !

Au centre de cette thèse, il y a bien sûr eu ma chère et tendre moitié. Deux thésards qui finissent pratiquement en même temps, c'était quand même parfois un peu dur, mais c'est main dans la main jusqu'au bout et coûte que coûte. Sans toi rien de ce que j'entreprends dans ma vie ne serait possible. Tu étais là avant la thèse, et tu resteras après la thèse : au regard du temps passé avec toi ce ne sont que quelques petites années parmi les autres.

Enfin il y a eu nos deux familles ; tous les membres de l'équipe, du département, du labo ; les amis de l'EOST ; les amis de toujours. Un grand merci à tous !

Vive la science !



Table des matières

ABREVIATIONS & ACRONYMES	0
INTRODUCTION.....	1
I / Des rythmes et des horloges biologiques	3
I.1 / Introduction à la chronobiologie.....	3
I.1.A / Bref historique.....	3
I.1.B / Principes de base de la chronobiologie.....	3
I.1.B.a / Petit lexique de la chronobiologie	3
I.1.B.b / Propriétés d'une horloge circadienne.....	4
I.1.B.c / Phénomènes rythmiques remarquables.....	5
I.2 / Une horloge, des horloges	6
I.2.A / Le grand maître horloger.....	7
I.2.B / Un réseau d'horloges	9
I.3 / L'horloge moléculaire : robustesse et souplesse	10
I.3.A / Un mécanisme génétique.....	10
I.3.A.a / Une boucle centrale de rétrocontrôle direct	11
I.3.A.b / Un rouage secondaire	12
I.3.A.c / Une armada de mécanismes de régulation	13
I.3.A.d / Ou comment entrer dans la boucle	14
I.3.A.e / Ou comment sortir de la boucle	15
I.3.A.f / Entrée, sortie, ou sac de nœuds ?.....	16
I.3.B / Génétique, mais pas seulement	17
II / La rétine de mammifère à la loupe.....	19
II.1 / La rétine au x20 : vue d'ensemble	19
II.1.A / Structure de la rétine neurale	19
II.1.A.a / Couches nucléaires.....	20
II.1.A.b / Couches plexiformes	21
II.1.B / Circulation de l'information visuelle	21
II.1.B.a / Réception de l'information lumineuse.....	21
II.1.B.b / Transmission du message photique.....	22
II.1.C / Autour de la rétine	23
II.1.C.a / L'épithélium pigmentaire	23
II.1.C.b / La vasculature	23
II.2 / La rétine au x60 : types cellulaires	24
II.2.A / Les cellules de Müller	25
II.2.B / Les photorécepteurs.....	25
II.2.C / Les cellules horizontales.....	26
II.2.D / Les cellules bipolaires	26
II.2.E / Les cellules amacrines	27
II.2.E.a / Les cellules amacrines de la circuiterie des bâtonnets	27

II.2.E.b / Les cellules amacrines dopaminergiques	28
II.2.F / Les cellules ganglionnaires	28
II.2.F.a / Les cellules ganglionnaires biphaxiformes	28
II.2.F.b / Les cellules à mélanopsine	29
II.2.G / Quand tout se complique encore.....	30
II.3 / La rétine au x100 : communication dans la rétine.....	31
II.3.A / Neurotransmetteurs.....	31
II.3.B / Neuropeptides, neuromodulateurs et compagnie.....	31
II.3.C / Jonctions communicantes	32
II.3.D / Potentiels d'action.....	34
III / Une horloge m'a tapé dans l'œil	35
III.1 / Des rythmes circadiens dans la rétine	35
III.1.A / Au niveau moléculaire.....	35
III.1.B / Au niveau physiologique	36
III.1.C / Mélatonine dit "tic", dopamine dit "tac"	36
III.1.C.a / La dopamine en action.....	37
III.1.C.b / La mélatonine en action.....	38
III.2 / Mise en évidence de l'horloge rétinienne	38
III.3 / Dialogue entre horloges.....	39
III.3.A / La voie rétrograde des cellules ganglionnaires à mélanopsine	40
III.3.B / La voie rétrograde des fibres histaminergiques	40
III.4 / Composition de l'horloge rétinienne	40
III.5 / Localisation de l'horloge rétinienne	41
III.5.A / Expression localisée des gènes horloge	41
III.5.B / Données fonctionnelles.....	43
III.5.B.a / Coup d'œil sur la couche des photorécepteurs du rat.....	44
III.5.B.b / Coup d'œil sur la couche nucléaire interne de la souris	44
III.5.C / L'hypothèse "cellules dopaminergiques"	45
III.6 / Communication intra-rétinienne	46
III.7 / Entraînement de l'horloge rétinienne	47
IV / Conclusion... de l'introduction	48
OBJECTIFS & STRATEGIE EXPERIMENTALE	49
I / Objectifs.....	51
II / Stratégie expérimentale : la bioluminescence	53
II.1 / La réaction de bioluminescence et son enregistrement.....	54
II.2 / La lignée de rats <i>Per1-Luciférase</i>	54
II.3 / La lignée de souris PER2::LUCIFERASE	55

MATERIELS & METHODES.....	57
I / La culture	59
I.1 / La mise au point des protocoles de culture	59
I.2 / Les coupes au vibratome	60
II / L'analyse des données de bioluminescence.....	61
II.1 / Avec LumiCycle Analysis.....	61
II.2 / Avec SigmaPlot.....	62
II.3 / Les tests statistiques	63
 RESULTATS.....	 65
I / Mise au point d'un outil d'étude de l'horloge rétinienne chez le rat ARTICLE 1.....	67
Abstract.....	68
Introduction	69
Methods.....	70
Results.....	74
Discussion	79
Acknowledgements	80
References	81
II / Localisation de l'horloge rétinienne ARTICLE 2	83
III / Couplage entre les couches rétiniennes ARTICLE 2.....	83
Abstract.....	84
Introduction	85
Materials and methods.....	86
Results.....	90
Discussion	97
Conclusion.....	100
Acknowledgements	100
References	100
IV / Entraînement de l'horloge rétinienne	103
IV.1 / Entraînement par la lumière	103
IV.1.A / Chez la souris PER2::LUC	104
IV.1.A.a / Application d'un créneau de lumière	104
IV.1.A.b / Entraînement par un cycle d'alternance lumière/obscurité	106
IV.1.B / Chez le rat <i>Per1-Luc</i>	107
IV.1.B.a / Application d'un créneau de lumière	107
IV.1.B.b / Entraînement par un cycle d'alternance lumière/obscurité	108
IV.1.C / Discussion	109
IV.2 / Rôle de l'AMPC dans l'entraînement de l'horloge rétinienne.....	110
IV.2.A / Chez le rat <i>Per1-Luc</i>	111
IV.2.B / Chez la souris PER2::LUC	112

IV.2.C / Discussion	113
V / Fonctionnement de l'horloge au cours de la maturation de la rétine	115
V.1 / Chez le souriceau PER2::LUC.....	115
V.2 / Chez le raton <i>Per1-Luc</i>	116
V.3 / Discussion.....	117
V.3.A / Maturation rétinienne chez le souriceau	117
V.3.B / Maturation rétinienne chez le raton	119
DISCUSSION & PERSPECTIVES	121
I / Les modèles animaux et techniques utilisés	123
I.1 / Modèles animaux.....	123
I.1.A / Rat <i>Per1-Luc</i> vs souris PER2::LUC	123
I.1.B / <i>Rev-Erbα</i> ?	123
I.2 / Techniques mises en œuvre	124
I.2.A / La bioluminescence	124
I.2.B / L'analyse des données de bioluminescence.....	125
I.2.C / La culture.....	125
I.2.D / La coupe au vibratome	126
II / Localisation et couplage des oscillateurs rétiniens.....	127
II.1 / Localisation de l'horloge rétinienne	127
II.2 / Couplage des oscillateurs rétiniens.....	128
II.2.A / La mélatonine	128
II.2.B / Les cellules de Müller	129
II.2.C / Les jonctions communicantes	130
II.2.D / L'AMPc.....	130
III / Entraînement de l'horloge rétinienne	132
III.1 / La lumière.....	132
III.2 / L'AMPc	132
IV / Conclusion et perspectives.....	134
BIBLIOGRAPHIE.....	137

Abréviations & Acronymes

Bien que ce manuscrit soit rédigé en français, j'ai choisi de conserver les acronymes anglais (pour la dénomination des structures cérébrales et des couches rétinienne notamment) dans un souci d'homogénéité avec la partie "**Résultats**" qui comporte des articles en anglais.

AAA	acide α -aminoadipique	LD	light/dark (alternance lumière/obscurité)
AANAT	arylalkylamine N-acétyltransférase	LL	light/light (lumière constante)
AC	adénylate cyclase	Luc	Luciférase
AMPc	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique	MAPK	mitogen-activated protein kinases
ATP	adénosine 5'-triphosphate	MT1-3	récepteur à la mélatonine 1 à 3
AVP	arginine vasopressine	NO	monoxyde d'azote
BMAL	brain and muscle ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator)-like	NPAS	neuronal PAS (Per Arnt Sim) domain protein
CaMK	calcium/calmodulin-protein kinases	OPL	couche plexiforme externe (outer plexiform layer)
CK	caséine kinase	PACAP	pituitary adénylate cyclase activating peptide
Clock	circadian locomotor output cycles kaput	Per	Period
CRE	cAMP response element	PKA/C	protéine kinase A/C
CREB	CRE binding protein	PP	protéines phosphatases
Cry	Cryptochrome	PRL	couche des photorécepteurs (photoreceptor layer)
CT	circadian time (temps circadian)	Rev-Erb	reverse viral erythroblastis oncogene product
D1-5	récepteur à la dopamine 1 à 5	Ror	retinoic acid-related orphan receptor
Dbp	D element-binding protein	RPE	Epithélium pigmentaire rétinien (retinal pigment epithelium)
DC	dissociated cells (cellules dissociées)	SCN	noyau suprachiasmatique (suprachiasmatic nucleus)
DD	dark/dark (obscurité constante)	SEM	standard error of the mean (erreur standard à la moyenne)
ERG	électrorétinogramme	TH	tyrosine hydroxylase
GABA	acide γ -aminobutyrique	TRP	transient receptor potential
GCL	couche des cellules ganglionnaires (ganglion cell layer)	TTX	tétradotoxine
GMPc	guanosine 3',5'-monophosphate cyclique	UTR3'	séquence 3' non codante
GRP	gastrin-releasing peptide	VIP	vasoactive intestinal peptide
HBSS	Hank's balanced salt solution	WR	whole retina (rétine entière)
HIOMT	hydroxyindole-O-méthyltransférase	ZT	Zeitgeber time (temps astronomique)
INL	couche nucléaire interne (inner nuclear layer)		
IPL	couche plexiforme interne (inner plexiform layer)		
KI	knock-in		

Introduction

Le rapport entre ce que nous voyons et ce que nous savons n'est jamais fixé une fois pour toutes. Notre façon de voir dépend de ce que nous savons ou de ce que nous croyons. Le passé n'est jamais là à attendre qu'on le découvre, qu'on le reconnaisse pour ce qu'il est réellement. L'histoire, c'est toujours le rapport entre un présent et son passé.

John Berger

Figure 1 : Eine Blumenuhr, l'horloge florale de Carl von Linné, 1751.

Linné avait remarqué que les fleurs avaient des horaires différents d'ouverture et de repliement de leur corolle selon leur espèce. En les ordonnant par ordre chronologique dans un jardin, il était possible de suivre l'avancée des heures de la journée par l'observation des phases successives d'épanouissement.

I / Des rythmes et des horloges biologiques

I.1 / Introduction à la chronobiologie

I.1.A / Bref historique

Du fait de la rotation de la Terre autour de son axe, les organismes vivants sont soumis à des variations physiques journalières de leur environnement (intensité lumineuse, température, humidité...) : s'y adapter est une question de survie. Observer une fleur qui déploie ses pétales aux premiers rayons de l'aurore puis les referme au crépuscule peut sembler une évidence, mais remarquer que le mouvement quotidien des feuilles d'une plante héliotrope (la sensitive : *Mimosa pudica*) persiste lorsque le rythme d'alternance jour/nuit cesse pour une obscurité permanente l'est nettement moins. C'est portant ce que rapporta l'astronome (mais en fait scientifique multidisciplinaire) français Jean-Jacques d'Ortous de Mairan à l'Académie Royale des Sciences de Paris en 1729 et qui constitue la première expérience de chronobiologie connue à ce jour (d'Ortous de Mairan, 1729). Cette simple observation laisse déjà entrevoir ce qui fonde le socle de la chronobiologie : les variations cycliques des comportements et de la physiologie des êtres vivants ne sont pas uniquement des réponses passives à leur environnement mais peuvent être générés de manière endogène.

Bien que Charles et Francis Darwin l'aient déjà suggéré en 1880 (Darwin and Darwin, 1880), ce n'est que dans les années 1930 qu'Erwin Bünning révéla la nature génétique de cette rythmicité endogène en montrant que la durée de la période endogène des rythmes du mouvement des feuilles du haricot (*Phaseolus multiflorus* et *Phaseolus coccineus*) est héréditaire (Bünning, 1932, 1935). Le premier gène identifié fut d'ailleurs baptisé *Period* (*Per*) du fait des modifications de la durée de la période provoquées par sa mutation chez la drosophile (Bargiello and Young, 1984; Konopka and Benzer, 1971; Reddy et al., 1984).

C'est au XX^{ème} siècle seulement que l'étude des rythmes biologiques prit son envol, s'intéressant à tous types d'organismes : bactéries, champignons, plantes, animaux. L'expérience du spéléologue Michel Siffre qui vécut durant deux mois dans un glacier souterrain et y fit suivre son rythme d'alternance veille/sommeil en 1962 en est un exemple bien célèbre (Siffre, 1963). Avec l'étude de Jürgen Aschoff et Rütger Wever (Aschoff and Wever, 1962), qui montre que des volontaires isolés dans une cave maintiennent des rythmes de température corporelle et d'alternance veille/sommeil d'une périodicité proche de 24 h en l'absence d'indices environnementaux, ce sont les premières preuves de l'existence d'une rythmicité endogène chez l'être humain (Aschoff, 1965).

La discipline prit vraiment naissance en 1960 grâce à l'unification de chercheurs de tous horizons, lors de la conférence de Cold Spring Harbor initiée par Colin Pittendrigh et Jürgen Aschoff et intitulée "Horloges biologiques" où notamment Pittendrigh généralisa l'ensemble des connaissances accumulées sur l'ensemble des espèces étudiées par les pionniers du domaine en 16 principes de base (Pittendrigh, 1960).

I.1.B / Principes de base de la chronobiologie

I.1.B.a / Petit lexique de la chronobiologie

La chronobiologie s'intéresse aux rythmes biologiques qui sont liés aux cycles géophysiques, et particulièrement aux rythmes circannuels (se produisant à l'échelle de l'année) et circadiens, qui sont liés à la position de la Terre par rapport au Soleil.

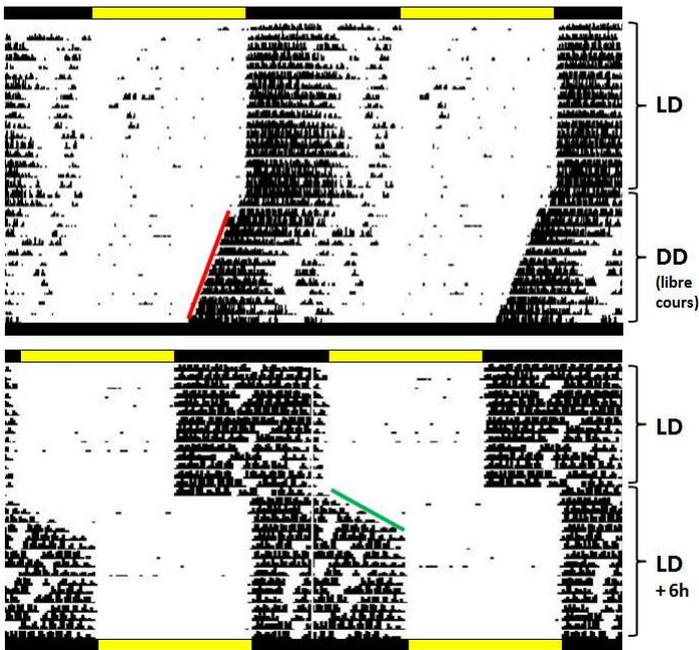
Le terme **circadien** fut introduit par Franz Halberg en 1957 (Halberg *et al.*, 1959) : construit d'après les termes latins "*circa*" environ et "*dies*" jour, il définit des rythmes d'une période proche de 24 h générés de manière **endogène** tels que les rythmes bien connus de température corporelle, de certaines hormones (cortisol, mélatonine, etc) ou d'alternance veille/sommeil. Le caractère endogène des rythmes circadiens implique qu'ils soient maintenus lorsque tous les paramètres de leur environnement sont constants. En laboratoire où les paramètres de température, d'humidité et de prise alimentaire sont contrôlés, cela signifie une persistance dans des conditions constantes de luminosité : obscurité constante (**DD** pour dark/dark) ou lumière constante (**LL** pour light/light). Ce sont des conditions dites de **libre-cours**. Le passage du temps endogène (en conditions constantes) est décompté en **temps circadien** (ou **CT** pour "circadian time") pour être distingué du passage du temps astronomique dit **ZT** pour "Zeitgeber time" (ZT0 étant défini comme le moment de la transition nuit/jour ; le terme Zeitgeber sera défini dans le prochain **paragraphe : I.1.B.b /**).

Les rythmes dont la période endogène est plus longue que 24 h (tels que les rythmes circalunaires qui ont une périodicité d'à peu près 28 jours) sont dits **infradiens**, tandis que ceux dont la période est plus courte que 24 h (comme le rythme de prise alimentaire chez certaines espèces (Gerkema *et al.*, 1990)) sont dits **ultradiens**.

I.1.B.b / Propriétés d'une horloge circadienne

Les rythmes biologiques circadiens sont contrôlés par des **horloges** biologiques circadiennes dont la fonction est de générer de manière **auto-entretenu** des oscillations de leur mécanisme selon une périodicité d'environ 24 h. Cette métaphore de l'horloge qui fait aujourd'hui partie du langage courant a inspiré les scientifiques depuis longtemps puisque le terme "horloge vivante" apparaît déjà en 1814 dans la thèse de doctorat du pharmacien Julien-Joseph Virey intitulée « Ephémérides de la vie humaine ou recherches sur la révolution journalière et la périodicité de ses phénomènes dans la santé et les maladies » (Virey, 1814). La deuxième propriété caractéristique des horloges biologiques est l'**entraînement**. En effet, les périodes endogènes des horloges ne sont que rarement de 24 h exactement, elles se doivent donc de se réajuster en permanence sur leur environnement afin que le "temps interne" ne se déphase pas progressivement du "temps externe". C'est d'ailleurs ce qui se produit lors d'une traversée rapide des fuseaux horaires et qui explique les quelques jours de fatigue et de difficulté à adopter un nouveau rythme de sommeil, de prise alimentaire, etc rencontrés dans cette situation. Pour se synchroniser sur leur environnement, les horloges sont donc entraînées par certains indices environnementaux pertinents, appelés **Zeitgeber** (ce qui signifie "donneur de temps") (Aschoff, 1954), qui sont principalement la lumière et la température, mais peuvent aussi être l'interaction sociale ou encore la prise alimentaire. Une horloge biologique n'est donc jamais isolée : elle comporte des voies d'entrée qui véhiculent les repères temporels et qui la remettent quotidiennement à l'heure. Enfin, la troisième propriété qui qualifie une horloge circadienne est la capacité à **donner l'heure** : une horloge comporte des voies de sortie qui transmettent des signaux rythmiques à toutes les entités qu'elle régule. Ces sorties sont d'ailleurs très largement utilisées comme témoin pour étudier les horloges car elles sont souvent plus facilement accessibles, observables ou mesurables. Dans le cas des rongeurs de laboratoire, c'est le rythme d'activité locomotrice, mesuré d'après le nombre de tours de roue effectués par l'animal par unité de temps, qui est le plus souvent utilisé (**Figure 2**).

Les horloges présentent une propriété remarquable qui est la **compensation thermique** : alors que la vitesse des réactions biochimiques est sensible aux variations de température, la périodicité de l'oscillation d'une horloge circadienne varie peu avec la température, ce qui permet au système de rester stable lorsque les conditions climatiques varient.



Les critères qui distinguent une "vraie" horloge d'un oscillateur sont actuellement encore matière à débat. Il n'est pas utile ici de rentrer dans ce débat, aussi je me contenterai d'utiliser le terme "horloge" pour les structures pour lesquelles l'existence d'une voie d'entrée, d'une voie de sortie et l'autonomie sont connues, et d'"oscillateur" dans le cas contraire. Mais il est vrai que la propriété d'auto-entretien d'une horloge est parfois difficile à appréhender (Dibner *et al.*, 2010). Etant donné que les mécanismes des horloges sont génétiques et se nichent donc au cœur des cellules, l'émergence de rythmes à l'échelle physiologique ne peut se faire pour un organe multicellulaire sans une synchronie des cellules au niveau tissulaire, ce qui met en jeu des mécanismes de **couplage** cellulaire. Ainsi lorsque le tissu est étudié en culture, des phénomènes tels que la mort ou la désynchronisation cellulaire aboutissent à l'amortissement du rythme d'ensemble au même titre que l'arrêt progressif du mécanisme de l'horloge lui-même. C'est typiquement le cas de fibroblastes en culture qui expriment un rythme d'ensemble qui s'amortit très rapidement, alors que le suivi de cellules individuelles indique que leurs rythmes se maintiennent mais se désynchronisent progressivement les uns des autres (Nagoshi *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2004).

I.1.B.c / Phénomènes rythmiques remarquables

D'une manière tout à fait intéressante, la sensibilité d'une horloge à un Zeitgeber varie en fonction du moment du cycle (Hastings and Sweeney, 1958; Pittendrigh, 1958) : ainsi, un créneau de lumière pourra provoquer aussi bien un retard qu'une avance de phase du rythme d'activité locomotrice d'un animal placé en DD selon qu'il sera délivré à un moment correspondant au début ou à la fin de la "nuit interne" (la nuit subjective) de l'animal. Ce phénomène souligne que les transitions nuit/jour et jour/nuit sont des moments cruciaux de la remise à l'heure des horloges circadiennes, tout en permettant une mesure de la durée du jour qui sert à l'entraînement des rythmes saisonniers. En enregistrant l'amplitude et la direction de la réponse à un Zeitgeber délivré à différents moments du cycle endogène, il est possible de tracer une **courbe de réponse de phase** (illustrée dans la **Figure 3**).

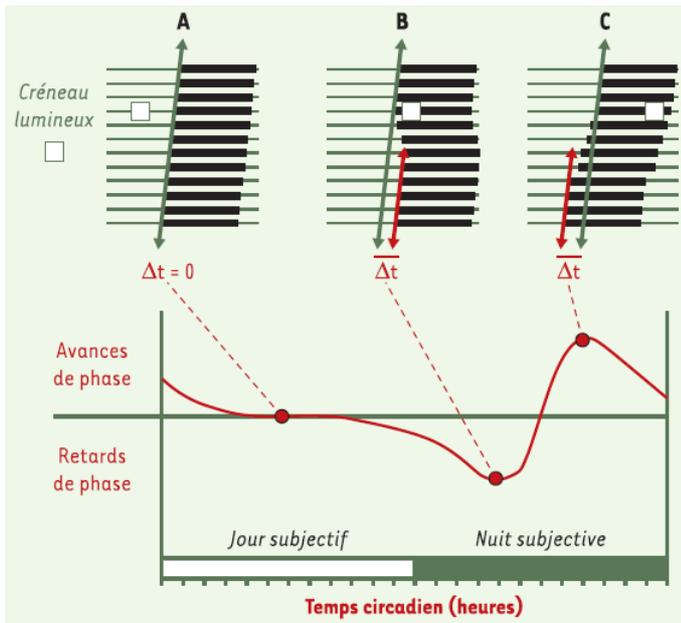


Figure 3 : Courbe de réponse de phase. (Dardente, 2008)

Profil type de réponse du rythme circadien d'activité locomotrice (en termes de direction et d'intensité de son décalage de phase) à l'administration d'un même créneau de lumière à différents moments de son cycle endogène (lorsque l'animal est en obscurité constante).

Un autre phénomène intéressant est le **masquage**, qui consiste en une réponse à un Zeitgeber qui n'est pas sous-jacente à un déphasage de l'horloge mais qui est due à un effet direct du Zeitgeber (sans passer par l'horloge). Concrètement, ce serait par exemple un arrêt de l'activité locomotrice de rongeurs nocturnes de laboratoire immédiatement à l'allumage de la lumière après un décalage du cycle lumière/obscurité (ou cycle LD), alors qu'il faut plusieurs jours à l'horloge pour se resynchroniser sur le nouveau cycle (**Figure 2**). (Daan, 2010; Kuhlman *et al.*, 2007)

I.2 / Une horloge, des horloges

Qui est capable d'anticiper les variations cycliques de son environnement bénéficie sans conteste d'un avantage adaptatif, puisqu'à chaque moment sa physiologie et son comportement sont les plus adéquats. Les possesseurs d'horloges biologiques en sont les heureux bénéficiaires, et il s'agit en fait de presque tous (si ce n'est tous, la recherche le dira !) les organismes vivants, des cyanobactéries aux humains. Bien au-delà de la possibilité d'anticipation qu'il offre, de nombreuses espèces animales se servent aussi de cet outil pour continuer à s'orienter par rapport au soleil... lorsque le soleil n'est pas visible. Ceci avait été évoqué dès 1950 chez les abeilles (von Frisch, 1950) et les oiseaux (Kramer, 1950), et même pressenti chez les fourmis dès 1913 (Santschi, 1913). Pour la petite histoire, il a d'ailleurs été récemment montré que les papillons monarques (*Danaus plexippus*) n'ont pas de système de navigation géo-magnétique comme beaucoup d'autres espèces migratrices, mais qu'ils utilisent exclusivement la position du soleil pour maintenir leur cap (Mouritsen *et al.*, 2013). Le soleil étant un indice mouvant, le maintien de la direction du vol se fait par corrélation entre la position du soleil et l'heure de la journée (donnée par l'horloge interne) !

Concernant le genre humain, des dysfonctionnements des horloges biologiques sont impliqués dans un large spectre de pathologies (troubles du sommeil, diabète, cancer, trouble bipolaire, ...) (Takahashi *et al.*, 2008) et les enjeux de la chronobiologie concernent le médical (la chronothérapie), le social (la réglementation concernant les rythmes de travail), mais aussi la recherche elle-même qui se doit dans toute expérimentation de prendre en compte le paramètre "rythmes biologiques".

Dans la suite de cette introduction, je me limiterai à la présentation des connaissances propres aux mammifères, et en particulier à nos dévoués rongeurs.

I.2.A / Le grand maître horloger

Des rythmes générés de manière endogène, oui, mais où ? Pittendrigh eut dès le départ l'intuition d'un "pacemaker" (Pittendrigh, 1960) alors que la tendance générale était à envisager une capacité diffuse émanant de l'ensemble de l'organisme. Ce sont des expériences de lésion cérébrale qui donnèrent les premiers indices de la localisation de l'horloge biologique (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972), mais ce sont des expériences d'isolement *in vivo* (Inouye and Kawamura, 1979), puis de transplantation qui en apportèrent la preuve définitive (Ralph *et al.*, 1990) : il s'agit d'une paire de noyaux hypothalamiques disposés bilatéralement de part et d'autre du 3^{ème} ventricule juste au-dessus du chiasma optique, les **noyaux suprachiasmatiques (SCN)** (Figure 4) dont je vais présenter une vue simplifiée (et donc incomplète) de manière à avoir suffisamment d'informations pour en faire un point de repère pour mes travaux de thèse sans pour autant en faire la synthèse bibliographique exhaustive.

Figure 4 : Position des SCN dans le cerveau. (Panda *et al.*, 2002a)

Sur cette coupe frontale de cerveau de rongeur, les SCN sont représentés en rouge.

LV = ventricule latéral

3V = troisième ventricule

opt = tractus optique

SCNvl = partie ventro-latérale du SCN

SCNdm = partie dorso-médiane du SCN.

Dès 1982 l'activité électrique des SCN fut enregistrée *in vitro* et révéla un pattern circadien de décharge (Green and Gillette, 1982; Groos and Hendriks, 1982), offrant un outil précieux pour l'étude du fonctionnement de l'horloge au niveau tissulaire (Herzog *et al.*, 1997). Il fut ainsi montré que la majorité des cellules des SCN sont des oscillateurs autonomes (Welsh *et al.*, 1995) mais couplés : lorsque les cellules sont cultivées de manière dissociée, les périodes de leurs rythmes de décharge sont plus dispersées que lorsqu'elles sont maintenues en explant (Herzog *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2004), soulignant que de la coordination des cellules dépend la précision du rythme généré au niveau tissulaire (Herzog *et al.*, 2004). Les progrès apportés par les enregistrements en bioluminescence, qui permettent de suivre directement la machinerie moléculaire de l'horloge, montrèrent plus tard que plus la densité des cellules est élevée, plus la proportion de cellules oscillantes est importante (Webb *et al.*, 2009), soulignant que de la coordination des cellules dépend la robustesse du rythme généré au niveau tissulaire. Ainsi, les propriétés des SCN émergent du couplage d'entités oscillantes autonomes afin de synchroniser les composants du réseau, de renforcer leurs oscillations et d'augmenter leur précision et leur robustesse (Welsh *et al.*, 2010). La coordination entre les cellules se fait par une communication synaptique et par un couplage électrique à travers des jonctions communicantes. Les principales molécules de couplage libérées sont des neuropeptides (VIP (vasoactive intestinal peptide), AVP (arginine vasopressine), GRP (gastrin-releasing peptide), ...) et le neurotransmetteur GABA (acide γ -aminobutyrique) (Granados-Fuentes and Herzog, 2013).

Les SCN sont de petits noyaux constituées d'environ 10 000 neurones chacune, mais néanmoins subdivisées en plusieurs sous-régions : une partie ventrolatérale appelée **cœur** et une partie dorsomédiane appelée **coquille**, les cellules de la coquille étant maintenues en phase par la partie cœur (Yamaguchi *et al.*, 2003). Cependant, la coquille est en avance de phase par rapport au cœur en terme d'expression génique, les pics d'expression de *Per1* et *Per2* formant une vague qui se propage de la coquille vers le cœur (Foley *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2003; Yan and Okamura, 2002). Une étude avait très tôt proposé que la coquille exprime une

horloge robuste (dont le rôle est de battre la mesure pour tout l'organisme), tandis que le cœur exprime une horloge plus facilement perturbable (et ainsi capable d'intégrer les informations synchronisantes entrant dans les SCN pour les transmettre à la coquille) (Yan *et al.*, 1999). Et effectivement, les rythmes de la coquille sont plus robustes que ceux du cœur, mais c'est le cœur qui répond à la lumière (Hamada *et al.*, 2001; Shigeyoshi *et al.*, 1997; Yan and Okamura, 2002). De plus, lorsque les deux sous-régions sont artificiellement découplées par un protocole de décalage de phase abrupte, le cœur se resynchronise rapidement sur le nouveau cycle LD tandis que la coquille met 6 à 13 jours pour se remettre à l'heure (Nagano *et al.*, 2003), une désynchronisation interne temporaire qui suggère un mécanisme pour les symptômes physiologiques qui surviennent chez l'Homme lors d'un jet lag (une traversée rapide des fuseaux horaires) (Nakamura *et al.*, 2005) et qui pourrait reposer sur une action différentielle du GABA dans les deux régions (Albus *et al.*, 2005).

Ces deux sous-régions sont composées de neurones qui se distinguent par leur contenu neurochimique (Figure 5) : les neurones du cœur expriment le VIP, le GRP, la neurotensine et la calrétinine tandis que ceux de la coquille expriment l'AVP, l'angiotensine II et la met-enképhaline ; une grande majorité co-exprime également le GABA, et quelques uns le glutamate (Welsh *et al.*, 2010). Le VIP est le neuropeptide le plus important pour le maintien de la synchronie des cellules et de l'amplitude des rythmes (une action complétée par l'AVP et le GRP), tandis que le GABA a un rôle essentiel dans la communication entre les parties dorsale et ventrale des SCN (Slat *et al.*, 2013).

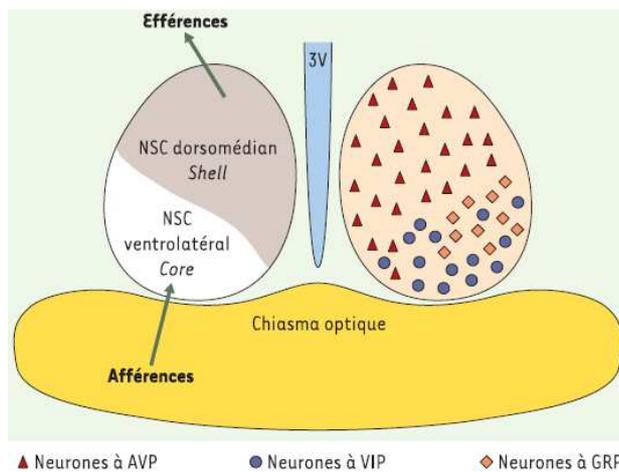


Figure 5 : Représentation schématique simplifiée de l'organisation anatomo-chimique des SCN. (Dardente and Cermakian, 2005)

NSC = Noyau SupraChiasmatic

3V = 3^{ème} ventricule

La partie cœur des SCN est localisée ventrolatéralement, elle reçoit les afférences et exprime les neuropeptides VIP et GRP.

La partie coquille est dorsomédiane, elle envoie les efférences des SCN et exprime le neuropeptide AVP.

C'est la partie cœur qui reçoit les afférences issues de la rétine qui véhiculent les informations **photiques** (ayant trait à la lumière). Cette transmission se fait par une voie directe, appelée **tractus rétinohypothalamique**, de projections rétinienne qui libèrent du glutamate et du PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide). La voie de transduction de ce signal débute par une augmentation intracellulaire de calcium qui aboutit à l'activation de toute une cascade de kinases (CaMK (calcium/calmodulin-protein kinases), MAPK (mitogen-activated protein kinases) et PKA (protein kinase A) notamment). Au bout de la chaîne, l'activation par phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein) aboutit à l'expression de gènes qui portent une séquence CRE (cAMP response element) dans leur promoteur et à l'entraînement de l'horloge moléculaire (qui sera abordé dans le **paragraphe I.3.A.d** /). (Welsh *et al.*, 2010)

La partie coquille, elle, transmet la pulsation à tout l'organisme en distribuant directement et indirectement des signaux rythmiques de nature humorale (mélatonine et glucocorticoïdes essentiellement) et nerveuse (système autonome essentiellement). La principale voie de distribution du message circadien contacte indirectement la glande pinéale (ou épiphyse) qui synthétise exclusivement de nuit la **mélatonine**, une hormone largement distribuée dans tout l'organisme et dont la liposolubilité lui

permet de traverser les membranes cellulaires et de diffuser dans les tissus. De ce fait, l'épiphyse émet un unique signal qui apporte deux informations temporelles : le moment de la journée (le fait qu'il fasse nuit) et le moment de l'année (codé par la durée de la nuit). (Pevet and Challet, 2011)

La subdivision dorso-ventrale des SCN n'est pas l'unique, il existe aussi une subdivision antéro-postérieure (Jagota *et al.*, 2000) qui encode la durée de la photopériode (la durée de la phase de lumière dans la journée) : plus la photopériode est longue, plus le décalage de phase entre la partie antérieure et la partie postérieure augmente (Hazlerigg *et al.*, 2005; Inagaki *et al.*, 2007).

Il est possible de découpler les SCN droit et gauche : chez le hamster, des comportements biphasiques peuvent être induits par la condition LL (un phénomène dit de "splitting") (Shibuya *et al.*, 1980), et dans certains cas ce phénomène se traduit par des rythmes en opposition de phase entre les SCN droit et gauche (de la Iglesia *et al.*, 2000) ainsi qu'entre sous-régions dans chaque SCN (Yan *et al.*, 2005). Ce phénomène a également pu être reproduit chez la souris (Ohta *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré que les activités électriques des SCN droit et gauche du rat sont en léger déphasage en condition LD 12/12 (Schaap *et al.*, 2001; Zhang and Aguilar-Roblero, 1995).

1.2.B / Un réseau d'horloges

L'horloge des SCN est considérée comme l'horloge centrale, ou principale, mais c'est en fait tout un réseau d'horloges, considérées comme périphériques ou secondaires, qui existe au sein de l'organisme (**Figure 6**). Pittendrigh avait déjà la vision d'un système multi-oscillant en 1960 : il proposait que de multiples oscillateurs soient sous l'entière dépendance d'une horloge pacemaker qui n'avait alors pas encore été localisée (Pittendrigh, 1960).

Le cerveau lui-même ne se limite pas à une seule horloge mais renferme une multitude d'oscillateurs et d'horloges (Abe *et al.*, 2002; Feillet *et al.*, 2008; Guilding and Piggins, 2007) dont la rétine et les bulbes olfactifs (Abraham *et al.*, 2005) sont les exemples les plus flagrants. En fait, la plupart des tissus et organes possèdent leur propre horloge, ou au moins un oscillateur, dévouée à la régulation des rythmes locaux et sensible à des Zeitgeber pertinents pour elle (Stratmann and Schibler, 2006). Ainsi par exemple, l'horloge de la rétine est directement entraînée par la lumière (Tosini and Menaker, 1996) et contrôle le traitement local de l'information visuelle (Storch *et al.*, 2007), alors que l'horloge du foie contrôle le métabolisme du glucose (Lamia *et al.*, 2008) et est entraînée par la prise alimentaire, à tel point qu'il est possible avec un protocole alimentaire inversé (la nourriture n'est disponible que de jour, lorsque les rongeurs nocturnes sont habituellement inactifs) de lui faire suivre une phase complètement différente de celle que lui indiquent les SCN (Damiola *et al.*, 2000; Stokkan *et al.*, 2001).

Certains de ces oscillateurs secondaires (foie, poumon, ...) sont capables de fonctionner en autonomie, en l'absence des SCN, avec leur période et leur phase propres (Yoo *et al.*, 2004). Les SCN ont finalement plus un rôle de chef d'orchestre que de grand maître horloger, dans la mesure où ils coordonnent les autres horloges de sorte que l'ensemble des rythmes physiologiques soient en harmonie. Mais parmi les structures oscillantes ils sont particulièrement robustes, en culture ou face à diverses perturbations (mutation, perte de la synchronie interne) (Mohawk and Takahashi, 2011).

Dans ce réseau d'horloges, la rétine a une place toute particulière puisqu'elle se situe en amont des SCN : c'est elle qui perçoit l'information lumineuse de l'environnement et la transmet à l'horloge des SCN (cf. **paragraphe 1.2.A /**). La rétine en tant qu'horloge sera décrite plus largement dans le **paragraphe III /**.

Figure 6 : Réseau de distribution des signaux rythmiques pour la coordination des horloges. (Dibner *et al.*, 2010)

I.3 / L'horloge moléculaire : robustesse et souplesse

Si la rythmicité des horloges émerge au niveau tissulaire, leur origine se situe au cœur des cellules. Dans un organe, la plupart des cellules portent en elles la machinerie oscillante, et c'est de leur synchronisation que naît une rythmicité d'ensemble.

I.3.A / Un mécanisme génétique

Le mécanisme de l'horloge des SCN est celui qui est le mieux connu, et ceux des autres horloges sont essentiellement similaires. Ce mécanisme, initialement identifié chez la drosophile (Hardin *et al.*, 1990), est basé sur des boucles de rétrocontrôle transcriptionnel qui mettent en jeu des **protéines horloge** codées par

des **gènes horloge** (Ripperger and Brown, 2010). Alors que l'identification du premier gène horloge (*Period*) fêtait chez la drosophile son 10^{ème} anniversaire, le même travail aboutissait à l'identification de *Clock* (circadian locomotor output cycles kaput), l'un des gènes centraux de l'horloge des mammifères (Antoch *et al.*, 1997; King *et al.*, 1997; Vitaterna *et al.*, 1994).

I.3.A.a / Une boucle centrale de rétrocontrôle direct

La boucle centrale de l'horloge (**Figure 7**) est constituée des protéines **CLOCK** et **BMAL1** (brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)-like, aussi appelée ARNTL, ou MOP3) ou **NPAS2** (Neuronal PAS (Per Arnt Sim) domain protein, ou MOP4) dont les hétérodimères activent la transcription des gènes *Per1-3* et *Cry1-2* (*Cryptochrome*) via des séquences "boîte E" (séquence consensus : CACGTG). Les protéines PER et CRY forment des dimères qui sont adressés au noyau où ils répriment directement l'activité transcriptionnelle des dimères CLOCK/BMAL1 et CLOCK/NPAS2 et donc leur propre expression. Grâce aux mécanismes de dégradation des ARNm et des protéines, la diminution de la quantité de dimères PER/CRY entraîne une levée d'inhibition et le démarrage d'un nouveau cycle. (Ripperger and Brown, 2010)

Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire de l'horloge. (Nader *et al.*, 2010)

L'hétérodimère CLOCK/BMAL1 se lie aux séquences "boîte E" localisées dans la région promotrice des gènes horloge *Per* et *Cry* et stimule leur expression (i). Les facteurs de transcription PER et CRY forment un complexe et sont phosphorylés par les caséines kinases 1 ϵ et 1 δ (ii), puis répriment en retour l'activité transcriptionnelle des hétérodimères CLOCK/BMAL1 en inhibant leur liaison aux séquences "boîte E". Les dimères CLOCK/BMAL1 stimulent également l'expression d'autres protéines horloge, les REV-ERB et les ROR, qui créent une boucle auxiliaire qui participe à la stabilisation et à la régulation de la boucle principale (iii). Enfin, les différents facteurs de transcription horloge contrôlent l'expression de nombreux gènes de sortie de l'horloge et influencent ainsi une large variété de processus biologiques (iv).

Ce mécanisme génère une oscillation de la production des ARNm *Per* et *Cry* et de leurs protéines dont la périodicité est proche de 24 h (Figure 8). Un tel délai ne peut s'expliquer simplement par le temps nécessaire aux processus de transcription et de traduction qui ne sont habituellement que d'une ou deux heures, de même que la robustesse, la précision et la fiabilité des rythmes circadiens ne peuvent reposer uniquement sur un système aussi fragile (Elowitz and Leibler, 2000). Il est nécessaire d'opérer un délai dans le rétrocontrôle négatif (Stricker *et al.*, 2008) (et en effet les pics de production des protéines PER sont retardés de 6 h par rapport au pic de production de leurs ARNm (Field *et al.*, 2000)), ainsi qu'une stabilisation de la boucle contre les perturbations indésirables et l'amortissement (Tigges *et al.*, 2009). Ceci passe par l'interconnexion de l'élément positif de la boucle centrale avec une seconde boucle de transcription/traduction ainsi que par une multitude de processus de régulation aux niveaux post-transcriptionnel, post-traductionnel, épigénétique, ...

Figure 8 : Cinétiques d'expression de gènes horloge et de leurs protéines respectives. (Morse and Sassone-Corsi, 2002)

(b) Dans les SCN de la souris, les transcrits *Per* et *Bmal1* oscillent à peu près en antiphase. Les protéines PER et BMAL1 oscillent également, mais le rythme de la protéine PER est largement décalée du rythme de son transcrit.

(c) Dans le foie, les mêmes composants oscillent, mais leurs pics d'expression sont retardés par rapport à leurs rythmes dans les SCN.

Les barres blanches et noires au-dessus des graphiques indiquent respectivement les phases de jour et de nuit.

I.3.A.b / Un rouage secondaire

La boucle secondaire assure le contrôle rythmique de l'expression de *Bmal1* (Figure 7) : les récepteurs nucléaires **REV-ERB α - β** (reverse viral erythroblastis oncogene product) et **ROR α - γ** (retinoic acid-related orphan receptor) répriment et activent respectivement l'expression de *Bmal1* par fixation compétitive sur les mêmes séquences RRE (retinoic acid-related orphan receptors element). Et pour que la boucle soit bouclée, les dimères CLOCK/BMAL1 ou CLOCK/NPAS2 activent la transcription de *Rev-Erb* et *Ror* avant d'être réprimés par PER et CRY. Ainsi, l'ensemble des gènes du cœur de la machinerie horlogère ont une expression rythmique en cascade, à l'exception de *Clock* qui n'oscille pas ou peu. (Ripperger and Brown, 2010)

Certains gènes sont associés de près au mécanisme moléculaire de l'horloge et en sont parfois considérés comme partie intégrante. Il s'agit principalement des gènes *Dec1-2* (differentially-expressed in chondrocytes) qui codent des facteurs de transcription. DEC1 est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle des dimères CLOCK/BMAL1 en entrant en compétition avec eux pour la fixation sur les séquences "boîtes E" et/ou en dimérisant avec BMAL1 (Li *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004), et son expression rythmique est directement contrôlée par CLOCK/BMAL1 (Grechez-Cassiau *et al.*, 2004; Kawamoto *et al.*, 2004). Il s'agit aussi de *Timeless*, dont la protéine TIM est capable d'interagir avec les protéines PER et CRY (Barnes *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2000; Kume *et al.*, 1999). Le classement de ces entités comme constituants de l'horloge ou

comme éléments associés n'est cependant pas encore clairement tranché (Dardente and Cermakian, 2007). Deux groupes d'équipes ont tout récemment identifié un gène rythmique, appelé *Chrono* pour "computationally highlighted repressor of the network oscillator", comme un nouvel acteur de la machinerie moléculaire circadienne et qui pourrait venir très vite agrandir la famille des gènes du cœur de l'horloge. En effet, la protéine CHRONO se lie à BMAL1 et réprime l'activité transcriptionnelle de CLOCK/BMAL1, prenant place dans une boucle de rétrocontrôle négatif indépendante de *Cry2*. (Anafi *et al.*, 2014; Goriki *et al.*, 2014)

Si le principe de base du mécanisme est le même dans les horloges et oscillateurs secondaires, la redondance des gènes horloge fait que leur composition peut varier d'un tissu à l'autre. Ainsi par exemple, le profil d'expression des gènes *Ror* est très dépendant du tissu considéré (Guillaumond *et al.*, 2005) : *Rorb* est exprimé exclusivement dans le système nerveux central (Carlberg *et al.*, 1994) (et notamment de manière circadienne dans la rétine (Schaeren-Wiemers *et al.*, 1997)) alors que *Rory* est exprimé dans certains tissus périphériques (Hirose *et al.*, 1994). CLOCK et NPAS2 peuvent se substituer l'un à l'autre dans les SCN (DeBruyne *et al.*, 2007a), mais NPAS2 semble indispensable dans le cerveau antérieur (Reick *et al.*, 2001) lorsque c'est CLOCK qui semble indispensable dans le foie et le poumon (DeBruyne *et al.*, 2007b). Enfin, *Per3* semble avoir un rôle minime dans la machinerie horlogère des SCN mais une place importante dans celles de la rétine, des poumons et de la glande pinéale (Pendergast *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012).

Il existe également un gène *Bmal2* (ou *Arntl2* ou *Mop9*), mais il semble qu'il n'ait pas de rôle dans l'horloge centrale (Okano *et al.*, 2001) et, bien que BMAL2 puisse former des dimères avec CLOCK et NPAS2 (Hogenesch *et al.*, 2000), sa capacité à se substituer à BMAL1 pour la fonction circadienne reste à confirmer (Bunger *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2010).

I.3.A.c / Une armada de mécanismes de régulation

Les événements post-traductionnels qui surviennent sur les protéines horloge sont tout aussi fondamentaux au fonctionnement harmonieux de l'horloge moléculaire que les phénomènes transcriptionnels (Vanselow and Kramer, 2010). Il est notamment particulièrement crucial que les répresseurs (PER et CRY) n'entrent pas trop tôt dans le noyau (pour que l'horloge ne tourne pas trop vite) et soient suffisamment dégradés une fois leur rôle répressif exercé (pour que l'horloge ne reste pas bloquée et puisse amorcer un nouveau cycle).

Le mécanisme de régulation post-traductionnel le mieux étudié est la dynamique de phosphorylation / déphosphorylation, qui concerne la majorité des protéines horloge (Reischl and Kramer, 2011; Vanselow and Kramer, 2010). Il a notamment été montré que l'équilibre de phosphorylation / déphosphorylation des protéines PER est l'élément central du contrôle de la période de l'horloge moléculaire (Lee *et al.*, 2011), un processus au cours duquel les **caséines kinases (CK) 1δ et 1ε** (des sérine / thréonine kinases) et leur antagoniste la protéine phosphatase 1 (PP1) sont sur le devant de la scène de par leur implication majeure dans la régulation temporelle et spatiale des protéines PER : la phosphorylation des protéines PER par les CK1δ et 1ε régule leur adressage au protéasome (Akashi *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2001; Eide *et al.*, 2005) comme au noyau (Takano *et al.*, 2004a), tandis que les déphosphorylations effectuées par la PP1 stabilisent la protéine PER2 et favorisent son accumulation nucléaire (Gallego *et al.*, 2006; Schmutz *et al.*, 2011).

C'est pour cela que les changements dans la dynamique spatio-temporelle de la vie des protéines PER, tout comme le dysfonctionnement des CK1δ et 1ε, conduisent à des modifications de la cinétique de l'horloge. C'est le cas de la **mutation tau** observée chez le hamster doré avant même que le mécanisme moléculaire de l'horloge n'ait été dévoilé : les animaux présentant cette mutation spontanée ont une activité locomotrice d'une période raccourcie à 20 h (Ralph and Menaker, 1988). Cette mutation touche en fait le

gène de la CK1 ϵ (Lowrey *et al.*, 2000). Des phénotypes similaires ont été observés chez l'humain également, dans le cadre de pathologies appelées syndrome familial d'avance de phase du sommeil (Jones *et al.*, 1999). Deux mutations ont été décrites chez ces patients : l'une qui affecte la CK1 δ (Xu *et al.*, 2005) et l'autre qui touche un acide-aminé phosphoaccepteur (S662G) de la séquence de PER2 (Toh *et al.*, 2001) qui est justement une cible des CK1 δ et 1 ϵ . Un syndrome opposé, le syndrome familial de retard de phase du sommeil existe également, et consiste en une mutation qui touche la CK1 ϵ (Takano *et al.*, 2004b). Dans le cas des mutations S662G de PER2 et *tau*, les protéines PER sont plus rapidement éliminées du noyau (Dey *et al.*, 2005), entraînant une levée d'inhibition anticipée. Les mécanismes qui provoquent ces perturbations de phase sont encore mal compris, mais pourraient être dus à une perturbation spécifique des phosphorylations par les CK1 ϵ et 1 δ qui ciblent le contrôle de la localisation subcellulaire des protéines PER (Vanselow *et al.*, 2006).

De plus en plus de kinases et phosphatases sont décrites comme prenant part au ballet moléculaire qui gravite autour de l'horloge : CK2, GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), MAPK, AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase), jouant sur la stabilité des protéines horloge et sur leurs transferts entre le noyau et le cytoplasme (Reischl and Kramer, 2011; Vanselow and Kramer, 2010). Mais d'autres types de modifications des protéines horloge sont également mises en jeu, telles que l'ubiquitinylation, la sumoylation ou encore l'acétylation. L'ajout de chaînes d'ubiquitines est bien connu pour adresser les protéines au protéasome, et c'est par cette voie que les protéines horloge sont dégradées. La sumoylation et l'acétylation sont principalement décrites chez BMAL1 et PER2 et modulent leur stabilité et leur activité (Vanselow and Kramer, 2010). Il est à noter que CLOCK possède une activité histone-acétylase (Doi *et al.*, 2006) capable de cibler directement BMAL1, ce qui constitue une étape importante pour que CRY1 puisse y exercer son activité répressive (Hirayama *et al.*, 2007). Outre les modifications post-traductionnelles, les interactions des protéines horloge avec une pléthore de partenaires de tous types représentent un niveau supplémentaire de régulation : des facteurs et co-facteurs de transcription, des éléments de remodelage de la chromatine et autres protéines telles que NONO (Non-POU domain octamer-binding protein) ou CIPC (CLOCK-interacting protein circadian) (Ripperger and Brown, 2010; Vanselow and Kramer, 2010). L'ensemble de ces modifications contrôle la localisation, la dégradation, l'interaction avec des partenaires et l'activité des protéines horloge de sorte que chacune soit en mesure de jouer son rôle au bon endroit au bon moment.

Enfin, les dernières recherches se penchent sur les mécanismes post-transcriptionnels qui régissent la stabilité et la traduction des ARNm horloge (Kojima *et al.*, 2011). Finalement, l'ensemble de ces outils de régulation confère à l'horloge un mécanisme robuste, précis et résistant aux perturbations indésirables, à tel point qu'il est capable de rester stable face aux variations de température ou aux fluctuations globales du taux de transcription (Dibner *et al.*, 2009).

I.3.A.d / Ou comment entrer dans la boucle

Bien qu'armée pour résister à toute fluctuation du monde intracellulaire qui ne concernerait pas son mécanisme, l'horloge est influencée par des signaux qui véhiculent des informations synchronisantes pertinentes émanant de l'environnement ou d'autres cellules ou tissus qui lui sont plus ou moins éloignés.

Les gènes *Per1* et *Per2* sont les principales voies d'entrée de l'horloge moléculaire. Ainsi, un créneau de lumière induit dans les SCN l'expression de *Per1* dans un délai inférieur à 2 h, ainsi que celle de *Per2* dans un délai un peu plus long (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997). Ces inductions, ainsi que celles des protéines PER1 et PER2, présentent des profils temporels et spatiaux (dans les sous-régions des SCN) différents selon le moment où le créneau de lumière est appliqué (Yan and Silver, 2002, 2004). Cette

induction d'expression génique, qui résulte de la transmission des informations photiques par la rétine décrite au **paragraphe I.2.A /**, passe par l'activation par phosphorylation du facteur de transcription CREB (Gau *et al.*, 2002; Ginty *et al.*, 1993) et par son action sur les séquences CRE des promoteurs des gènes *Per* (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002). C'est ensuite tout le reste de la machinerie qui est entraîné. Des mécanismes similaires sont mis en œuvre par les signaux de couplage émis par les cellules des SCN (Ripperger and Brown, 2010). Les gènes *Per1* et/ou *Per2* sont également induits lors d'un choc sérique dans des fibroblastes en culture par exemple (Balsalobre *et al.*, 1998), dans le cœur (van der Veen *et al.*, 2012) et les fibroblastes (Balsalobre *et al.*, 2000a) par les glucocorticoïdes, ou encore dans la rétine par la lumière (Yujnovsky *et al.*, 2006).

Les gènes *Rev-Erb* et *Ror* sont également des voies d'entrée vers l'horloge moléculaire. L'expression de *Rev-Erb α* est ainsi modulée de manière dose-dépendante par les glucocorticoïdes (Torra *et al.*, 2000). L'interaction des facteurs REV-ERB et ROR avec leur ligand et différents co-facteurs (hème, NCoR (nuclear receptor corepressor complex) impliqué dans le remodelage de la chromatine, ou PGC-1 impliqué dans la régulation adaptative du métabolisme énergétique) peut modifier l'expression des autres gènes horloge et tisse des liens entre métabolisme énergétique et horloge (Liu *et al.*, 2007).

Outre la modification de la transcription des gènes horloge, les signaux d'entraînement de l'horloge peuvent affecter celle-ci en ciblant directement leurs protéines, avançant ou retardant ainsi les différents événements du cours de leur vie (cf. **paragraphe I.3.A.c /**). Que ce soit au niveau traductionnel ou post-transcriptionnel, de nombreux acteurs intracellulaires comme le calcium, l'AMPc et le GMPc (adénosine et guanosine 3',5'-monophosphate cyclique), des kinases (PKA, PKC (protéine kinase C), PKGII (protéine kinase dépendante du GMPc II), CaMK, MAPK) sont impliqués, mais l'intégralité des voies de signalisation est encore très loin d'être connue (Balsalobre *et al.*, 2000b; Golombek *et al.*, 2004; Ripperger and Brown, 2010).

I.3.A.e / Ou comment sortir de la boucle

Mais une horloge oscillant aussi régulièrement qu'un métronome pour elle-même n'aurait pas d'utilité : l'horloge doit donner le tempo à toute la cellule. Cette transmission peut s'effectuer directement par le contrôle de la transcription de **gènes dits de sortie de l'horloge** par les protéines horloge (CLOCK, NPAS2, BMAL1, REV-ERB α), puis par des transcriptions en cascade qui permettent de décliner les phases d'expression et les gènes cibles à loisir. Les études transcriptomiques montrent que 2 à 15 % du transcriptome d'une cellule est rythmique, mais que l'identité des gènes rythmiques varie beaucoup selon le tissu considéré (sauf en ce qui concerne l'essentiel des gènes horloge) (Miller *et al.*, 2007; Panda *et al.*, 2002b; Storch *et al.*, 2002). La rythmicité vient ainsi mettre son grain de sel dans l'expression de gènes impliqués dans tous types de fonctions cellulaires : cycle cellulaire, transports, métabolisme, réparation de l'ADN, détoxification, communication, etc. Outre le fait d'être la base d'une physiologie rythmique en synchronie avec l'environnement, ces rythmes d'expression offrent la possibilité de ségréger temporairement des processus cellulaires incompatibles (comme des voies métaboliques contraires), ou encore de restreindre des processus potentiellement délétères pour la cellule à un moment où leurs effets indésirables sont minimes (Dibner *et al.*, 2010).

Ainsi par exemple, le gène *arginine vasopressine* fut le premier identifié comme une cible directe de l'horloge grâce à la fixation de CLOCK/BMAL1 sur une séquence "boîte E" dans sa région promotrice (Jin *et al.*, 1999). L'arginine-vasopressine est une hormone bien connue pour sa participation au maintien de l'homéostasie hydrique en augmentant la réabsorption rénale de l'eau, mais c'est aussi un neuropeptide libéré de manière circadienne par les neurones des SCN pour moduler le taux de décharge des neurones voisins ainsi que ceux d'autres structures hypothalamiques et extra-hypothalamiques.

Le gène *Dbp* (D element-binding protein) est un autre gène de sortie de l'horloge : son rythme d'expression, de grande amplitude, est connu dans de nombreux tissus (SCN (Lopez-Molina *et al.*, 1997), foie (Wuarin and Schibler, 1990), rétine (Sakamoto *et al.*, 2000), fibroblastes (Yagita *et al.*, 2001), etc). C'est une cible directe de l'horloge capable de transmettre la rythmicité à d'autres gènes : son promoteur porte de multiples "boîtes E" sur lesquelles CLOCK et BMAL1 sont capables de se fixer (Ripperger and Schibler, 2006; Ripperger *et al.*, 2000) et sa protéine est un facteur de transcription (se fixant sur les séquences "boîte D") important pour le contrôle du rythme circadien d'activité locomotrice (Lopez-Molina *et al.*, 1997; Yamajuku *et al.*, 2011) ou pour la régulation des aspects circadien et homéostasique du sommeil (Franken *et al.*, 2000).

La transmission de la rythmicité ne passe pas forcément par une régulation rythmique de l'expression des gènes. Il existe bien des exemples de rythmes de protéines dont l'ARNm n'est pas rythmique : c'est par exemple le cas dans le foie murin, où la moitié des 20 % de protéines rythmiques du protéome ne présente pas de rythme des ARNm correspondants (Reddy *et al.*, 2006). La rythmicité peut se transmettre directement de protéine à protéine (via des régulations d'activité, de stabilité...), mais aussi via un contrôle rythmique de l'épissage, de la traduction et de la stabilité des ARNm (Kojima *et al.*, 2011). Ainsi, dans le foie murin toujours, plus de 70 % des ARNm qui sont rythmiques ne le sont pas suite à une transcription rythmique mais grâce à des mécanismes post-transcriptionnels (Koike *et al.*, 2012; Menet *et al.*, 2012). Une étude récente décrit un mécanisme intéressant basé sur la modulation de la longueur de la queue poly(A) des ARNm qui permet de faire varier leur expression en protéines alors même que leur quantité reste constante dans la cellule (Kojima *et al.*, 2012). Comment ? Grâce à une dynamique de polyadénylation/déadénylation par des enzymes sous contrôle circadien, et parce que la taille de sa queue poly(A) détermine le devenir d'un ARNm (stockage, dégradation). Ce système permet également de contrôler le délai entre la production de l'ARNm et celle de sa protéine.

I.3.A.f / Entrée, sortie, ou sac de nœuds ?

La distinction entre une entrée et une sortie d'horloge n'est pas toujours si nette, au niveau moléculaire comme au niveau tissulaire, parce qu'une sortie peut tout aussi bien constituer également une entrée (Hastings *et al.*, 2008; Roenneberg and Merrow, 1998). Au niveau comportemental par exemple, l'activité locomotrice, dont la rythmicité est contrôlée par l'horloge des SCN, exerce un rétrocontrôle sur cette dernière (Hughes and Piggins, 2012; Mrosovsky and Salmon, 1987). Au niveau tissulaire, la mélatonine produite de nuit sous le contrôle indirect des SCN, y exerce elle aussi un rétrocontrôle (Agez *et al.*, 2007; Cassone *et al.*, 1987; McArthur *et al.*, 1991). De la même façon, la signalisation dopaminergique de la rétine, qui est rythmique, est capable de moduler le potentiel transactivateur de CLOCK/BMAL1 (Yujnovsky *et al.*, 2006). Au niveau intracellulaire, le facteur de transcription DBP déjà présenté dans le paragraphe précédent (I.3.A.e /) comme une sortie de l'horloge, est capable d'activer la transcription de *Per1* de concert avec CLOCK et BMAL1 (Yamaguchi *et al.*, 2000). L'AMPc enfin est le parfait exemple de molécule qui constitue tout aussi bien une entrée qu'une sortie de l'horloge moléculaire (O'Neill and Reddy, 2012), à tel point que dans les SCN elle est présentée comme une partie intégrante du mécanisme de l'horloge par certains auteurs (O'Neill *et al.*, 2008; Wang and Zhou, 2010). Au niveau de la rétine comme des SCN, l'AMPc est produite rythmiquement via le contrôle par CLOCK/BMAL1 de l'expression de l'enzyme qui la synthétise, l'adénylate cyclase 1 (AC1) (Fukuhara *et al.*, 2004) et le **paragraphe I.3.A.d** / a déjà décrit combien CREB (un facteur de transcription phosphorylable par la PKA, elle-même activable par l'AMPc) est un acteur important des voies d'entrée de l'horloge. Dans ce contexte, il devient parfois difficile de définir les limites des boucles de rétrocontrôle associées au cœur de l'horloge.

Pour compliquer encore un peu ce schéma notons que, dans les tissus, certains rythmes peuvent être contrôlés directement par des signaux rythmiques n'émanant pas de l'horloge locale. Ainsi dans la rétine, une lésion des SCN entraîne la perte de rythmicité de certains ARNm tandis que pour d'autres cette rythmicité est maintenue, suggérant un partage du contrôle de la rythmicité par l'horloge locale et celle des SCN (Sakamoto *et al.*, 2000). De même lorsque l'horloge hépatique est localement invalidée, certains gènes continuent à être exprimés de manière rythmique (Kornmann *et al.*, 2007), ce qui laisse entrevoir des voies d'entraînement des machineries horlogères locales, mais aussi de potentiels courts-circuits de ces dernières.

Les horloges circadiennes biologiques rythment la vie du monde vivant, et leur importance est telle que leur mécanisme moléculaire est bardé de garde-fous : redondance entre les gènes horloge et entre leurs régulateurs, surenchère de régulation par des acteurs divers à tous les niveaux de la chaîne et de la vie des différents acteurs. Mais c'est également ce qui autorise des régulations si fines de ses rouages : chaque acteur met ses petites spécialités (partenaires, activités, ...) au service de la précision de l'ensemble. Les horloges ont ainsi cette incroyable dualité de rester insensibles aux grandes marées métaboliques intracellulaires mais de répondre de manière adéquate à la multitude de signaux qui permettent les coordinations rythmiques d'ensemble : au niveau des tissus, au niveau de l'organisme entier et finalement avec l'environnement extérieur. Parce que la vraie vie n'est pas un laboratoire où lumière, température, humidité, nourriture, interactions sociales, stimulations sensorielles,... sont contrôlées (pour ne pas dire limitées) !

I.3.B / Génétique, mais pas seulement

Les paragraphes précédents ont déjà démontré que les rythmes transcriptionnels sont loin de porter à eux seuls la responsabilité du mécanisme moléculaire de l'horloge. Avec le temps, la part prépondérante prise par les boucles transcriptionnelles dans la recherche des mécanismes cellulaires d'horloge a laissé place à la mise au jour de nouveaux mécanismes, souvent complémentaires aux boucles de transcription/traduction, parfois même les rendant obsolètes. Je voudrais conclure cette introduction sur les rythmes en présentant quelques uns de ces systèmes oscillants plus exotiques, pour le seul plaisir de se décentrer un peu du modèle d'horloge largement décrit.

En 2005, un oscillateur circadien a été reconstitué dans un tube à essai (Nakajima *et al.*, 2005), en présence seulement d'ATP (adénosine 5'-triphosphate) et des protéines horloge de la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* : KaiA, KaiB et KaiC. Cet oscillateur consistait en un cycle circadien de phosphorylation / déphosphorylation de KaiC qui s'est révélé thermiquement compensé. Peu de temps auparavant la même équipe avait montré que cette oscillation se produisait *in vivo* en l'absence de toute transcription et traduction (Tomita *et al.*, 2005). Il est donc proposé que le mécanisme central de l'horloge de *Synechococcus elongatus* repose sur ce cycle.

Une étude récente (Edgar *et al.*, 2012) révèle un autre mécanisme très intéressant : celui de cycles circadiens d'oxydation/réduction de protéines peroxyrédoxines chez des représentants des trois axes phylogénétiques : archéobactéries (*Halobacterium salinarum*), bactéries (*Synechococcus elongatus*) et eucaryotes (*Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* et *Neurospora crassa*). Deux études antérieures avaient d'ailleurs mis en évidence ces mêmes cycles dans des fibroblastes murins (NIH3T3 et fibroblastes embryonnaires) et dans les érythrocytes humains (alors que ces cellules ont la particularité d'être dépourvues de noyau) (O'Neill and Reddy, 2011), ainsi que chez *Ostreococcus tauri* dans des conditions qui

empêchent toute transcription (O'Neill *et al.*, 2011). Ces cycles sont étroitement liés à ceux de l'horloge transcriptionnelle, mais les deux oscillateurs ne sont pas indispensables l'un à l'autre, et les auteurs suggèrent que ces rythmes métaboliques pourraient avoir émergé avant l'horloge transcriptionnelle et avoir ensuite co-évolué avec elle au fil des embranchements de l'évolution. Dans les cellules nucléées, ils pourraient permettre le maintien de la rythmicité lors d'un arrêt temporaire de la machinerie transcriptionnelle (durant la division cellulaire, ou encore dans des conditions environnementales défavorables pour les organismes unicellulaires).

Chez les mammifères, un oscillateur qui n'emploie pas les gènes horloge canoniques permet de restaurer un rythme circadien d'activité locomotrice chez des souris mutantes pour différents gènes horloge, en réponse à la méthamphétamine (Mohawk *et al.*, 2009) ! Cet oscillateur, à l'énigmatique nom de MASCO (methamphetamine-sensitive circadian oscillator), n'a pas encore été localisé (mais se situe vraisemblablement en-dehors des SCN), tout comme sa fonction naturelle (en l'absence de méthamphétamine) demeure inconnue.

Toutes ces fascinantes trouvailles font à la recherche sur les rythmes circadiens la promesse de beaux et longs jours...

II / La rétine de mammifère à la loupe

Quittons un instant le monde des rythmes pour nous intéresser à la rétine, ce tissu qu'affectionnait tant Santiago Ramón y Cajal et auquel il consacra en 1888, avec le cervelet, ses premiers travaux de description du système nerveux grâce à la technique de coloration argentique mise au point par son contemporain Camillo Golgi (voir la **Figure 22** p. 50 de ce manuscrit : un dessin de rétine de la main de Ramón y Cajal). Il publia en français un mémoire entièrement consacré à la rétine dans le journal *La Cellule* en 1893 : *“La rétine des Vertébrés”* (Ramón y Cajal, 1893), et s'appuya sur les travaux qu'il fit sur la rétine pour défendre sa doctrine du neurone qu'il s'efforçait de faire admettre à l'époque (Piccolino, 1988).

II.1 / La rétine au x20 : vue d'ensemble

La rétine est un tissu neurosensoriel qui tapisse le fond de l'œil et que Ramón y Cajal décrit ainsi lors du discours qu'il prononça à la réception de son prix Nobel de physiologie ou médecine (partagé avec Golgi) en 1906 (Ramón y Cajal, 1967) :

“In spite of its great complication, the retina can be considered as a nerve ganglion formed by three rows of neurons or nerve corpuscles: the first row encloses the rods and cones with their descending prolongations forming the external granular layer; the second is made up of the bipolar cells and the third contains the ganglionic neurons”

II.1.A / Structure de la rétine neurale

La rétine neurale est un tissu fin (environ 200 µm d'épaisseur chez la souris) constitué de trois couches nucléaires (formées des corps cellulaires des neurones) intercalées de deux couches plexiformes (formées des prolongements neuronaux et des contacts synaptiques) (**Figure 9**). La **Figure 10**, de même que la **Figure 9**, servira de référence visuelle pour l'ensemble des paragraphes de description de la rétine en vue d'ensemble (**section II.1 /**).

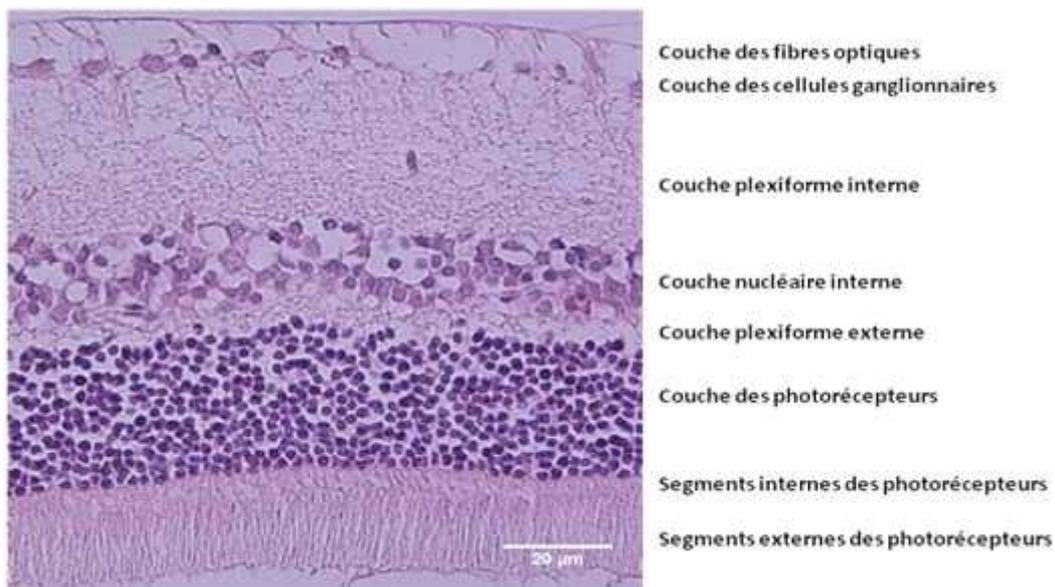


Figure 9 : Rétine de rat Wistar en coupe transversale.
Coloration histologique à l'éosine et l'hématoxyline. Barre d'échelle = 20 µm.

Figure 10 : Globe oculaire humain et rétine en coupe transversale. D'après (Bear *et al.*, 2007) et (Purves *et al.*, 2011)
Remarque : la rétine de rat et de souris ne comporte pas de fovéa comme chez l'Homme.

II.1.A.a / Couches nucléaires

La couche la plus externe par rapport au centre du globe oculaire est aussi la plus épaisse : c'est la **couche des photorécepteurs (PRL)**. Ses cellules sont de deux types : les cônes et les bâtonnets. Ce sont des cellules photosensibles chargées du captage des photons et de l'élaboration de l'influx nerveux véhiculant les informations photiques. Cette couche comprend, de l'extérieur vers l'intérieur (Rodieck, 2003) :

- une sous-couche formée des **segments externes** des photorécepteurs : ce sont les structures spécialisées dans la photoréception
- une sous-couche formée des **segments internes** des photorécepteurs : ce sont les structures qui assument l'essentiel de la biochimie des photorécepteurs, notamment pour produire en continu les constituants des segments externes qui sont renouvelés en permanence. Les segments internes sont rattachés aux segments externes par un cil connecteur.
- la **couche nucléaire externe** comportant de nombreuses couches superposées de corps cellulaires de photorécepteurs

La couche médiane est curieusement appelée **couche nucléaire interne (INL)**. Elle comporte les cellules bipolaires chargées de relayer les informations entre les deux autres couches, mais aussi les cellules horizontales et amacrines. Les cellules horizontales sont situées sur la face externe de l'INL et modulent les informations entrantes, tandis que les cellules amacrines sont localisées sur la face interne de l'INL et modulent les informations sortantes. Cette couche contient également les corps cellulaires des cellules de

Müller (les principales cellules gliales de la rétine) dont les prolongements s'étendent de part et d'autre de l'INL à travers toute l'épaisseur de la rétine. (Rodieck, 2003)

Enfin, la couche la plus interne est une monocouche : c'est la mal-nommée **couche des cellules ganglionnaires (GCL)** car elle contient plus de cellules amacrines dites déplacées (près de 60% chez la souris (Jeon *et al.*, 1998)) que de cellules ganglionnaires. Les cellules ganglionnaires sont chargées de transférer les informations lumineuses de la rétine vers les autres structures cérébrales. Elles ont un long axone qui court le long de la face interne de la GCL et s'assemble aux autres pour former la couche des fibres optiques qui devient le nerf optique après avoir traversé l'épaisseur de la rétine en un unique point de passage appelé papille optique. (Rodieck, 2003)

II.1.A.b / Couches plexiformes

La **couche plexiforme externe (OPL)** est située entre la PRL et l'INL. C'est une couche très fine où a lieu la transmission des informations photiques des photorécepteurs vers les cellules bipolaires, mais aussi une modulation de cette transmission par les cellules horizontales. (La Cour and Ehinger, 2005)

La **couche plexiforme interne (IPL)** est située entre l'INL et la GCL. C'est une couche épaisse où les informations des cellules bipolaires sont modulées par les cellules amacrines et transmises aux cellules ganglionnaires. Elle est hiérarchisée en plusieurs niveaux de sous-couches où les contacts synaptiques entre types cellulaires de l'INL et de la GCL s'organisent de manière très ordonnée. (La Cour and Ehinger, 2005)

II.1.B / Circulation de l'information visuelle

II.1.B.a / Réception de l'information lumineuse

Après avoir été focalisée sur la rétine par les différentes structures lenticulaires de l'œil, la lumière atteint la surface interne de la rétine et il lui faut traverser l'intégralité de la rétine neurale pour atteindre les segments externes des photorécepteurs. Les cellules de Müller ont un rôle important dans ce phénomène puisqu'elles constituent de véritables "canaux à lumière" capables de véhiculer les rayons lumineux comme de véritables fibres optiques, évitant les phénomènes de diffusion, réflexion et réfraction qui entraîneraient une perte et une distorsion d'information au long du cheminement de la lumière à travers la rétine (Franze *et al.*, 2007).

La **phototransduction** (conversion du signal photique en signal nerveux) a lieu dans les segments externes des photorécepteurs qui sont constitués de disques membranaires supportant des photopigments : des protéines (les **opsines**) couplées à un chromophore (le **11-*cis*-rétinal**). Ce sont les opsines qui confèrent au photopigment la spécificité de sa sensibilité aux longueurs d'onde. L'absorption de l'énergie du photon par le 11-*cis*-rétinal le fait basculer en conformation tout-*trans*, ce qui provoque un changement de conformation de l'opsine et lui permet d'activer une protéine G appelée transducine, qui elle-même active la phosphodiesterase qui catalyse l'hydrolyse du GMPc. La diminution du taux de GMPc provoque la fermeture des canaux ioniques dépendants du GMPc (perméables aux ions Na⁺ et Ca²⁺) et l'hyperpolarisation du photorécepteur. La cascade est stoppée par la phosphorylation du photopigment puis sa liaison à l'arrestine, ce qui libère le chromophore de l'opsine après quoi il est réduit en tout-*trans*-rétinol et incapable d'absorber un nouveau photon. (Fu, 2010)

II.1.B.b / Transmission du message photique

Le message photique qui émerge des photorécepteurs consiste en une modulation de la quantité de neurotransmetteur libéré (le glutamate) liée à des modifications graduelles du potentiel de membrane au gré des fermetures et réouvertures des canaux ioniques dépendants du GMPc. (Fu, 2010)

Le message glutamatergique est intégré en aval par les cellules bipolaires et les cellules horizontales. Les cellules horizontales, inhibitrices, modulent en retour la libération du glutamate directement au niveau des terminaisons synaptiques des photorécepteurs, et permettent de créer des profils différentiels de décharge des photorécepteurs selon qu'ils sont situés au centre ou à la périphérie du champ récepteur des cellules ganglionnaires en aval (un phénomène appelé inhibition latérale), et de ce fait de renforcer les contrastes. Un autre rôle possible des cellules horizontales est l'ajustement local du gain, c'est-à-dire la soustraction d'une partie du signal proportionnelle à l'intensité lumineuse moyenne, afin d'éviter la saturation. (Masland, 2011)

Les cellules bipolaires répondent de différentes manières aux variations de libération du glutamate, grâce à l'expression de différents récepteurs glutamatergiques :

- Les cellules bipolaires de **type ON** possèdent des récepteurs métabotropes au glutamate (mGluR6) qui provoquent une hyperpolarisation membranaire en réponse au glutamate. Ces cellules sont donc dépolarisées par la lumière.
- Les cellules bipolaires de **type OFF** possèdent des récepteurs ionotropes au glutamate (AMPA et kaïnate) qui provoquent une dépolarisation membranaire en réponse au glutamate. Ces cellules sont donc hyperpolarisées par la lumière. Différents types de cellules bipolaires OFF se distinguent également par la durée de leur réponse à la lumière (transitoire ou soutenue).

A ces spécificités de réponse à la lumière s'ajoute celle au type de photorécepteur, et d'autres encore. Au sortir des cellules bipolaires, il y a finalement une ségrégation des informations lumineuses en une douzaine de catégories de canaux parallèles, tous caractérisés par des variations graduelles de la libération de neurotransmetteur (le glutamate). Ces ségrégations d'informations sont maintenues au niveau des cellules ganglionnaires. (Masland, 2012a)

Les informations transmises par les cellules bipolaires aux cellules ganglionnaires sont modulées par les cellules amacrines. Il existe un très grand nombre de types de cellules amacrines (et tout autant de fonctions spécifiques qui ne sont pas encore toutes caractérisées) qui assurent l'intégration par les cellules ganglionnaires d'informations catégorisées. Ces informations sont finalement transmises aux différentes structures cérébrales cibles des cellules ganglionnaires par une libération de glutamate sous le contrôle de potentiels d'action. (Masland, 2001, 2012b)

Il y a donc une voie verticale centripète de transmission de l'information nerveuse, qui utilise le glutamate, et qui est modulée horizontalement, principalement grâce au GABA et à la glycine. Mais il y a aussi des possibilités de communication centrifuge dans la rétine. Un exemple concret en sont les cellules ganglionnaires à mélanopsine (présentées dans le **paragraphe II.2.F.b /**) qui transmettent une signalisation glutamatergique rétrograde aux cellules dopaminergiques en réponse à la lumière (voir le **paragraphe III.5.C /**). Les cellules dites interplexiformes sont des acteurs rétrogrades également parce qu'elles libèrent des substances neuroactives à la fois dans l'IPL et l'OPL (cf. **paragraphes II.2.E.b /** et **II.2.G /**). Enfin, une communication multidirectionnelle est également possible grâce à des messages diffusibles qui ne sont pas restreints à la synapse (voir le **paragraphe II.3.B /**).

II.1.C / Autour de la rétine

Au niveau interne, la rétine neurale est séparée de l'humeur vitrée qui baigne la partie postérieure du globe oculaire par la membrane limitante interne, une membrane basale sur laquelle s'adosent les terminaisons des cellules de Müller. Au niveau externe, une membrane limitante externe (qui n'est en fait pas une vraie membrane mais un alignement de jonctions adhérentes entre les cellules de Müller et les photorécepteurs) est située entre les corps cellulaires et les segments internes des photorécepteurs, mais les segments des photorécepteurs s'étendent au-delà jusqu'à l'épithélium pigmentaire. (Kolb, 2012)

II.1.C.a / L'épithélium pigmentaire

La partie la plus distale des segments externes des photorécepteurs est en lien très étroit avec l'**épithélium pigmentaire (RPE)** à plusieurs titres. Le premier est le cycle visuel (un échange de chromophores usagés et recyclés) : le photorécepteur n'est pas capable de recycler le tout-*trans*-rétinol généré par l'absorption d'un photon (voir le **paragraphe II.1.B.a /**) en 11-*cis*-rétinal. Les chromophores "usagés" sont donc envoyés dans le RPE qui exprime les enzymes nécessaires à leur régénération en 11-*cis*-rétinal (isomérisation et oxydation) avant d'être réadressés aux photorécepteurs. (La Cour and Ehinger, 2005)

Comme les photorécepteurs produisent en permanence de nouveaux disques membranaires pour renouveler ceux de leurs segments externes, le RPE se charge de phagocyter régulièrement des paquets de disques membranaires qui se détachent progressivement de l'extrémité distale des segments externes. Cette activité intense de renouvellement (un photorécepteur de singe a entièrement renouvelé son segment externe en 9-13 jours (Young, 1971)) est essentielle du fait du fort stress oxydatif auquel les segments externes sont soumis quotidiennement sous l'effet de la lumière, si bien que le dysfonctionnement de cette phagocytose conduit à une dégénérescence des photorécepteurs. (Strauss, 2011)

L'épithélium pigmentaire forme une monocouche de cellules épithéliales fortement pigmentées, ce qui leur permet d'absorber les photons non captés par les segments externes afin d'empêcher leur réflexion et leur excès dans les photorécepteurs, ce qui augmenterait les risques de phototoxicité. De ce fait, les rétines des animaux albinos sont plus fragiles (elles dégènèrent à force d'être exposées à la lumière) (O'Steen *et al.*, 1974).

Enfin, c'est aussi un élément de la barrière hématorétinienne qui permet le passage d'eau, d'ions et autres produits métaboliques entre les vaisseaux sanguins de la choroïde (cf. **paragraphe II.1.C.b /**) et l'espace sous-rétinien (l'espace extracellulaire entre la membrane limitante externe et le RPE). (Strauss, 2011)

II.1.C.b / La vasculature

La rétine est irriguée par deux systèmes vasculaires (Kolb, 2012) :

- La circulation choroïdienne, localisée dans la choroïde (le tissu localisé entre le RPE et l'enveloppe oculaire appelée sclérotique), nourrit la partie externe de la rétine.
- Les vaisseaux de la circulation rétinienne atteignent la face interne de la rétine en cheminant avec les fibres optiques à travers la papille optique. Ils irriguent la rétine interne en courant sur plusieurs niveaux (le long de la couche de fibres optiques et dans la GCL) et en faisant des incursions dans l'IPL et jusque dans l'OPL à travers l'INL. L'architecture de ce réseau vasculaire est très variable selon les espèces (Zhang, 1994).

II.2 / La rétine au x60 : types cellulaires

Les informations visuelles ne font pas que transiter dans la rétine, elles y subissent plusieurs niveaux de traitement qui aboutissent à la coexistence de plusieurs canaux parallèles (Masland, 2011) qui véhiculent des catégories d'information (couleur, intensité, contrastes, mouvements, etc), informations qui sont transmises à d'autres structures cérébrales impliquées dans la fonction visuelle (avec le corps genouillé latéral ou corps géniculé latéral, premier relai vers le cortex visuel, et le colliculus supérieur pour l'orientation des globes oculaires et de la tête) mais aussi dans d'autres fonctions (structures supraoptiques et subthalamiques pour le contrôle des rythmes circadiens, du réflexe pupillaire, ...). (La Cour and Ehinger, 2005)

Pour ce faire, si la vue d'ensemble de la rétine laisse entrevoir une structure simple, il n'en est plus de même lorsqu'on commence à regarder de près les quelques 60 types cellulaires qui y cohabitent (Figure 11) et pour lesquels la recherche est encore loin d'avoir fini d'établir le catalogue des fiches d'identité (neurotransmetteurs/modulateurs/peptides libérés, partenaires, caractéristiques électrophysiologiques, fonctions, ...) (Masland, 2011). Je ne prétendrai donc pas ici en dresser un portrait complet, mais simplement mentionner l'état des connaissances en m'attardant un peu sur quelques types cellulaires.

Figure 11 : Dessin des différents types cellulaires de la rétine. (Masland, 2001)

Ces dessins sont issus d'études faites chez le lapin (sauf les cellules bipolaires qui sont issues d'études faites chez le rat) parce que c'est le modèle de rongeur le plus utilisé pour étudier les types cellulaires de la rétine. Pour des raisons de place, seuls quelques types de cellules amacrines à large champ sont représentés.

Parmi les cellules gliales de la rétine, je ne présenterai que les cellules de Müller, mais des cellules microgliales sont également présentes dans la rétine (elles ont pour rôle la défense immunitaire, la réparation tissulaire ou encore la phagocytose des débris cellulaires), ainsi que des cellules astrocytaires associées aux vaisseaux sanguins de la circulation rétinienne et à la couche des fibres optiques formée par les axones des cellules ganglionnaires (Kolb, 2007a).

II.2.A / Les cellules de Müller

Les **cellules de Müller** étirent leurs prolongements de la membrane limitante interne à la membrane limitante externe, et envoient des microvillosités au-delà de la membrane limitante externe dans l'espace sous-rétinien. Outre leur rôle de soutien structurel, elles entrent en contact avec la plupart des neurones rétiniens et jouent un rôle fondamental dans l'homéostasie rétinienne. Elles captent et recyclent les neurotransmetteurs, tamponnent le milieu extracellulaire, fournissent un support trophique aux neurones, éliminent les déchets métaboliques, etc. Elles entourent les synapses de manière à les isoler du reste de l'espace extracellulaire, mais prennent également une part intégrante dans la transmission synaptique en libérant des gliotransmetteurs (glutamate, adénosine, ATP, ...). (Reichenbach and Bringmann, 2013)

Une participation des cellules de Müller a également été récemment mise en évidence dans le cycle visuel des cônes, et permet un recyclage des chromophores plus rapide que celui qui a lieu dans le RPE, ce qui est d'une importance primordiale pour la vision de jour lorsque la rétine est inondée de photons de manière incessante (Wang and Kefalov, 2009).

II.2.B / Les photorécepteurs

Les **bâtonnets** sont d'un seul type (leur unique photopigment est la **rhodopsine**) et représentent 97% des photorécepteurs chez la souris. Leur nom leur vient de l'aspect de leur segment externe (**Figure 12**). Ils ont une très grande sensibilité à la lumière (ils peuvent être activés par un unique photon) et sont responsables de la vision **scotopique** (en lumière faible). Leur pic de sensibilité se situe autour de 500 nm et ils ne permettent de voir qu'en nuances de gris. (Fu, 2010)

Les **cônes** ont également été baptisés d'après l'aspect de leur segment externe (**Figure 12**). Ils sont moins sensibles à la lumière que les bâtonnets, ce qui leur permet de rester discriminants en conditions **photopiques** (à forte intensité lumineuse). Chez le rat et la souris, ils sont de deux types selon le photopigment qu'ils expriment, et permettent, par comparaison des signaux émanant des deux populations, la distinction des couleurs : (Fu, 2010)

- Les cônes de **type S**, dits "cônes bleus", sont plus sensibles aux longueurs d'onde courtes (pic de sensibilité autour de 360 nm chez la souris) et détectent ainsi la lumière bleue.
- Les cônes de **type M**, dits "cônes verts", sont plus sensibles aux longueurs d'onde moyennes (pic de sensibilité à 508 nm chez la souris) et détectent ainsi la lumière verte et jaune.

Chez plusieurs rongeurs dont la souris, la ségrégation entre les 2 types de cônes n'est pas si nette parce que les deux types de photopigments peuvent être retrouvés dans un même cône, dans des proportions variables selon la zone rétinienne considérée (Lukáts *et al.*, 2005). Enfin, chez les espèces trichromatiques comme l'Homme, un troisième type de cône existe (les cônes de **type L** dits "cônes rouges") et exprime un photopigment sensible aux longueurs d'ondes longues du spectre visible (jaune-rouge, pic de sensibilité vers 560 nm chez l'Homme (Schnapf *et al.*, 1987)).

Figure 12 : Représentation schématique d'un bâtonnet et d'un cône.

D'après (La Cour and Ehinger, 2005)

II.2.C / Les cellules horizontales

Les **cellules horizontales** sont de deux types seulement : **HA** et **HB**. Elles modulent la transmission synaptique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires en libérant du GABA (mais pas uniquement : voir (Thoreson and Mangel, 2012)). Les cellules HA ne communiquent pas du tout avec les bâtonnets tandis que les cellules HB communiquent avec les bâtonnets et les cônes via deux zones spatialement distinctes de la cellule (l'arbre télodendritique issu de l'axone pour les bâtonnets et l'arbre dendritique pour les cônes, avec possibilité de passage des informations entre les deux zones d'après (Trümppler *et al.*, 2008)). Chez certains rongeurs (dont les rats et les souris), seules les cellules HB sont présentes. (Masland, 2011)

II.2.D / Les cellules bipolaires

Les **cellules bipolaires** transmettent les informations verticalement, des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires et amacrines. Il existe un unique type de cellule bipolaire dédié aux bâtonnets (de type ON), il en existe par contre de nombreux types dédiés aux cônes : une étude réalisée chez la souris en décrit 11 (Wässle *et al.*, 2009). Ces cellules se distinguent par leur type de réponse (ON ou OFF, transitoire ou soutenue), leur signature moléculaire, leur spécificité à un ou plusieurs types de cônes (ce qui permet l'encodage des couleurs), leur morphologie (qui comprend celle de leurs prolongements et donc le type d'informations qu'elles encodent) ou encore leur lieu de stratification dans l'IPL (et donc leurs partenaires) (Figure 13). Comme les informations issues d'un cône sont transmises à plusieurs cellules bipolaires, elles sont distribuées dans plusieurs canaux parallèles qui en transmettront des composantes différentes aux cellules en aval. (Masland, 2001)

Figure 13 : Classification des types de cellules bipolaires chez la souris. (Breuninger *et al.*, 2011)

Les différents types de cellules bipolaires sont classées d'après leur réponse à la lumière (ON ou OFF), leur stratification dans l'IPL, le type de cône dont elles véhiculent l'information

En fait, la séparation entre les cellules bipolaires dédiées aux cônes et cellules bipolaires dédiées aux bâtonnets n'est pas si nette puisque des études ont montré chez la souris que certaines cellules bipolaires de cône sont contactées à la fois par des bâtonnets et par des cônes (Pang *et al.*, 2010, 2012).

II.2.E / Les cellules amacrines

Les **cellules amacrines**, nommées ainsi par Ramón y Cajal du fait qu'elles ne portent pas d'axone (en fait certains types en ont : les cellules polyaxonales ou les cellules dopaminergiques par exemple), forment le groupe le plus varié de neurones rétiniens : il en existe une trentaine de types, de morphologies et signatures moléculaires extrêmement variables. Leurs corps cellulaires sont localisés dans la partie la plus interne de l'INL, dans l'IPL (type A1) et dans la GCL (types A1, étoilé). Elles établissent des connexions avec les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires, et entre elles. Une moitié est GABAergique, l'autre glycinergique, mais la plupart des cellules amacrines GABAergiques libèrent également au moins une autre substance neuroactive (voir le **paragraphe II.3.B /**). (La Cour and Ehinger, 2005)

Les cellules amacrines ont des arbres dendritiques de tailles et formes extrêmement variables. Elles n'exercent en fait pas que des effets horizontaux dans la rétine mais ont aussi des influences verticales, notamment parce qu'elles sont souvent stratifiées dans plusieurs sous-couches de l'IPL, créant des ponts entre les sous-couches ON et les sous-couches OFF de l'IPL. Elles exercent des tâches bien spécifiques, dont la plupart restent encore méconnues, d'autant plus que leur arbre dendritique, s'il est large, peut être subdivisé en unités indépendantes. Les cellules amacrines étoilées, par exemple, sont des cellules disposées en miroir dans l'INL et la GCL qui libèrent de l'acétylcholine et du GABA et dont la fonction est de créer la sélectivité d'un type de cellules ganglionnaires pour la direction du mouvement. (Masland, 2011, 2012a)

II.2.E.a / Les cellules amacrines de la circuiterie des bâtonnets

Les cellules bipolaires de bâtonnets ont la particularité de ne pas contacter directement les cellules ganglionnaires : elles passent par des cellules amacrines. Deux types de cellules amacrines sont dédiés aux cellules bipolaires de bâtonnets : (Kolb, 2009a)

- Les cellules amacrines All sont les plus nombreuses des cellules amacrines. Elles sont glycinergiques, ont un champ dendritique étroit et ont pour rôle de transmettre les informations issues des cellules

bipolaires de bâtonnets à la fois aux cellules bipolaires de cônes et aux cellules ganglionnaires. Ce système permet à la circuiterie des bâtonnets, apparus plus tardivement dans l'évolution, de bénéficier de l'organisation spécialisée et complexe déjà en place pour les cônes (Masland, 2011).

- Les cellules amacrines A17 sont GABAergiques. Elles engagent des synapses réciproques avec les terminaisons des cellules bipolaires de bâtonnets. Etant donné que leur champ dendritique est très large et qu'elles n'engagent de synapses ni avec d'autres cellules amacrines ni avec les cellules ganglionnaires, il est envisagé qu'elles participent au réglage du gain du réseau, notamment pour amplifier des signaux de très faible intensité.

II.2.E.b / Les cellules amacrines dopaminergiques

Les cellules amacrines dopaminergiques sont particulièrement intéressantes. Elles libèrent également du GABA et ont pour rôle d'ajuster le fonctionnement du réseau rétinien au niveau d'illumination. Chez la souris, elles sont de type **interplexiforme**, c'est-à-dire qu'elles émettent des prolongements à la fois dans l'IPL et dans l'INL (Witkovsky *et al.*, 2008). Elles libèrent la dopamine de deux manières différentes : de manière synaptique (et donc localisée) et de manière extrasynaptique (la dopamine ainsi libérée peut diffuser et se propager par transmission volumique dans le tissu), mais toujours suite à l'émission de potentiels d'action (Feigenspan *et al.*, 1998; Gustincich *et al.*, 1997; Puopolo *et al.*, 2001). Nous verrons dans le **paragraphe III.1.C** / combien la dopamine a un rôle essentiel dans la rythmicité de la physiologie rétinienne.

II.2.F / Les cellules ganglionnaires

Les **cellules ganglionnaires** sont d'au moins autant de types que les cellules bipolaires, assurant la continuité de la catégorisation des informations, mais leur modulation par les cellules amacrines ajoute à la ségrégation des types d'informations et les estimations actuelles tournent autour d'une vingtaine de types différents (Masland, 2011). La dernière étude en date qui en fait le catalogue chez la souris date de 2009 et fait état de 22 types distincts (**Figure 14**) (Völgyi *et al.*, 2009).

Il est à noter que, de la même manière que des cellules amacrines se trouvent déplacées dans la GCL, des cellules ganglionnaires (y compris des cellules à mélanopsine (Hattar *et al.*, 2002) présentées dans le **paragraphe II.2.F.b** /) sont déplacées dans l'INL, mais en moindre quantité (moins de 2% chez la souris (Dräger and Olsen, 1981; Pang and Wu, 2011) et chez le rat (Linden, 1987; Liu and Jen, 1986)).

II.2.F.a / Les cellules ganglionnaires bplexiformes

Les **cellules ganglionnaires bplexiformes** ont la particularité, comme les cellules dopaminergiques interplexiformes, d'envoyer des prolongements à la fois dans l'IPL et dans l'INL. Ces cellules peuvent ainsi court-circuiter tout le circuit rétinien. Chez les primates, elles sont sensibles à l'intensité lumineuse et leurs dendrites externes sont directement reliées aux bâtonnets (Mariani, 1982; Zrenner *et al.*, 1983), mais chez les rongeurs on ne sait rien de plus que le fait qu'elles existent et qu'elles sont déplacées dans l'INL (Doi *et al.*, 1995).

Figure 14 : Catalogue des cellules ganglionnaires chez la souris. (Völgyi *et al.*, 2009)

Dessins des types de cellules ganglionnaires, nommés G₁–G₂₂. Pour les cellules bistratifiées, les dendrites proximaux et distaux sont représentés respectivement en noir et en gris. a = axone. Barre d'échelle = 100 µm.

II.2.F.b / Les cellules à mélanopsine

Parmi les cellules ganglionnaires, un type est d'un intérêt particulier pour les rythmes circadiens : ce sont les **cellules à mélanopsine**, dites **intrinsèquement photosensibles**. Elles ont été mises en évidence il y a moins de 20 ans : l'histoire commence avec des animaux qui sont entraînés par la lumière et chez lesquels la lumière inhibe la sécrétion nocturne de mélatonine alors que leurs photorécepteurs ont dégénéré (Freedman *et al.*, 1999; Lucas and Foster, 1999; Lucas *et al.*, 1999). Sachant que ces effets de la lumière ne se produisent pas chez des animaux énucléés (Yamazaki *et al.*, 1999), il devenait évident qu'une cellule photosensible inconnue restait à découvrir quelque part dans l'œil. Notons qu'en 1927 déjà, un dénommé Clyde Keeler publiait un article qui décrivait des réflexes pupillaires chez des souris qui étaient

naturellement dépourvues de l'essentiel de leurs photorécepteurs (des souris qu'il appela "Rodless" et qui portent la mutation aujourd'hui appelée *rd* pour "retinal degeneration" (Pittler *et al.*, 1993)), caractéristique qu'il avait lui-même découverte par hasard et décrite quelques années plus tôt (Van Gelder, 2008). Cette observation fut confirmée en 2001 par une étude qui décrivit les caractéristiques spectrales du nouveau photopigment avant que celui-ci soit encore formellement identifié (Lucas *et al.*, 2001). Et justement un pigment photosensible de la peau des amphibiens avait été identifié peu de temps auparavant : la **mélanopsine** (Provencio *et al.*, 1998). Il ne tarda alors plus à être mis en évidence que cette même mélanopsine était présente dans des cellules de la GCL (Provencio *et al.*, 2000), et plus précisément dans une sous-population de cellules ganglionnaires (Berson *et al.*, 2002; Hattar *et al.*, 2002). L'histoire se compliqua cependant bientôt, puisque des souris invalidées pour le gène exprimant la mélanopsine (*Opn4*), continuent elles aussi à être entraînées par la lumière (Panda *et al.*, 2002c; Ruby *et al.*, 2002). Il fut finalement montré que les photorécepteurs "classiques" (cônes et bâtonnets) participent également à cet entraînement (Dollet *et al.*, 2010; Hattar *et al.*, 2003; Panda *et al.*, 2003), les cellules à mélanopsine étant le centre intégrateur et distributeur des informations photiques provenant de tous les photopigments rétinien (Göz *et al.*, 2008; Güler *et al.*, 2008; Hatori *et al.*, 2008).

Les cellules à mélanopsine représentent 1-3% des cellules ganglionnaires. Elles libèrent du glutamate et du PACAP et ont des caractéristiques qui les distinguent des autres photopigments : leur pic de sensibilité spectrale est autour de 480 nm, sont dépolarisées par la lumière et résistantes au photoblanchiment (à l'inactivabilité de leur photopigment une fois que celui-ci a capté un photon et tant qu'il n'a pas été recyclé). Leur dépolarisation par la lumière implique une cascade de signalisation différente de celle des cônes et des bâtonnets, à savoir une protéine G_q qui active la phospholipase C β_4 , ce qui aboutit à un afflux de calcium à travers les canaux ioniques TRPC6 et C7 et déclenche des potentiels d'action. Leur résistance au photoblanchiment est due au fait que le rétinol de la mélanopsine a une propriété de bistabilité et peut être régénéré sur place (mais une contribution des cellules de Müller, de même que pour les cônes, n'est pas à exclure). (Graham, 2008; Hughes *et al.*, 2012)

Les cellules à mélanopsine permettent essentiellement les fonctions photoadaptatives autres que la fonction visuelle : elles projettent vers les SCN et le feuillet intergéniculé pour entraîner l'horloge principale, vers le noyau olivaire prétectal pour déclencher le réflexe pupillaire, vers les noyaux préoptiques ventrolatéraux qui régulent le sommeil, mais également vers les corps genouillés latéraux (qui sont le premier relai des voies visuelles) et vers bien d'autres structures cérébrales (Gooley *et al.*, 2001, 2003; Hannibal and Fahrenkrug, 2004; Hattar *et al.*, 2006).

II.2.G / Quand tout se complique encore

La classification des types cellulaires de la rétine n'est pas toujours si facile, d'autant plus qu'elle est variable d'une espèce à l'autre, et leur ségrégation dans les différentes couches n'est pas toujours si évidente. J'aimerais finir la présentation des types cellulaires rétinien en mentionnant quelques types cellulaires encore peu connus et/ou propices au débat.

Chez de nombreuses espèces de mammifères autres que la souris, les cellules dopaminergiques ne sont pas toutes du type interplexiforme. C'est le cas chez l'Homme (Frederick *et al.*, 1982), le chat (Oyster *et al.*, 1985), le rat et le singe (Savy *et al.*, 1995) par exemple. Chez la souris, un autre type de cellules amacrine pourrait constituer un deuxième type de cellules dopaminergiques : c'est une population qui est capable d'exprimer un rapporteur placé sous la dépendance du gène de la tyrosine hydroxylase (TH, l'une des enzymes de

synthèse de la dopamine) mais qui ne sont pas immunomarquées pour cette enzyme et qui n'ont pas actuellement le titre de "cellule dopaminergique" (Gustincich *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2004).

De même qu'il existe des cellules dopaminergiques non interplexiformes, il existe des cellules amacrines interplexiformes non dopaminergiques mais GABAergiques. Ces cellules sont connues depuis longtemps chez l'Homme et chez le chat (Kolb, 2007b) et ont été décrites plus récemment chez la souris (Dedek *et al.*, 2009; Witkovsky *et al.*, 2008). Il existe même des cellules horizontales de type biplexiforme, ainsi que des cellules horizontales déplacées (Silveira *et al.*, 1989). Il est en fait potentiellement possible de rencontrer des représentants de tous les types cellulaires déplacés dans d'autres couches, comme autant de "restes" du développement (Günhan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006).

Pour terminer, les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles n'ont finalement pas l'exclusivité de l'expression de la mélanopsine, puisqu'il a été montré que les cônes l'expriment également chez l'Homme par exemple (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2006), ou encore le RPE chez la souris (Peirson *et al.*, 2004).

II.3 / La rétine au x100 : communication dans la rétine

La plupart des molécules de neurosignalisation détectées dans le cerveau l'ont aussi été dans la rétine (La Cour and Ehinger, 2005). Avant de donner quelques informations supplémentaires sur les principales molécules concernées, voici une description simplifiée de la répartition des principaux neurotransmetteurs et neuromodulateurs rétinien :

- Le glutamate est le neurotransmetteur du flux vertical d'informations (photorécepteurs → cellules bipolaires → cellules ganglionnaires)
- Le GABA et la glycine sont les neurotransmetteurs de la modulation horizontale de la neurotransmission (le GABA dans les cellules horizontales et amacrines et la glycine dans les cellules amacrines)
- Ce sont les cellules amacrines qui assurent la production de la majorité des autres neurotransmetteurs/peptides/modulateurs, comme la dopamine et l'acétylcholine.

II.3.A / Neurotransmetteurs

Les principaux neurotransmetteurs de la rétine sont le **glutamate**, le **GABA** et la **glycine**. Parmi eux, le glutamate et le GABA sont utilisés dans la communication au niveau des deux couches plexiformes, tandis que la glycine est utilisée dans la rétine interne. Tous les types de récepteurs GABAergiques (GABA_A, GABA_B et l'anciennement nommé GABA_C), glycinergiques (GlyR) et glutamatergiques (AMPA, Kaïnate, NMDA, mGluR1-8) sont présents dans la rétine. L'**acétylcholine**, excitatrice, est présente conjointement avec le GABA dans un seul type de cellules amacrines : les cellules étoilées (présentées dans le **paragraphe II.2.E /**). Les deux types de récepteurs acétylcholinergiques (muscariniques et nicotiniques) sont présents dans la rétine. (Pourcho, 1996; Shen and Jiang, 2007; Yang, 2004)

II.3.B / Neuropeptides, neuromodulateurs et compagnie

La **dopamine** et la **mélatonine** sont des neuromodulateurs libérés dans l'espace extracellulaire où ils peuvent diffuser sur de grandes distances. Elles ont des rôles importants dans la rythmicité de la physiologie rétinienne (voir le **paragraphe III.1.C /**), mais de nombreuses souches de souris (dont la

C57Bl/6) ne produisent en fait pas (ou peu) de mélatonine parce qu'elles ont des mutations dans les gènes qui codent les enzymes de biosynthèse de la mélatonine (AANAT : arylalkylamine N-acétyltransférase et HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransférase) (Ebihara *et al.*, 1986). La dopamine est produite par des cellules amacrines (voir le **paragraphe II.2.E.b** /), tandis que la mélatonine est produite par les photorécepteurs (mais en fait les ARNm *Aanat* et *Hiomt* sont également détectés dans les deux autres couches chez le rat et chez *Arvicanthis ansorgei* (Liu *et al.*, 2004 ; données non publiées du laboratoire)).

Les principaux neuropeptides rétiniens sont la substance P, la somatostatine et le VIP. De nombreuses autres molécules sont rencontrées dans la rétine, comme l'adénosine, la sérotonine, le CRF (corticotropin releasing factor), le neuropeptide Y, la cholécystokinine ; mais pour certaines (sérotonine) leur usage comme substance neuroactive n'est pas encore démontré. Elles sont en général co-localisées avec d'autres substances neuroactives (le GABA et le glutamate notamment), et peuvent être co-produites dans un même type cellulaire. Les cellules amacrines en sont les principales pourvoyeuses, mais à l'heure actuelle le portrait chimique de la rétine porte encore de larges zones d'ombre. (Kolb, 2009b; Pourcho, 1996)

Le NO (monoxyde d'azote) et les endocannabinoïdes, des molécules connues pour exercer localement un effet modulateur sur la transmission synaptique, sont également utilisés dans la rétine. Grâce à leur capacité à traverser les membranes cellulaires, ils ne restent pas prisonniers de la synapse mais peuvent diffuser jusqu'aux neurones environnants. De ce fait, ils ne sont pas stockés dans des vésicules mais produits localement à la demande, ce qui rend leur détection particulièrement difficile.

- La NO synthase, l'enzyme qui produit le NO, est exprimée à tous les niveaux de la rétine de rat, et dans les cellules des deux couches les plus internes chez la souris. La cible première du NO est la forme soluble de la guanylate cyclase, qui convertit le GTP (guanosine 5'-triphosphate) en GMPc. Le NO est actif à des concentrations extrêmement faibles et a un effet activateur sur la GC, ce qui module l'ouverture des canaux ioniques dépendants du GMPc et l'activité d'autres effecteurs dépendants du GMPc. A plus hautes concentrations, le NO peut également moduler l'activité protéique en modifiant des résidus tyrosine et cystéine de ses cibles. (Vielma *et al.*, 2012)
- Les endocannabinoïdes sont des dérivés de l'acide arachidonique. Ils sont produits à partir des phospholipides membranaires par des phospholipases activées par le calcium. A court terme, ils modulent les canaux ioniques de manière à diminuer la libération synaptique, mais à long terme ils peuvent moduler l'activité de protéines kinases et la transcription génique. Ils agissent via des récepteurs métabotropes couplés aux protéines G_{i/o} (CBR1 et CBR2, qui sont présents au niveau des deux couches plexiformes chez le rat et la souris) mais peuvent également activer d'autres récepteurs (GPR55 : G-protein coupled receptor 55, TRPV1 : transient receptor potential V1, PPAR : peroxysome proliferator-activated receptors). (Yazulla, 2008)

II.3.C / Jonctions communicantes

Les **jonctions communicantes**, également qualifiées de "synapse électrique", permettent le passage libre et non sélectif (sauf exceptions) des ions et de très petites molécules (< 1 kDa) comme l'AMPC et le GMPc. Elles sont formées d'oligomères de connexines dont 7 et 6 types ont été à ce jour identifiés dans la rétine de la souris et du rat respectivement. La perméabilité des jonctions communicantes est modulable grâce à la phosphorylation des connexines par des kinases telles que la PKA et la PKC. Elles sont donc potentiellement la cible d'une large gamme de signaux, dont la dopamine rétinienne (via la voie de l'APMc) en est un exemple bien connu mais parmi lesquels figurent également le NO (via la voie du GPMc), l'acide rétinoïque et d'autres (comme l'adénosine (Li *et al.*, 2013)). (Völgyi *et al.*, 2013)

Dans la rétine, il existe des jonctions communicantes entre neurones d'une même population (**Figure 15**), de même qu'entre les cellules de Müller. Au niveau des photorécepteurs, les cônes sont couplés entre eux (en général entre types d'une même sensibilité spectrale), les bâtonnets également, mais les bâtonnets sont également couplés aux cônes. Les cellules horizontales d'un même type sont très fortement couplées entre elles et forment un large syncytium. De manière intéressante, les cellules HB ont deux réseaux séparés de couplage, l'un pour l'arbre dendritique et le corps cellulaire et l'autre pour la terminaison axonale (cf. **paragraphe II.2.C /**). Au niveau des cellules bipolaires, les couplages ne sont pas une règle générale et dépendent des types. Ils peuvent unir des types différents mais ne mêlent pas les cellules des voies ON et OFF. Les cellules amacrines forment des couplages homotypiques, mais le réseau est mal connu du fait de la méconnaissance des nombreux types cellulaires appartenant à cette population. Les cellules ganglionnaires enfin présentent des couplages modérés qui serviraient à synchroniser les décharges entre neurones voisins plutôt qu'à assurer une signalisation latérale. (Völgyi *et al.*, 2013)

Il existe aussi certains couplages par jonctions communicantes entre neurones de populations différentes (**Figure 15**) : c'est le cas entre les cellules ganglionnaires et amacrines ainsi qu'entre cellules bipolaires et amacrines, et plus particulièrement entre les cellules amacrines AII et les cellules bipolaires ON de cônes, ce qui constitue une voie de passage des informations issues de la voie des bâtonnets vers les cellules ON de cônes (cf. **paragraphe II.2.E.a /**). (Völgyi *et al.*, 2013)

Figure 15 : Localisation des jonctions communicantes dans la rétine. (Völgyi *et al.*, 2013)

Ces jonctions relient les cônes (C) **(1)**, les bâtonnets (R) **(2)**, les cônes aux bâtonnets **(3)**, les cellules horizontales (HC) **(4)**, les dendrites des cellules bipolaires (BC) de cônes **(5)**, les terminaisons axonales des cellules bipolaires **(6)**, les prolongements des cellules amacrines (AC) **(7)**, les dendrites des cellules ganglionnaires (GC) **(8)** et les cellules amacrines aux cellules ganglionnaires **(9)**. Les cellules amacrines AII forment des jonctions particulières avec les cellules bipolaires de cône à centre ON **(10)** et entre elles **(11)**.

II.3.D / Potentiels d'action

L'essentiel de la libération vésiculaire des neurotransmetteurs et neuromodulateurs à l'intérieur de la rétine se fait de manière tout à fait classique (une fusion des vésicules avec la membrane cellulaire sous la dépendance du calcium), à l'exception près que les libérations ne sont pas déclenchées par des potentiels d'action mais par des variations du potentiel de membrane. Les distances à parcourir pour l'influx nerveux sont en effet suffisamment courtes pour que la propagation électrotonique des courants suffise. Les cellules ganglionnaires cependant font exception : elles se doivent d'utiliser les potentiels d'action pour assurer le transport de l'influx nerveux en-dehors de la rétine sur de longues distances. (La Cour and Ehinger, 2005)

Certaines cellules amacrines font également exception à cette règle : les cellules interplexiformes dopaminergiques (voir le **paragraphe II.2.E.b /**), A1 (Boos *et al.*, 1993) et A1 (Davenport *et al.*, 2007; Stafford and Dacey, 1997). Il a également été montré chez le rat que plusieurs types de cellules bipolaires présentent des courants sodiques dépendants du voltage et sensibles à la TTX (tétrodotoxine) (Cui and Pan, 2008; Ma *et al.*, 2005; Pan and Hu, 2000). Mais ces courants ne produisent de potentiels d'action que dans des conditions très particulières et il est vraisemblable qu'ils servent à amplifier la réponse des cellules bipolaires et le message transmis aux cellules ganglionnaires, comme cela a été montré chez la salamandre tigrée (Ichinose *et al.*, 2005). Récemment cependant, des potentiels d'action émanant d'un type de cellule bipolaire (cb5b) ont été enregistrés chez le spermophile rayé (Saszik and DeVries, 2012).

III / Une horloge m'a tapé dans l'œil

Il est temps enfin d'ouvrir le cadran de la rétine pour découvrir les rouages horlogers qui s'y cachent.

III.1 / Des rythmes circadiens dans la rétine

La rétine a une physiologie hautement rythmique (quelques 3000 gènes ont une expression rythmique en conditions LD (Storch *et al.*, 2007)) qui lui permet de s'adapter aux changements drastiques de luminosité auxquels elle est quotidiennement exposée. Le caractère circadien de nombre de ces rythmes a été démontré dans la rétine de mammifère.

L'ensemble de ces rythmes conditionne le bon fonctionnement de l'ensemble du tissu. Il a par exemple été montré que la susceptibilité des photorécepteurs à la phototoxicité (la dégénérescence induite par la lumière) suit un rythme circadien (Organisciak *et al.*, 2000). Des liens entre rythmes circadiens et pathologies oculaires, comme la myopie par exemple (Stone *et al.*, 2013), sont en train d'émerger. Les dernières années ont vu des recherches se pencher sur l'impact de la délétion des gènes horloge sur la physiologie rétinienne et sur leur potentiel lien avec des pathologies. L'une montre l'importance de *Rev-Erba* dans le développement rétinien (Mollema *et al.*, 2011), une autre montre un lien entre *Rora* et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Jun *et al.*, 2011). La dernière en date enfin montre que la double délétion des gènes *Per1* et *Per2* provoque des altérations dans la distribution des cônes et dans l'expression des opsines (Ait-Hmyed *et al.*, 2013). Ces études ne permettent cependant pas de savoir si ces dysfonctionnements sont liés à la perturbation d'une horloge locale ou d'une autre.

III.1.A / Au niveau moléculaire

Des 3000 gènes dont l'expression est rythmique en conditions LD, près de 300 continuent à cycler en DD, ce qui signifie qu'ils sont sous le contrôle d'une horloge circadienne (Storch *et al.*, 2007). Ces gènes exercent des fonctions variées dans la communication intercellulaire, la régulation de la chromatine et du cytosquelette, la transmission synaptique, la signalisation des photorécepteurs. Au niveau protéomique, une étude a identifié des protéines exprimées de manière circadienne impliquées dans le transport vésiculaire, la dégradation protéique, la liaison au calcium, le métabolisme, la liaison à l'ADN et le repliement des protéines (Tsuji *et al.*, 2007).

D'une manière tout à fait sensée, il existe dans les photorécepteurs un rythme circadien d'expression des ARNm des opsines qui constituent les photopigments murins (von Schantz *et al.*, 1999). De la même manière chez le rat, dans les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles, l'ARNm *Opn4* est sous contrôle circadien, tandis que le rythme d'expression de la mélanopsine est uniquement sous le contrôle de la lumière chez une espèce de rat (Hannibal *et al.*, 2013) mais semble être circadienne chez une autre (Sakamoto *et al.*, 2004a). Au final, il a été observé une modeste variation circadienne de l'intensité de la réponse des cellules ganglionnaires à mélanopsine du rat à la lumière (augmentation du gain) (Weng *et al.*, 2009). D'autres rythmes circadiens d'expression génique ont été mis en évidence dans la rétine, comme celui de l'ARNm de la Nocturnine (Wang *et al.*, 2001), une déadénylase qui contrôle la stabilité et la traduction des ARNm en raccourcissant la longueur de leur queue poly-adénylée. Le fait que le gène qui code la Nocturnine soit directement contrôlé par les dimères CLOCK/BMAL1 (Li *et al.*, 2008) en fait d'ailleurs un gène de sortie de l'horloge.

Plusieurs molécules neuroactives sont libérées de manière rythmique. C'est le cas de la mélatonine et de la dopamine qui seront traitées plus en détail dans le **paragraphe III.1.C** /. C'est le cas aussi de plusieurs paramètres de la signalisation GABAergique (synthèse, libération, liaison à des sites spécifiques et taux de renouvellement) (Jaliffa *et al.*, 2001).

III.1.B / Au niveau physiologique

La phagocytose des segments externes des photorécepteurs, si cruciale pour leur survie, est également sous contrôle circadien. Cette rythmicité a été démontrée dans un premier temps pour les bâtonnets (Goldman *et al.*, 1980; LaVail, 1976), du fait de leur surnombre dans les rétines des rongeurs classiques de laboratoire, puis pour les cônes (Bobu and Hicks, 2009; Krigel *et al.*, 2010). Ce rythme se traduit par un pic de forte intensité mais de courte durée qui survient environ 1-2 h après le début du jour. Ce pic de phagocytose est d'importance pour la survie des photorécepteurs car des animaux qui conservent un taux basal de phagocytose mais perdent ce pic voient s'installer des dysfonctionnements rétinien avec l'âge (Nandrot *et al.*, 2004).

Le degré de couplage entre les cônes et les bâtonnets par les jonctions communicantes est aussi un phénomène sous contrôle circadien, ce qui permet aux bâtonnets d'utiliser la nuit le réseau neuronal des cônes et ainsi de faciliter la détection de signaux de faible intensité (Ribelayga and Mangel, 2010; Ribelayga *et al.*, 2008).

Les modifications circadiennes du réseau rétinien se reflètent au niveau de l'électrorétinogramme (ERG) : en conditions photopiques (qui reflètent le fonctionnement des cônes), la composante de l'ERG qui reflète le passage de l'influx nerveux dans la rétine interne, l'onde b, a une amplitude et une vitesse plus élevées le jour, mais également en jour subjectif (Barnard *et al.*, 2006).

D'autres rythmes circadiens ont été mis en évidence dans la rétine au niveau physiologique, comme la sensibilité aux contrastes qui est plus élevée le jour (Hwang *et al.*, 2013), le pH extracellulaire qui est plus acide la nuit (Dmitriev and Mangel, 2001) ou encore la concentration extracellulaire d'adénosine qui est plus élevée la nuit (Ribelayga and Mangel, 2005).

III.1.C / Mélatonine dit "tic", dopamine dit "tac"

La mélatonine et la dopamine contrôlent de nombreux aspects de la physiologie rythmique de la rétine. Elles agissent de manière antiphasique : la mélatonine est produite de nuit (Tosini and Menaker, 1996, 1998a), comme dans l'épiphyse, tandis que la dopamine a un pic de libération le jour (Doyle *et al.*, 2002a, 2002b; Pozdeyev and Lavrikova, 2000), de sorte qu'elles sont respectivement qualifiées de "signal de nuit" et de "signal de jour". Ainsi, elles ont par exemple des effets antiphasiques sur la rythmicité des acides-aminés libres (Pozdeyev *et al.*, 2000), ou encore sur la synthèse du NO (Vielma *et al.*, 2012). Elles se contrôlent également mutuellement : la mélatonine inhibe la libération de la dopamine (Dubocovich, 1983) tandis que la dopamine inhibe la synthèse et la libération de la mélatonine (Nguyen-Legros *et al.*, 1996; Tosini and Dirden, 2000).

La rythmicité circadienne de la dopamine est cependant à nuancer, parce qu'elle ne survient pas chez les souris déficientes en mélatonine : le rythme n'est présent qu'en condition LD (Doyle *et al.*, 2002a; Nir *et al.*, 2000). En revanche, le rythme circadien de l'ARNm *Aanat* (l'AANAT est l'enzyme qui contrôle la rythmicité de la synthèse de la mélatonine) est maintenu lorsque le rythme de dopamine est aboli (Sakamoto *et al.*,

2006). Etant donné que le gène *Aanat* est placé sous le contrôle direct des dimères CLOCK/BMAL1 grâce à une séquence "boîte E" de son promoteur (Chen and Baler, 2000; Fukuhara *et al.*, 2004), il est vraisemblable d'envisager que le rythme de mélatonine n'ait pas besoin d'une rythmicité de la dopamine pour survenir. Ainsi, la régulation circadienne de la dopamine nécessite la mélatonine, mais l'inverse n'est pas vrai (le rythme de mélatonine est indépendant de celui de la dopamine). Cependant, le rôle de la dopamine comme signal de jour est potentiellement maintenu chez les souris déficientes en mélatonine parce qu'elles ont un rythme d'expression du gène qui code le récepteur dopaminergique D4 (qui est d'ailleurs le récepteur par lequel la dopamine inhibe la synthèse de mélatonine) (Jackson *et al.*, 2011).

III.1.C.a / La dopamine en action

La libération de dopamine est sous le contrôle de la mélatonine (Doyle *et al.*, 2002a; Dubocovich, 1983), mais la synthèse et la libération de la dopamine sont également sous le contrôle de la lumière (Iuvone *et al.*, 1978; Nir *et al.*, 2000).

Il existe cinq sous-types de récepteurs à la dopamine (D1-D5) dont quatre sont répartis dans toute la rétine (D3 manque à l'appel semble-t-il (Jackson *et al.*, 2009)), tous couplés à la voie de l'AC et classés en deux familles (Witkovsky, 2004) :

- La famille du type D1 inclut les récepteurs D1 et D5 qui activent l'AC
- La famille du type D2 inclut les récepteurs D2, D3 et D4 qui inhibent l'AC

Le concept actuellement avancé est que les effets de la "dopamine circadienne" passent par les récepteurs de la famille D2 tandis que les effets de la "dopamine photique" passent par la famille D1 (Jackson *et al.*, 2012). Quelques données vont dans le sens de la confirmation de ce concept (Ribelayga and Mangel, 2003; Ribelayga *et al.*, 2008), tout comme le fait que l'expression du récepteur D4 est sous contrôle circadien (Jackson *et al.*, 2011), mais sont encore insuffisantes pour en faire une généralité.

La dopamine a des rôles très larges dans la rétine. Elle régule la phosphorylation de protéines dans les photorécepteurs (Pozdeyev *et al.*, 2008), module la réponse des cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles à la lumière (Van Hook *et al.*, 2012) tout comme le rythme d'expression des gènes qui codent la mélanopsine et le PACAP (Sakamoto *et al.*, 2005), contrôle l'expression d'*Adcy1* (le gène qui code l'AC1) (Jackson *et al.*, 2011), influence la phagocytose des segments externes des photorécepteurs (Masri *et al.*, 1996) ainsi que le couplage des photorécepteurs par les jonctions communicantes (Ribelayga *et al.*, 2008), ou encore sensibilise les cellules bipolaires de bâtonnets à la lumière via le GABA (Herrmann *et al.*, 2011). La dopamine influence également la survie des PR dans un modèle murin de dégénérescence rétinienne (Ogilvie and Speck, 2002) et le degré de vice de réfraction chez un modèle primate de myopie (Iuvone *et al.*, 1991).

Une étude récente décrit l'effet de la délétion conditionnelle de la TH dans la rétine sur différents aspects de la fonction visuelle (Jackson *et al.*, 2012). Ces souris ont une acuité visuelle et une sensibilité aux contrastes réduites le jour. Leur ERG est normal en conditions scotopiques, en revanche il est d'amplitude réduite en conditions photopiques et sa composante circadienne est alors perdue. Des souris invalidées pour le récepteur D4 ont, quant à elles, une sensibilité aux contrastes réduite au niveau de la nuit, comme si leur rétine était bloquée dans un "état de nuit" (Hwang *et al.*, 2013). La dopamine reconfigure donc la rétine le jour, notamment en favorisant la signalisation des cônes, de manière à lui permettre de répondre aux conditions de forte intensité lumineuse.

Outre son effet sur la physiologie rétinienne, la dopamine est également capable d'exercer une influence sur l'horloge rétinienne (ceci sera décrit dans le **paragraphe III.7 /**).

III.1.C.b / La mélatonine en action

Comme la dopamine, la synthèse de mélatonine est également régulée par la lumière : la présence de lumière la nuit fait chuter la synthèse de la mélatonine. L'AANAT est régulée, par la lumière comme par l'horloge, au niveau de sa synthèse et de son activité. La lumière comme l'horloge exercent ce contrôle via l'AMPc : la lumière provoque une diminution de la concentration de l'AMPc dans les photorécepteurs (parce que l'activité de l'AC1 dépend du calcium dont la concentration diminue par la fermeture des canaux ioniques dépendants du GMPc qui fait suite à la cascade de phototransduction détaillée dans le **paragraphe II.1.B.a /**) et ceci favorise la dégradation de l'AANAT et diminue l'expression de son gène qui comporte des séquences CRE dans son promoteur. L'horloge quant à elle contrôle l'expression de l'AC1, mais également directement celle du gène *Aanat* qui comprend une séquence "boîte E" dans son promoteur. (Tosini *et al.*, 2006)

La mélatonine exerce ses effets via trois sous-types de récepteurs : MT1, MT2 et MT3. Les récepteurs MT1 et MT2 sont largement distribués dans toute la rétine (McMahon *et al.*, 2014). La mélatonine est impliquée dans le contrôle de l'ERG et de la pression intraoculaire et favorise la survie des photorécepteurs et des cellules ganglionnaires au cours du vieillissement chez la souris (Alcantara-Contreras *et al.*, 2011; Baba *et al.*, 2009), mais elle augmente la sensibilité des photorécepteurs à la phototoxicité chez le rat (Sugawara *et al.*, 1998; Wiechmann and O'Steen, 1992).

Contrairement à la dopamine, il existe peu de données sur les effets possibles de la mélatonine sur l'horloge rétinienne. La comparaison de souches de souris synthétisant et ne synthétisant pas la mélatonine indique que les protéines PER1 et CRY2 ne sont pas rythmiques chez la souche déficientes en mélatonine (Dinet *et al.*, 2007), tandis que la comparaison de souris synthétisant la mélatonine avec la même souche invalidée pour les récepteurs mélatoninergiques MT1 et MT2 montre dans les deux cas une rythmicité des deux protéines, mais avec des acrophases de PER1 en antiphase (Dinet and Korf, 2007).

III.2 / Mise en évidence de l'horloge rétinienne

L'horloge de la rétine fut la première horloge secondaire de mammifère mise en évidence après la découverte de celle des SCN. Elle fut dévoilée chez le hamster doré en 1996 par Michael Menaker et Gianluca Tosini (Tosini and Menaker, 1996) qui montrèrent un rythme de sécrétion de la mélatonine par des rétines cultivées en conditions constantes, rythme entraîné par la lumière (**Figure 16**) et thermiquement compensé (Tosini and Menaker, 1998b). Elle présente donc tous les paramètres requis pour être qualifiée d'horloge à part entière.

La présence de cette horloge fut ensuite démontrée chez de nombreuses autres espèces de mammifères, y compris le rat (Buonfiglio *et al.*, 2014; Sakamoto *et al.*, 2004b) et la souris (Ruan *et al.*, 2008; Tosini and Menaker, 1998a).

Figure 16 : Rythme de sécrétion de la mélatonine par des rétines de hamster doré en culture. (Tosini and Menaker, 1996)
Ce rythme suit le rythme d'alternance lumière / obscurité imposé au tissu, y compris lors d'un décalage de phase, et persiste en obscurité constante.

III.3 / Dialogue entre horloges

L'horloge rétinienne des mammifères a beau être connue depuis près de 20 ans, peu de choses sont finalement sues à son propos, et notamment quelle est sa part de contrôle des rythmes dans la rétine et quelle est la part de l'influence d'autres horloges et oscillateurs. Les seuls rythmes rétinien pour lesquels un contrôle par l'horloge rétinienne a été démontré sont :

- Le rythme de sécrétion de la mélatonine : voir le **paragraphe III.2 /**, puis confirmé chez la souris (Tosini and Menaker, 1998a) ainsi que chez le rat (Sakamoto *et al.*, 2004b)
- Les rythmes de gènes de sortie de l'horloge dans des rétines en culture : *Aanat* et *c-fos* (Buonfiglio *et al.*, 2014)
- Le degré de couplage des cônes et des bâtonnets par les jonctions communicantes (Ribelayga and Mangel, 2010; Ribelayga *et al.*, 2008)
- Le rythme de l'ERG et de l'expression du gène de sortie de l'horloge *Dbp* (Storch *et al.*, 2007). Le fait d'avoir montré qu'une composante de l'ERG est sous contrôle de l'horloge rétinienne indique que cette horloge a un rôle fonctionnel au niveau local, ce qui est confirmé par les anomalies de l'ERG observées chez des souris invalidées à la fois pour *Cry1* et *Cry2* (Cameron *et al.*, 2008). Il a également été montré que la composante circadienne de l'ERG est perdue chez des animaux invalidés pour la mélanopsine (Barnard *et al.*, 2006) et pour la TH (Jackson *et al.*, 2012), ce qui confère aux cellules à mélanopsine et dopaminergiques une position importante dans le contrôle circadien de l'ERG.

Comme nous l'avons vu dans le **paragraphe I.3.A.f /**, certains rythmes dans la rétine dépendent des SCN, et il est vraisemblable d'envisager l'influence d'autres oscillateurs, comme celui de la cornée (Yoo *et al.*, 2005), ou plus proche encore celui du RPE (Baba *et al.*, 2010). Le contrôle de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs est d'ailleurs un processus qui réclame la coordination étroite de la rétine et du RPE (Nguyen-Legros and Hicks, 2000). La phagocytose des segments externes des photorécepteurs suit un rythme circadien (LaVail, 1980) dont le contrôle est partagé par une horloge oculaire et l'horloge des SCN : ce rythme se maintient lorsque les SCN sont lésés (Terman *et al.*, 1993) mais ne peut pas être ré-entraîné par un nouveau rythme LD lorsque le nerf optique est sectionné (Teirstein *et al.*, 1980). Il a été récemment montré que l'une des étapes cruciales de ce processus, à savoir l'exposition de phosphatidylsérine sur les segments externes, a un rythme journalier qui est dépendant du RPE (Ruggiero *et al.*, 2012), mais l'étude ne s'est pas

penchée sur ce qu'il en serait d'un éventuel rythme circadien. Enfin, une étude très récente a identifié dans des extraits de globes oculaires 365 transcrits rythmiques dont plusieurs peuvent potentiellement être directement contrôlés par des protéines horloge (d'après l'étude de leurs séquences promotrices) dans la rétine aussi bien que dans le RPE (Mustafi *et al.*, 2013).

En retour, il est vraisemblable que la rétine exerce sur l'horloge des SCN une influence qui s'étend au-delà de la simple transmission des informations photiques. La première évidence est le fait que la période endogène d'activité locomotrice est modifiée par la perte des photorécepteurs et par l'énucléation (Lupi *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2002). Une évidence plus directe encore a été apportée par une étude qui indique que le rythme de phosphorylation des MAP kinases est aboli dans la partie cœur des SCN d'animaux énucléés, alors qu'il est maintenu dans les autres régions des SCN (Lee *et al.*, 2003).

III.3.A / La voie rétrograde des cellules ganglionnaires à mélanopsine

Toute une circuiterie centrifuge a petit à petit été mise en évidence dans la rétine, impliquant la transmission d'informations entre les cellules ganglionnaires à mélanopsine vers les cellules amacriques dopaminergiques. Le détail des connaissances concernant cette circuiterie sera présenté dans le **paragraphe III.5.C /**. Il est possible d'envisager que des signaux rétrogrades issus des SCN cheminent dans le tractus rétino-hypothalamique jusqu'aux cellules ganglionnaires à mélanopsine et soient ensuite diffusés par cette voie dans toute la rétine (Kolb, 2007b). Le fait que le rythme de phagocytose des segments externes des photorécepteurs ne puisse pas être ré-entraîné par un nouveau rythme LD lorsque le nerf optique est sectionné est d'ailleurs un argument qui va dans ce sens (Teirstein *et al.*, 1980).

III.3.B / La voie rétrograde des fibres histaminergiques

Une autre voie rétrograde existe dans la rétine, mais elle est encore assez mal connue : il s'agit de fibres histaminergiques issues de neurones hypothalamiques, cheminant dans le nerf optique, et finissant leur course dans la rétine.

Les premières mises en évidence de fibres projetant dans l'IPL (et occasionnellement dans l'OPL) de la rétine chez le mammifère ont été réalisées très tôt chez singe (Honrubia and Elliott, 1970; Polyak, 1941) et chez l'Homme (Honrubia and Elliott, 1968).

Plus récemment, il a été montré que des fibres histaminergiques issues des noyaux tubéro-mamillaires de l'hypothalamus projettent dans l'INL de la rétine de singe en cheminant dans le nerf optique puis au milieu des fibres optiques (Gastinger *et al.*, 1999). La même équipe révéla plus tard que des récepteurs histaminergiques sont exprimés sur les dendrites des cellules bipolaires de type ON chez le singe et sur les cellules amacriques dopaminergiques chez le rat (Gastinger *et al.*, 2006). Enfin, les données les plus récentes indiquent que les cellules dopaminergiques murines répondent à l'histamine par une augmentation du taux intracellulaire de calcium (Frazão *et al.*, 2011).

III.4 / Composition de l'horloge rétinienne

La composition moléculaire du mécanisme horloger de la rétine est loin d'être aussi bien connue que celle des SCN (cf. **paragraphes I.3.A.a / et I.3.A.b /**). Cependant, le fait que la mutation *tau* ait dans la rétine des

effets similaires à ceux qui sont connus dans les SCN (se reporter au **paragraphe I.3.A.c /**) laisse supposer que le mécanisme de base est le même (Grace *et al.*, 1996; Tosini and Menaker, 1996). L'étude ayant réalisé la délétion conditionnelle de *Bmal1* dans la rétine (Storch *et al.*, 2007) a montré que la rythmicité des gènes *Rev-Erba* et *Dbp* est perdue et que celle des gènes horloge *Per1*, *Per2* et *Cry1* est défectueuse, ce qui suggère que les gènes du cœur de l'horloge sont les mêmes dans la rétine que dans les SCN, et que parmi eux *Bmal1* est irremplaçable. L'étude qui apporte le plus de renseignements sur le fonctionnement du mécanisme rétinien a observé l'impact de différentes invalidations de gènes horloge sur le fonctionnement de l'horloge elle-même par bioluminescence chez la souris (Ruan *et al.*, 2012). Les auteurs montrent que, pour la rétine comme pour les SCN, les gènes *Per1*, *Cry1* et *Clock* sont individuellement indispensables à la machinerie horlogère, avec des effets plus prononcés de l'invalidation dans la rétine par rapport aux SCN, tandis que les gènes *Per2*, *Per3* et *Cry2* sont dispensables dans les deux structures. Comme pour les SCN, la redondance des gènes *Cry* est confirmée dans la rétine puisque leur double délétion mène à l'arythmie complète. Des différences sont cependant soulignées entre les deux structures à propos du rôle des gènes *Per* puisque la délétion de *Per3*, qui n'a pas d'effet dans les SCN, raccourcit la période de l'horloge rétinienne, tandis que la perte d'un seul allèle *Per1* provoque une augmentation de la période dans les SCN mais un raccourcissement dans la rétine.

Plusieurs études ont cherché à décrire la rythmicité des différents gènes horloge dans la rétine entière chez le rat (Kamphuis *et al.*, 2005; Sandu *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2010; Tosini *et al.*, 2007a) et chez la souris (Peirson *et al.*, 2006). Il en ressort que les gènes horloge sont exprimés de manière circadienne dans la rétine, souvent avec des amplitudes faibles, et avec une caractéristique particulière chez le rat, à savoir des phases assez proches. Mais, ainsi que l'a montré la **partie I /** de cette introduction, la rétine est un tissu pluristratifié et constitué d'une multitude de types cellulaires pouvant abriter des oscillateurs distincts, comme cela s'est révélé être le cas pour les SCN par exemple. En effet, bien que le SCN pris dans son ensemble exprime des rythmes forts, un examen rapproché en a révélé des subdivisions dorso-ventrale et antéro-postérieure qui ont des propriétés différentes (se référer au **paragraphe I.2.A /**). Au niveau de la rétine, citons deux études qui suggèrent l'existence d'un système multi-oscillant : la première montre que la dégénérescence de la rétine interne chez le rat affecte la rythmicité de certains gènes et pas d'autres dans les photorécepteurs (Sakamoto *et al.*, 2006), et la seconde montre chez la souris que des gènes horloge sont rythmiques dans la rétine interne comme dans la rétine externe mais que certains sont en antiphase entre les deux compartiments (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2013). Ceci peut expliquer pourquoi, en comparaison d'autres tissus (cœur et poumon), l'amplitude des variations d'expression des gènes horloge est faible dans les SCN et pratiquement nulle dans la rétine chez la souris (Peirson *et al.*, 2006).

Il semble donc sensé de reconsidérer la question de la composition de l'horloge rétinienne à l'aune de sa localisation.

III.5 / Localisation de l'horloge rétinienne

III.5.A / Expression localisée des gènes horloge

Alors qu'il semble clair que l'horloge rétinienne est localisée dans la rétine externe chez les espèces vertébrées non mammifères, la situation semble plus complexe chez les mammifères (McMahon *et al.*, 2014) (**Figure 17**). La plupart des études qui ont cherché à connaître la localisation tissulaire et cellulaire de l'horloge rétinienne des mammifères ont utilisé les techniques d'hybridation *in situ* et de PCR quantitative (associée à un isolement des types cellulaires). Ces techniques, bien que particulièrement adaptées à la détection de rythmes d'expression génique dans des populations cellulaires identifiées, ne donnent pas

d'indices sur la fonctionnalité d'un oscillateur potentiellement révélé, particulièrement lorsqu'elles sont appliquées *ex vivo* et en cycle LD.

Il en résulte, dans les grandes lignes, qu'une machinerie horlogère serait présente plutôt dans la rétine interne chez le rat, mais exprimée à faible niveau et avec la capacité d'osciller uniquement en cycle LD dans les photorécepteurs. Chez la souris, les études sont plus nombreuses mais apportent des indications contradictoires, notamment en ce qui concerne les photorécepteurs et le fait qu'ils co-expriment différents gènes horloge. Les données sont un peu plus consensuelles au sujet de la capacité de la rétine interne de la souris à exprimer une machinerie horlogère, notamment du fait de la co-expression de plusieurs gènes horloge dans les différents types cellulaires (Ruan *et al.*, 2006), à l'exception d'une étude qui va en sens inverse (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2013). Une unique étude a porté sur l'expression de l'ensemble des protéines horloge et laisse ouverte la possibilité d'une horloge dans chacune des trois couches nucléaires de la rétine de souris (Liu *et al.*, 2012).

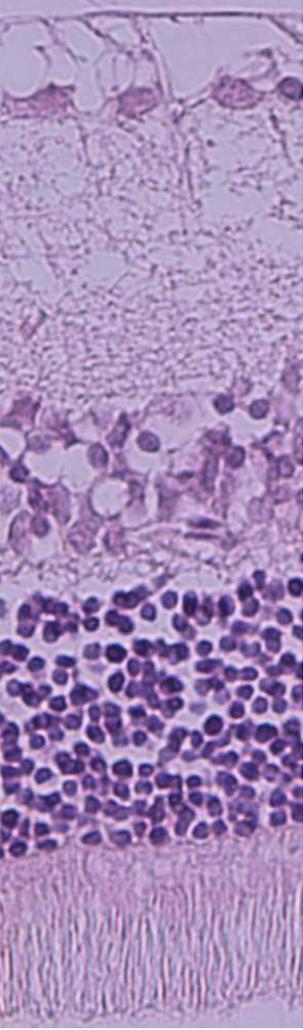
	Souris	Rat
	GCL <i>Per1</i> (+) (Witkovsky <i>et al.</i> , 2003) <i>Per1</i> (+) (Yujnovsky <i>et al.</i> , 2006) <i>Per1</i> (+) (Dinet <i>et al.</i> , 2007) <i>Cry1</i> (+), <i>Cry2</i> (++) (Miyamoto and Sancar, 1998) <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> (Co+) (Ruan <i>et al.</i> , 2006) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Per1</i> (+) (Gekakis <i>et al.</i> , 1998)	GCL <i>Per1</i> (+), <i>Per2</i> (-) (Namihira <i>et al.</i> , 2001) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> (++) (Namihira <i>et al.</i> , 1999)
	GCL+INL <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Per3</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Rev-Erba</i> , <i>Rora</i> (+) (Dkhissi-Benyahya <i>et al.</i> , 2013)	
	INL <i>Per1</i> (+) (Witkovsky <i>et al.</i> , 2003) <i>Per1</i> (+) (Dinet <i>et al.</i> , 2007) <i>Per1</i> (+) (Yujnovsky <i>et al.</i> , 2006) <i>Cry1</i> (+), <i>Cry2</i> (++) (Miyamoto and Sancar, 1998) <i>Bmal1</i> , <i>Clock</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> (Co+ : DA) ; <i>Clock</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> (Co+ : BC bâtonnet) (Dorenbos <i>et al.</i> , 2007) <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> (Co+ : DA, HC, CA, BC) (Ruan <i>et al.</i> , 2006) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Per1</i> (+) (Gekakis <i>et al.</i> , 1998)	INL <i>Per1</i> (++) , <i>Per2</i> (+) (Namihira <i>et al.</i> , 2001) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> (++) (Namihira <i>et al.</i> , 1999)
PRL <i>Per1</i> (+ C57Bl/6 et - C3H) (Dinet <i>et al.</i> , 2007) <i>Per1</i> (-) (Witkovsky <i>et al.</i> , 2003) <i>Per1</i> (++) (Yujnovsky <i>et al.</i> , 2006) <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Per3</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Rev-Erba</i> , <i>Rora</i> (+) (Dkhissi-Benyahya <i>et al.</i> , 2013) <i>Bmal1</i> , <i>Clock</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> (-) (Dorenbos <i>et al.</i> , 2007) <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> (Co-) (Ruan <i>et al.</i> , 2006) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> et <i>Per1</i> (Co+) (Gekakis <i>et al.</i> , 1998)	PRL <i>Per1</i> (+), <i>Per2</i> (-) (Namihira <i>et al.</i> , 2001) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> (+) (Namihira <i>et al.</i> , 1999) <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , (Sakamoto <i>et al.</i> , 2006) <i>Per1</i> , <i>Per3</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Clock</i> , <i>Rev-Erba</i> , <i>Rora</i> (+) ; <i>Per2</i> et <i>Npas2</i> (-) (Tosini <i>et al.</i> , 2007b) <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Cry1</i> , <i>Cry2</i> , <i>RevErba</i> , <i>Rorb</i> (+) (Sandu <i>et al.</i> , 2011) <i>Clock</i> , <i>Bmal1</i> , <i>Per1</i> , <i>Per3</i> , <i>Cry2</i> (+) (Schneider <i>et al.</i> , 2010)	

Figure 17 : Localisation des gènes horloge dans les différentes couches rétinienne chez le rat et la souris.

Ce bilan concerne la détection des ARNm des différents gènes du cœur de l'horloge sans tenir compte du fait que les auteurs aient vérifié ou non leur rythmicité. (+) = ARNm détecté ; (++) = ARNm fortement exprimé ; (-) = ARNm non détecté ; (Co) = co-expression des ARNm dans une même cellule ; DA = cellule dopaminergique ; BC = cellule bipolaire ; HC = cellule horizontale ; CA = cellule amacrine catécholaminergique.

La toute récente revue écrite par McMahon, Iuvone et Tosini (McMahon *et al.*, 2014) détaille et confronte l'ensemble de ces études chez le rat et chez la souris et en conclut que :

"Although several studies have investigated the presence of circadian clock genes (mRNA and protein) in the mammalian retina the results are contradictory and not conclusive about the type(s) of retinal cells that contain the circadian clock. Interpretation of these studies is complicated by the fact that they have used techniques with widely differing limits of detection (e.g. in situ vs. RT-PCR, vs. LCM RT-PCR, vs single cell RT-PCR, vs. immunocytochemistry), and different methods of assessing the independence of cell populations (pharmacology vs. physical lesions vs. genetic lesions). Resolution of the existing ambiguities may lie in assays of individual cell rhythms in isolated cell culture to establish not just which retina cell types express clock genes, but which can act as functional circadian pacemakers"

Les études ayant observé des rythmes circadiens (donc en DD) d'expression des différents gènes ou protéines horloge dans les différentes couches rétinienne sont encore insuffisantes et n'aboutissent pas à des résultats identiques, comme le montre la **Figure 18**.

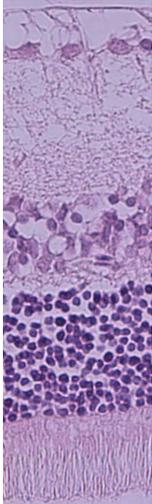
	Souris	Rat
	GCL+INL <i>Per1, Per2, Clock, Rora</i> (Dkhissi-Benyahya <i>et al.</i> , 2013) <i>Per1, Per2, Cry1, Cry2, Bmal1</i> (Ruan <i>et al.</i> , 2006)	
	INL (cellules dopaminergiques) <i>Per1</i> (Witkovsky <i>et al.</i> , 2003) <i>CRY2</i> (Liu <i>et al.</i> , 2012)	
	PRL <i>Per1, Per2, Cry1, Cry2, Clock, Bmal1, Rev-Erba, Rora</i> (Dkhissi-Benyahya <i>et al.</i> , 2013) <i>PER1, PER2, CRY2, CLOCK, BMAL1, NPAS2</i> (cônes) (Liu <i>et al.</i> , 2012)	PRL <i>Per1, Per2</i> , (Sakamoto <i>et al.</i> , 2006) <i>Cry1, Cry2, Rorb</i> (Sandu <i>et al.</i> , 2011) <i>Clock, Per3</i> (Schneider <i>et al.</i> , 2010)

Figure 18 : Rythmicité circadienne des gènes et protéines horloge dans les différentes couches rétinienne chez le rat et la souris.

Ce bilan concerne la détection de la rythmicité circadienne (en DD) des ARNm des différents gènes du cœur de l'horloge et de leurs protéines.

III.5.B / Données fonctionnelles

Les outils de suivi de l'expression génique précédemment cités peuvent également être utilisés sur des tissus en culture, mais les échantillons suivent alors leur rythme propre et se trouvent plus ou moins déphasés les uns par rapport aux autres et il devient alors particulièrement difficile de détecter des rythmes, notamment lorsqu'ils sont de faible amplitude.

Un progrès considérable à ces obstacles a été apporté par les outils de fluorescence, puis de bioluminescence, qui permettent de suivre en temps réel l'expression d'un gène horloge dans un même échantillon et sur de longues périodes de temps. Les lignées de rongeur exprimant le gène rapporteur *Luciférase (Luc)* sous la dépendance de promoteurs de gènes horloge ont permis de révéler qu'une horloge est exprimée par la rétine dans son ensemble chez la souris (Ruan *et al.*, 2008) mais pas chez le rat (Tosini *et al.*, 2007b). Ces mêmes études ont également démontré une localisation de l'horloge rétinienne dans les photorécepteurs chez le rat et dans l'INL chez la souris.

III.5.B.a / Coup d'œil sur la couche des photorécepteurs du rat

L'étude faite chez le rat (Tosini *et al.*, 2007b) a consisté en la culture de PRL obtenues après dégénérescence de la rétine interne par excitotoxicité suite à l'exposition à de l'acide kaïnique. Ces échantillons ont présenté des oscillations en bioluminescence qui n'avaient pas ou très peu pu être observées avec des rétines entières issues d'animaux de la même lignée (Figure 19). Ceci suggère que l'horloge rétinienne est localisée dans la PRL chez le rat, et que la rythmicité de cette couche n'apparaît plus au niveau de la rétine entière parce que les autres couches expriment le gène horloge soit de manière constitutive (ce qui noie la rythmicité émanant de la PRL), soit de manière rythmique mais avec des phases différentes.

Figure 19 : Enregistrements en bioluminescence de rétines entières et PRL isolées de rat *Per1-Luc*. (Tosini *et al.*, 2007b)

Des rétines entières et PRL de rats *Per1-Luc* sont cultivées sur du milieu DMEM. Les données de bioluminescence sont présentées après soustraction d'une ligne de base et un lissage sur 2 h autour de chaque point. Tous les échantillons de PRL sont rythmiques, mais seules 4 rétines sur 16 oscillent légèrement.

III.5.B.b / Coup d'œil sur la couche nucléaire interne de la souris

En ce qui concerne l'étude faite chez la souris (Ruan *et al.*, 2008), l'approche a consisté à enregistrer avec une caméra les signaux de bioluminescence émanant de tranches verticales de rétines (passant au travers des trois couches). Des signaux oscillants se sont révélés visibles au niveau de l'INL (Figure 20), mais il est possible que des signaux d'intensité moindre aient pu être émis par les deux autres couches et passer inaperçus. En revanche des explants de rétines entières issues d'animaux de la même lignée émettent des signaux oscillants de grande amplitude et persistant plusieurs jours.

Cette étude précise les données obtenues peu avant par les mêmes auteurs par l'enregistrement de rétines de souris après dégénérescence de la PRL (Figure 21).

Figure 20 : Enregistrements en bioluminescence de rétines de souris PER2::LUC en coupe transversale. (Ruan *et al.*, 2008)

Des coupes transversales de souris PER2::LUC sont cultivées sur du milieu 199 après une préincubation de 24 h sur du milieu Neurobasal. **(A)** Identification des couches rétiniennes qui émettent un signal de bioluminescence (à droite) à partir d'une image de l'échantillon en fond clair (à gauche) : le signal émane principalement de l'INL. Barre d'échelle = 50 μ M. **(B)** Suivi du rythme de bioluminescence d'une tranche durant 24 h avec une mesure de 30 min toutes les 6 h. Barre d'échelle = 100 μ M. Flèches = membrane de culture. **(C)** Quantification du signal de bioluminescence émis par un échantillon enregistré durant 47 h avec une mesure de 30 min toutes les 30 min.

Figure 21 : Enregistrements en bioluminescence de rétines internes (GCL+INL) de souris PER2::LUC. (Ruan *et al.*, 2006)

Une fois la dégénérescence des photorécepteurs achevée, des rétines de souris PER2::LUC portant la mutation *rd* sont cultivées sur du milieu 199.

III.5.C / L'hypothèse "cellules dopaminergiques"

Les cellules dopaminergiques constituent un candidat idéal pour occuper une place centrale dans l'horloge rétinienne, en tout cas chez la souris. En effet, outre le fait de communiquer avec l'ensemble des types cellulaires rétiniens (cf. **paragraphe II.2.E.b /**), elles constituent un centre intégrateur des informations photiques issues de l'ensemble des cellules photosensibles de la rétine. Chez la souris, elles forment en fait une population hétérogène répondant de différentes manières à la lumière (Zhang *et al.*, 2007) :

- une partie de la population répond à la lumière en augmentant son taux de décharge de manière transitoire (type ON transitoire)
- une autre partie répond à la lumière en augmentant son taux de décharge de manière soutenue (type ON soutenu)
- enfin une partie (40% de la population) ne répond pas du tout à la lumière.

Ces réponses variées peuvent passer par des voies de signalisation différentes, les cellules dopaminergiques étant post-synaptiques aux cellules bipolaires (glutamatergiques) et amacrines (GABAergiques et glycinergiques). Elles proviennent en fait de partenaires différents : les cellules ON transitoires répondent aux cellules bipolaires de type ON via le récepteur mGluR6 (et donc répondent aux signaux photiques reçus par les photorécepteurs) alors que les cellules ON soutenues reçoivent un signal glutamatergique d'une source identifiée peu après (Zhang *et al.*, 2008) : ce sont les cellules ganglionnaires à mélanopsine, dont les dendrites contactent effectivement ceux des cellules dopaminergiques (Vugler *et al.*, 2007) pour former des synapses véhiculant un signal rétrograde (Viney *et al.*, 2007). Le dernier chapitre de cette histoire montre que la réponse ON soutenue des cellules dopaminergiques nécessite la présence de la mélanopsine et passe par les récepteurs AMPA et kainate (Zhang *et al.*, 2012). Ainsi donc les cellules amacrines dopaminergiques intègrent des signaux photiques issus des photorécepteurs et des cellules ganglionnaires à mélanopsine, ce qui est confirmé par le fait que la réponse ON soutenue, mais pas transitoire, persiste chez des animaux dont les photorécepteurs ont dégénéré (Zhang *et al.*, 2008). Une étude avait d'ailleurs montré dès 1980, chez le rat cette fois, que les cellules dopaminergiques continuent à répondre à la lumière malgré une dégénérescence des photorécepteurs (Morgan and Kamp, 1980).

En plus de cette position de centre intégrateur des informations lumineuses, il a été montré que les cellules dopaminergiques murines expriment les protéines horloge PER1, CRY1, CRY2, CLOCK et BMAL1 (Gustincich *et al.*, 2004) et co-expriment les gènes horloge dans une même cellule (Dorenbos *et al.*, 2007; Ruan *et al.*, 2006). Il semble donc vraisemblable que ces cellules aient une capacité oscillatoire circadienne endogène.

III.6 / Communication intra-rétinienne

La question de la communication entre éléments de l'horloge rétinienne commence tout juste à être défrichée. La mélatonine, la dopamine et le GABA, tous trois libérés de manière rythmique (cf. **paragraphe III.1.A /**), sont les principaux candidats pour coordonner les cellules oscillantes, d'autant plus qu'ils sont largement distribués dans la rétine comme cela a été décrit dans les paragraphes **II.3.A /** et **II.3.B /**.

En prenant comme principal témoin de la synchronie des cellules rétiniennes l'amplitude des oscillations de bioluminescence émises par des rétines entières de souris, l'équipe de McMahon a montré en 2008 chez la souris que la communication horlogère intrarétinienne ne met en jeu ni les jonctions communicantes, ni des libérations de substances neuroactives dépendantes de canaux ioniques sensibles à la TTX (Ruan *et al.*, 2008). Cette étude montre également que de la dopamine, de la mélatonine, du GABA, du glutamate, de la glycine et de l'acétylcholine, aucune de ces molécules n'est nécessaire au maintien des oscillations de bioluminescence. Etant donné que le taux d'amortissement des oscillations est cinq fois plus élevé dans la rétine que dans les SCN, les auteurs concluent que le couplage cellulaire dans la rétine n'est pas un paramètre aussi crucial que dans les SCN, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ce tissu, étant chaque jour directement exposé au cycle lumière/obscurité, pourrait utiliser ce moyen direct de synchronisation plutôt que des voies internes de couplage.

En revanche, la signalisation GABAergique module l'amplitude des oscillations de l'horloge rétinienne : le blocage des récepteurs GABA_A et GABA_C augmente l'amplitude des oscillations de bioluminescence de la rétine de souris, alors que leur activation diminue l'amplitude des oscillations jusqu'à les stopper à haute dose (Ruan *et al.*, 2008). Cette étude ne permet pas de conclure sur le rôle exact du GABA dans la signalisation horlogère, mais les auteurs proposent qu'il favorise la dégradation des protéines PER par le biais de la CK1 ϵ (qui est capable de s'associer avec les récepteurs GABA_A, en tout cas dans les SCN (Ning *et al.*, 2004)) afin de lever l'inhibition qu'elles exercent sur leur propre expression et initier un nouveau cycle.

Dans les SCN, le GABA a des effets qui vont dans le même sens puisqu'il y déstabilise les oscillations de l'horloge en diminuant la précision de la période exprimée par les cellules oscillantes et en favorisant leur désynchronisation (Freeman *et al.*, 2013).

III.7 / Entraînement de l'horloge rétinienne

La voie d'entrée de la lumière pour l'entraînement et la remise à l'heure de l'horloge rétinienne n'est pas encore connue. Le seul indice actuellement disponible vient d'une souris invalidée pour la mélanopsine qui présente une perte de l'inductibilité des gènes *Per1* et *Per2* dans la rétine externe par une lumière à une longueur d'onde qui cible principalement la mélanopsine (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2013).

Nous avons vu dans le **paragraphe III.5.C /** que les cellules dopaminergiques intègrent des informations photiques issues de toutes les cellules photosensibles de la rétine. Plusieurs données confèrent à la dopamine un rôle dans l'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière. La première est le fait que l'induction de l'expression de *Per1* par la lumière est diminuée chez des souris invalidées pour le récepteur D2 (Yujnovsky *et al.*, 2006). La deuxième est le fait que la signalisation dopaminergique D1 provoque des décalages de phase de l'horloge rétinienne (Ruan *et al.*, 2008). Ainsi, la dopamine n'est peut-être pas un élément essentiel à la construction de l'horloge rétinienne (cf. (Ruan *et al.*, 2008) dans le **paragraphe III.6 /**) mais elle a vraisemblablement un rôle dans l'entraînement de l'horloge par la lumière.

Cet effet pourrait se faire directement sur la machinerie horlogère des cellules oscillantes parce que la signalisation dopaminergique augmente l'activité transcriptionnelle des dimères CLOCK/BMAL1 en les libérant de CRY1 et en favorisant leur recrutement du co-activateur CBP (CREB Binding Protein), ce qui augmente l'expression de *Per1* (Yujnovsky *et al.*, 2006).

En se basant sur l'hypothèse d'un rôle des cellules dopaminergiques comme pivot de l'entraînement de l'horloge rétinienne, une étude donne une place centrale aux photorécepteurs pour l'entrée des informations photiques : les effets d'induction de l'expression de *c-fos* dans les cellules dopaminergiques et d'augmentation de la libération de la dopamine induits par la lumière sont réduits chez des souris dont les bâtonnets sont incapables de réaliser la phototransduction (invalidation du gène *Gnat1* (guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1)) et complètement perdus chez des souris sans cônes ni bâtonnets (mutations *rd/rd cl*), alors qu'ils sont maintenus chez des souris *Opn4^{-/-}* (Cameron *et al.*, 2009). L'apparente contradiction entre ces données et celles de l'étude présentée un peu plus haut (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2013) peut s'expliquer par le fait que, dans ce dernier cas, le stimulus lumineux ciblait spécifiquement les cellules à mélanopsine, tandis que dans l'étude de Cameron la stimulation n'était pas spécifique (lumière blanche). Il est donc tout à fait justifié d'envisager un rôle de l'ensemble des types cellulaires rétiniens photosensibles pour l'entraînement de l'horloge rétinienne.

IV / Conclusion... de l'introduction

Les connaissances sur l'horloge rétinienne présentent des lacunes à tous les niveaux considérés :

- La composition moléculaire de l'horloge devra être ré-adressée de manière affinée lorsque sa localisation au sein des différentes couches et des différents types cellulaires aura été déterminée.
- Les données actuelles sur la localisation de l'horloge rétinienne dessinent les contours d'un réseau multi-oscillant, mais il manque des données fonctionnelles décrivant l'organisation de l'horloge rétinienne au sein des trois couches et au sein des différents types cellulaires. Les deux études qui apportent des indices fonctionnels sur cette question restent incomplètes.
- Il semble peu plausible qu'un réseau multi-oscillant fonctionne sans communication entre les différentes entités qui le composent, ou qui éventuellement cohabitent de manière plus ou moins indépendante les unes des autres, ne serait-ce qu'à cause de la nécessité de transmettre les informations photiques aux cellules rétiniennes oscillantes qui ne sont pas photosensibles (à moins qu'une capacité de photoréception des protéines CRY n'y soit finalement mise en évidence (Hoang *et al.*, 2008)). Il est possible d'envisager des réseaux redondants de communication qui masqueraient l'importance unitaire de chaque entité (au même titre que la redondance des entités moléculaires composant l'horloge rend difficile la mise en évidence de la place de chacune).
- L'horloge rétinienne dispose de plusieurs types de cellules photosensibles réparties dans plusieurs de ses couches et spécialisées dans la réception de différents types d'informations lumineuses (intensité, longueur d'onde...). Pour aborder la question de son entraînement par la lumière, il faut considérer qu'elle puisse utiliser l'ensemble de ces canaux, de même que ce qui a été montré pour les SCN (cf paragraphe **II.2.F.b** /).

Objectifs & Stratégie expérimentale

Nous sommes tellement enfermés dans l'univers de nos propres sens que nous avons une très grande difficulté à envisager une autre vision du monde que la nôtre. La vision des oiseaux nous invite à l'humilité. La réalité que nous percevons n'est qu'une réalité parmi d'autres.

Timothy Goldsmith

Figure 22 : Dessin de rétine de Ramón y Cajal, vers 1890-1900.

1. Couche des photorécepteurs. 2. Membrane limitante externe. 3. Couche granulaire externe. 4. Couche plexiforme externe. 5. Couche granulaire interne. 6. Couche plexiforme interne. 7. Couche des cellules ganglionnaires. 8. Couche des fibres optiques. 9. Membrane limitante interne. A. Cellules pigmentées. B. Cellules épithéliales. a. Bâtonnets. b. cônes. c. Noyau de bâtonnet. d. Noyau de Cône. e. Cellule horizontale large f. Cellule bipolaire de cône. g. Cellule bipolaire de bâtonnet. h. Cellule amacrine. i. Cellule ganglionnaire géante. j. Petite cellule ganglionnaire. Ce dessin est commenté dans (Wade, 2008).

I / Objectifs

Les objectifs de ce travail de thèse sont :

1. De mettre au point un outil d'étude des propriétés intrinsèques de l'horloge rétinienne

Les propriétés intrinsèques de l'horloge rétinienne seront rendues accessibles par le travail en conditions *in vitro*, à partir d'explants rétiniens de deux espèces de rongeurs (rat et souris) maintenus en culture. Pour ce faire, nous optimiserons une méthode de culture qui sera dédiée à l'enregistrement des échantillons en bioluminescence et développerons une stratégie d'analyse des données acquises.

2. De répondre à la question de la localisation de l'horloge rétinienne au sein des trois couches

Nous déterminerons, chez deux espèces de rongeurs (rat et souris), quelles couches rétiniennes abritent un oscillateur fonctionnel et autonome susceptible de faire partie de l'horloge rétinienne.

Pour l'aspect autonome, nous utiliserons la culture de couches rétiniennes isolées en conditions de libre cours.

Pour l'aspect fonctionnel, nous travaillerons avec des lignées transgéniques exprimant le gène rapporteur *Luciférase* sous le contrôle de promoteurs de gènes du cœur de l'horloge, ce qui nous donnera accès au suivi longitudinal du fonctionnement de l'horloge elle-même.

3. De comprendre comment les oscillateurs des couches rétiniennes communiquent

Cette question sera abordée en cultivant les couches rétiniennes deux par deux, soit en maintenant les connexions synaptiques soit en les coupant, et en comparant leur comportement oscillatoire à celui de la rétine entière et des couches isolées.

Nous explorerons quelles substances neuroactives sont susceptibles d'être impliquées dans cette communication à l'aide d'une approche pharmacologique ciblant les principaux neurotransmetteurs rétiniens et appliquée à la rétine entière.

4. De caractériser les propriétés d'entraînement de l'horloge rétinienne

La rétine étant un tissu photosensible et directement entraînable par la lumière, nous chercherons à comprendre de quelle manière la lumière affecte l'horloge rétinienne en observant quels paramètres des oscillations des gènes du cœur de l'horloge sont modifiés en présence de lumière par rapport aux conditions de libre cours.

Nous déterminerons enfin si l'AMPC a la capacité d'entraîner d'horloge rétinienne.

Organisation du manuscrit

La présentation des résultats se fera sous la forme de deux articles suivis d'une partie décrivant quelques données supplémentaires.

Le premier article comportera la description de la mise au point des conditions de culture pour le suivi en bioluminescence d'explants rétiniens de rat (**Objectif n°1**).

Le second article, en cours de préparation, regroupera les résultats ayant trait aux **Objectifs n°2 et 3**.

Enfin, la dernière partie des résultats abordera dans un premier temps l'**Objectif n°4** et s'achèvera par la présentation de quelques informations qui concernent l'horloge rétinienne au cours de la maturation de la rétine.

Afin de faciliter la lecture des deux articles, leurs bibliographies respectives figureront sur des feuilles de couleur localisées à la fin de chaque article.

Etant donné que les "Materials and Methods" des deux articles inclus dans la partie "**Résultats**" détaillent l'essentiel des méthodes utilisées pour l'ensemble de mes travaux de thèse, je ne décrirai dans la partie "**Matériels et Méthodes**" de ce manuscrit que le développement des méthodes mises en œuvre (la culture des explants rétiniens et l'analyse des données de bioluminescence), qui représente une part importante de mon travail de thèse.

II / Stratégie expérimentale : la bioluminescence

Toute une gamme de lignées de rongeurs transgéniques existe pour l'étude de l'horloge circadienne en bioluminescence. Ces lignées sont basées sur un transgène qui exprime le gène rapporteur *Luciférase* sous la dépendance du promoteur de l'un des gènes horloge. Ces lignées sont idéales pour avoir une vision directe du fonctionnement du cœur de l'horloge et la bioluminescence a de nombreux avantages : elle permet un suivi peu invasif, quasi continu, longitudinal et durable des oscillations d'un gène horloge. Les oscillations de l'activité de bioluminescence enregistrées fournissent des informations sur la période, la phase, l'amplitude et le taux d'amortissement du rythme du gène horloge ciblé dans un tissu *in vivo* ou isolé du reste de l'organisme (en culture).

Nous disposons au laboratoire de trois lignées transgéniques bioluminescentes : une lignée de rats *Per1-Luc* (Yamazaki *et al.*, 2000) et deux lignées de souris (PER2::*LUC* (Yoo *et al.*, 2005) et *RevErb α -Luc* (non publié)). Mon travail de thèse a été essentiellement basé sur l'utilisation des lignées *Per1-Luc* et PER2::*LUC*. La **Figure 23** montre un exemple d'enregistrement de SCN de la lignée PER2::*LUC* en culture obtenu au laboratoire.

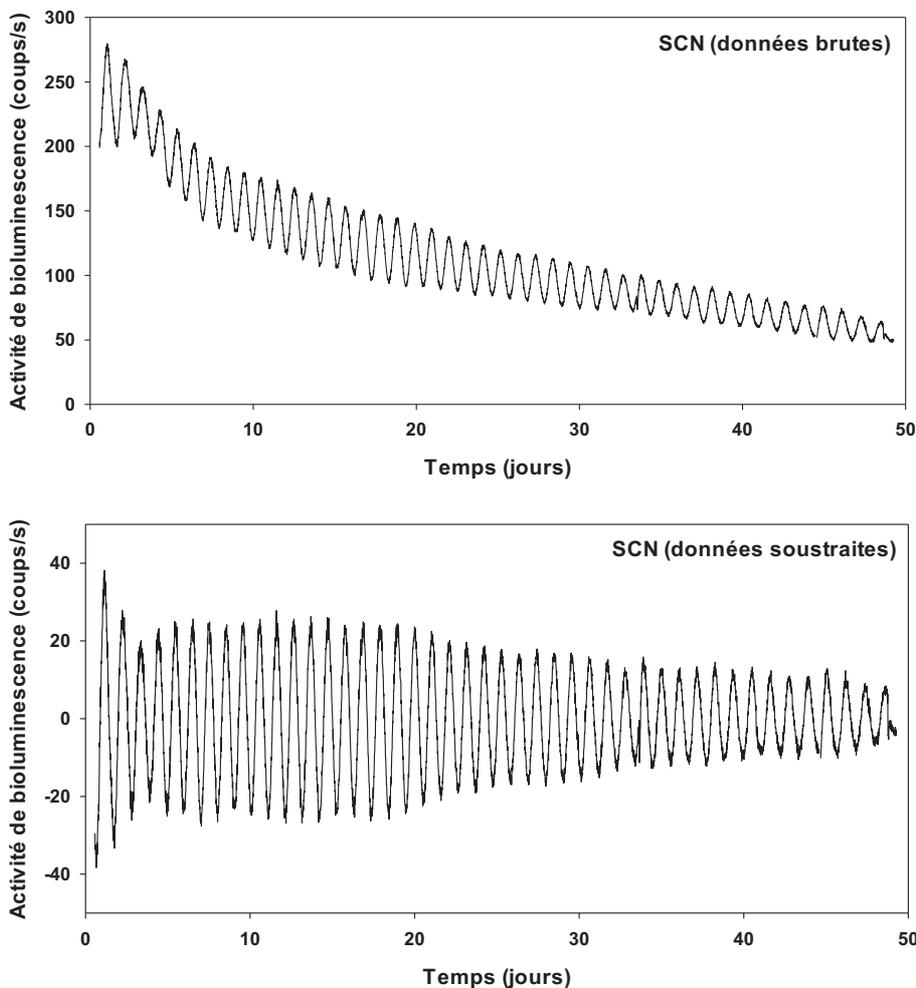


Figure 23 : Enregistrement en bioluminescence d'un SCN de souris en culture.

La bioluminescence reflète le niveau d'expression de la protéine horloge PER2.

Le panneau du haut représente les données brutes, celui du bas représente les mêmes données auxquelles a été soustraite une ligne de base (moyenne mobile sur 24h) afin d'aligner les oscillations sur une ligne horizontale en zéro.

Données du Dr Jorge Mendoza.

II.1 / La réaction de bioluminescence et son enregistrement

La Luciférase de luciole (*Photinus pyralis*) est une enzyme michaélienne de 600 acides aminés (soit 61 kDa), monomérique, qui ne subit pas de modifications post-traductionnelles et qui est rapidement dégradée. Ces paramètres en font un rapporteur de haute résolution temporelle. De plus, l'absence de nécessité d'une source d'excitation (comme pour la fluorescence) et la facilité de détection de son activité lui confèrent un haut rapport signal / bruit de fond. Elle catalyse l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine en présence d'ATP et d'ions Mg^{2+} (Figure 24), une réaction qui libère des photons d'une longueur d'onde de 612 nm à 37°C (Zhao *et al.*, 2005). Lorsque les substrats de la réaction sont en quantité saturante, la quantité de photons émise est proportionnelle à la quantité d'enzyme, et reflète ainsi le niveau d'expression du gène dont elle est le témoin.

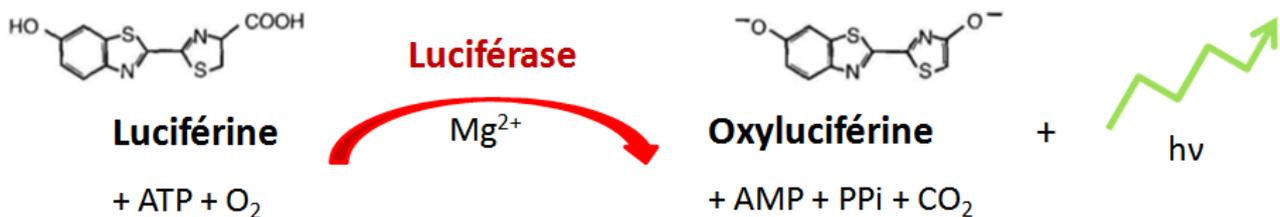


Figure 24 : Réaction catalysée par la luciférase, à l'origine du phénomène de bioluminescence.

Au laboratoire, nous enregistrons la bioluminescence à l'aide d'un LumiCycle (Actimatrix) qui permet l'enregistrement en boucle de 32 échantillons par vagues successives de 4 échantillons simultanés. La fréquence d'enregistrement peut être choisie dans un intervalle allant d'une fois par heure à une fois par minute. L'appareil a une très grande sensibilité et permet le maintien en culture dans des conditions contrôlées de température, mais uniquement dans le noir, sans CO₂ et sans humidité.

II.2 / La lignée de rats *Per1-Luciférase*

La lignée de rats Wistar *Per1-luc* fut créée en 2000 (Yamazaki *et al.*, 2000). Le transgène consiste en un fragment génomique de 6,7 kb du gène *Per1* de souris (comprenant le promoteur et toute la séquence en aval jusqu'au codon d'initiation de la traduction) fusionné au deuxième codon de l'ADNc du gène *Luc* de luciole qui est lui-même fusionné au signal tardif de polyadénylation du virus SV40 (Figure 25). Le promoteur *Per1* de souris contient cinq séquences "boîte E" qui permettent le contrôle de son activité par les dimères CLOCK/BMAL1 et NPAS2/BMAL1.

Figure 25 : Transgène de la lignée de rats *Per1-Luc*. (Yamazaki *et al.*, 2000).

Ce schéma représente, de gauche à droite : le promoteur du gène *Per1* avec 5 séquences "boîtes E", les deux premiers exons de *Per1* séparés par le premier intron, la séquence codante du gène *Luc* et le fragment contenant le signal de polyadénylation.

Cette lignée contient environ douze copies du transgène par génome. La période de l'activité de roue est de 24,43 h pour ces animaux transgéniques et de 24,33 h pour les animaux sauvages, ce qui indique que le transgène ne dérègle pas la machinerie moléculaire circadienne. Les auteurs montrèrent avec succès des oscillations de bioluminescence pour plusieurs tissus issus de ces animaux et maintenus en culture : les SCN, le muscle squelettique, le poumon et le foie. Ils observèrent que les oscillations se maintiennent beaucoup plus longtemps (jusqu'à 32 jours) dans les SCN que dans les autres tissus (2 à 7 jours) et que les SCN sont plus rapidement entraînés par un décalage du rythme LD que les autres tissus et que le rythme d'activité locomotrice. Les auteurs en déduisirent que l'horloge des SCN entraîne les oscillateurs périphériques pour les synchroniser sur le rythme environnemental et que la coordination entre les tissus est temporairement perdue lors de changements brutaux du cycle LD. (Yamazaki *et al.*, 2000)

II.3 / La lignée de souris PER2::LUCIFERASE

La lignée de souris knock-in (KI) PER2::LUC fut générée sur un fond mixte (C57Bl/6J et 129SvEv) en 2004 (Yoo *et al.*, 2005). Nous utilisons au laboratoire des souris entièrement entretenues sur le fond génétique C57Bl/6J. Le transgène est un gène de fusion entre le gène *Per2* de souris et le gène *Luc* : le fragment *Luc* est inséré entre le dernier exon et la séquence 3' non codante (UTR3') du gène *Per2* (Figure 26). De cette manière, une protéine de fusion PER2::LUC est produite et l'activité de la Luciférase de cette lignée ne reflète pas uniquement l'activité du promoteur *Per2* mais également toute la vie de la protéine PER2. Nous utilisons des souris KI/KI dans lesquelles les deux allèles sont modifiés.

Figure 26 : Transgène de la lignée de souris PER2::LUC (Yoo *et al.*, 2005).

Ce schéma représente, de haut en bas :

- La partie du locus *Per2* qui accueillera le transgène, flanquée de deux séquences de restriction pour EcoRI et comprenant les exons 19 à 23 et l'UTR3' du gène.
- Le vecteur contenant une séquence codant la toxine diphtérique et le transgène avec la séquence codante *Luc*, le gène de résistance à la néomycine encadré de sites loxP, et l'UTR3'.
- L'allèle *Per2* génétiquement modifié.

Pour cette lignée également des contrôles de la perturbation éventuelle de la machinerie horlogère furent réalisés (période endogène et amplitude du rythme d'activité locomotrice, niveau d'activité quotidienne,

degré de décalage du rythme d'activité suite à un créneau de lumière) et montrent qu'il n'y a pas de différences entre animaux sauvages et transgéniques, ce qui indique que la protéine PER2 conserve ses propriétés endogènes. Avec ces animaux, les auteurs confirmèrent le caractère oscillatoire des SCN, du poumon et du foie en culture, et le montrèrent également pour la queue, la cornée, le rein, la glande pituitaire et l'aire rétro-chiasmatique. Mais ils montrèrent que le foie et le poumon sont capables d'osciller jusqu'à 20 jours au même titre que les SCN, et que la lésion des SCN ne mène pas à l'abolition des oscillations des tissus périphériques mais à leur désynchronisation. Suite à ces observations ils remirent en cause le fait que les oscillateurs périphériques ne puissent pas soutenir une activité oscillatoire en l'absence des SCN pour lui conférer un rôle, plus modeste, de coordinateur des phases des autres oscillateurs. (Yoo *et al.*, 2005)

Cette lignée fut utilisée dernièrement pour étudier l'horloge rétinienne (Ruan *et al.*, 2008). Comme la rétine est un tissu photosensible, les auteurs vérifièrent que la lumière émise par la réaction de bioluminescence ne perturbe pas l'horloge rétinienne en comparant les oscillations d'échantillons enregistrés en présence de luciférine à celles d'échantillons auxquels la luciférine est ajoutée au bout de quelques jours. Ne voyant pas de différence entre les deux groupes d'échantillons (amplitude et phase des oscillations), ils en déduisirent que les photons émis par la réaction de bioluminescence n'affectent pas l'horloge rétinienne.

L'intégralité de mon travail de thèse repose sur le suivi en bioluminescence de différentes préparations rétiniennes issues d'animaux *Per1-Luciférase* et *PER2::LUCIFERASE* maintenus en culture. Je vais donc maintenant présenter la mise au point des protocoles de culture, le développement de la technique de préparation des différents types d'échantillons rétiniens ainsi que nos outils d'analyse des données de bioluminescence.

Matériels & méthodes

Ce que l'abeille éprouve en voyant les couleurs, nous ne pouvons évidemment pas l'imaginer. Nous ne connaissons déjà pas l'effet produit sur une autre personne par une couleur qu'elle appelle du même nom que nous. Car l'œil humain n'a jamais pu voir dans l'âme d'une autre personne.

Karl von Frisch



Figure 27 : Illusion quand tu nous tiens...

Les serpents tournants : une illusion de mouvement. Il n'est pas besoin de consignes pour percevoir cette illusion saisissante. Son mécanisme n'est pas décodé, mais est basé sur la répétition du motif et sur son agencement en marches d'escalier de différentes luminances. (Dans Cerveau & Psycho n°20 p.87-89)

L'illusion d'Ehrenstein : une illusion de contraste. N'en déplaise à Coluche, on a découvert un blanc plus blanc que blanc : les lignes radiales donnent l'impression que la partie centrale du motif est plus lumineuse que le fond. (Dans Pour la science n°357 p.84-89)

Ehrenstein version 3.0 : une illusion de couleur. Le fait de rajouter un anneau de couleur qui lie les extrémités internes des lignes radiales et un fond gris à l'intérieur de cet anneau donne l'impression que le fond gris prend la couleur complémentaire de l'anneau (jaune-vert). (Dans Pour la science n°357 p.84-89)

I / La culture

La culture d'organes et tissus est un outil de choix dans l'étude des rythmes circadiens, parce qu'elle place de fait l'objet d'étude dans des conditions constantes (notamment vis-à-vis de la lumière et de la température) et à l'isolement d'influences potentielles du reste de l'organisme (et notamment des SCN), ce qui donne accès à son fonctionnement endogène. Elle n'est cependant pas suffisante puisqu'elle ne reflète pas la réalité de ce qu'il se passe dans le contexte d'un organisme entier et doit être complétée par des investigations *in vivo* pour pouvoir dessiner un portrait complet (autant que faire se peut) et réaliste du fonctionnement de l'organe.

I.1 / La mise au point des protocoles de culture

La première étape de ce travail fut le développement d'un protocole de culture adapté aux rétines de rat et de souris pour des enregistrements en bioluminescence à long terme (une semaine ou plus). La mise au point d'un tel protocole pour les rétines de rat est décrite dans l'**Article 1**, qui ouvre la partie "**Résultats**" de ce manuscrit. La mise au point du protocole de culture pour les échantillons de souris fut plus aisée puisque ce dernier est une version simplifiée du protocole développé chez le rat et est basé sur le protocole décrit par (Ruan *et al.*, 2008). Dans les deux cas, une étape de préincubation de 24 h dans un milieu Neurobasal A avant le début des enregistrements en bioluminescence s'est révélée indispensable, permettant probablement aux échantillons de récupérer du stress de la dissection et plus encore de celui de la séparation des couches (**Figure 28**). De ce fait, les échantillons subissent, outre la dissection, au moins un changement de milieu de culture (qui est un renouvellement du milieu, mais aussi le passage sur un milieu différent) avant le début des enregistrements. Bien que nous n'ayons pas fait de tests statistiques sur cette question, il est vraisemblable que nous perdions alors les informations de phase des rythmes enregistrés, et de ce fait nous ne travaillerons pas sur ce paramètre, sauf pour certaines expériences réalisées à heure fixe et dont la préparation des échantillons est réalisée dans court laps de temps.

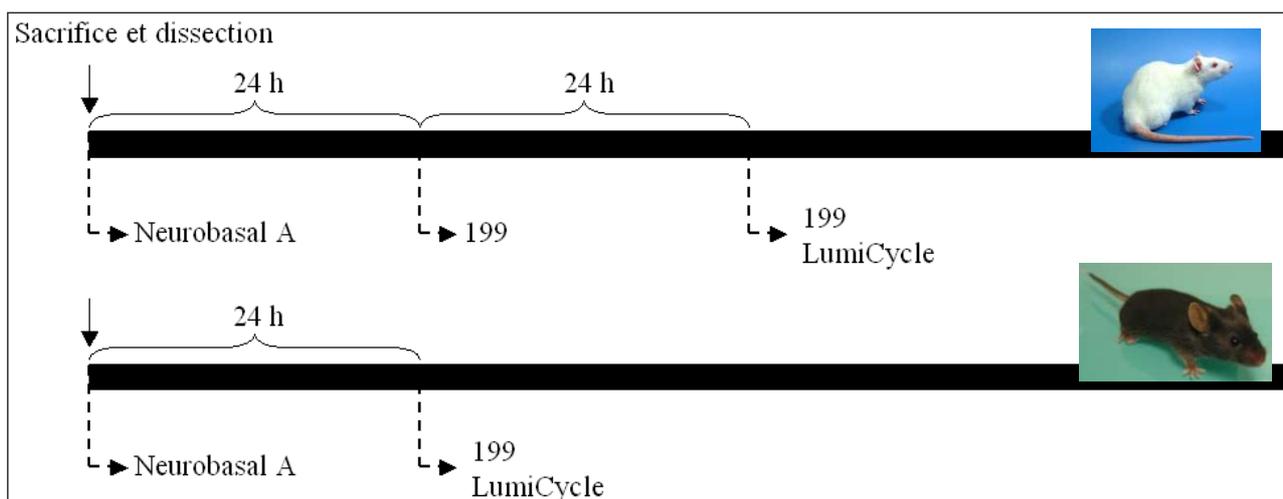


Figure 28 : Protocoles de culture utilisés pour les échantillons rétinien issus du rat (en haut) et de la souris (en bas). Toute la procédure est réalisée à l'obscurité (avec une lumière rouge pour les changements de milieu) et débute par une incubation de 24 h en milieu Neurobasal A dans un incubateur à 5 % de CO₂. Les enregistrements sont réalisés dans des boîtes de culture scellées et en milieu 199 tamponné pour un taux de CO₂ atmosphérique.

I.2 / Les coupes au vibratome

Le développement des coupes de rétine au vibratome a représenté la plus grande part du travail de mise au point technique que j'ai effectué durant ma thèse.

L'isolement de couches de photorécepteurs de rétines de rat grâce au vibratome est pratiqué dans l'équipe d'après la méthode développée par (Fontaine *et al.*, 1998). J'ai étendu cette méthode à l'ensemble des trois couches rétinienne de rat, puis les ai adaptées chez la souris. Je les ai également étendues à la préparation de "doubles couches" (INL+PRL et GCL+INL). La mise au point a consisté, pour chaque type de préparation, à déterminer le sens optimal de coupe (est-ce la face interne ou externe de la rétine qu'il faut présenter en premier à la lame ?) ainsi que le nombre d'étapes de coupe et leur profondeur.

La technique consiste à déposer une rétine à plat sur un bloc de gélatine, puis à l'enrober de gélatine. La lame du vibratome est ensuite abaissée progressivement jusqu'à atteindre la surface de la rétine. Différentes coupes sont effectuées successivement jusqu'à obtenir la couche de tissu souhaitée. Chaque coupe est observée au microscope pour en évaluer la composition cellulaire et choisir la profondeur de la coupe suivante. Cette observation permet également d'avoir une idée de la qualité de l'échantillon obtenu (composition cellulaire, état physique) et de retirer manuellement les éventuelles portions contaminées.

La difficulté est qu'il est pratiquement impossible de définir des grilles standard de coupe pour les différents types de préparation. En effet, le tissu est tellement fin que la marge d'erreur est faible (la plus fine épaisseur de coupe possible pour obtenir une couche cultivable est de 40 μm dans un tissu de 150 – 250 μm d'épaisseur) et il faut adapter la coupe à chaque échantillon :

- une fois les rétines mises à plat, leur épaisseur peut varier considérablement par rapport aux épaisseurs utilisées lors du travail de coupe (cela dépend notamment des éventuels restes de vitré à la surface de la rétine et de la quantité de gélatine déposée par-dessus)
- la lame du vibratome effleure la surface de la rétine à une profondeur variable
- le fait d'aller par petites étapes permet d'ajuster les profondeurs coupe après coupe, de manière à maximiser les chances d'obtenir un échantillon optimal (un maximum de la couche souhaitée et un minimum de restes des autres couches).

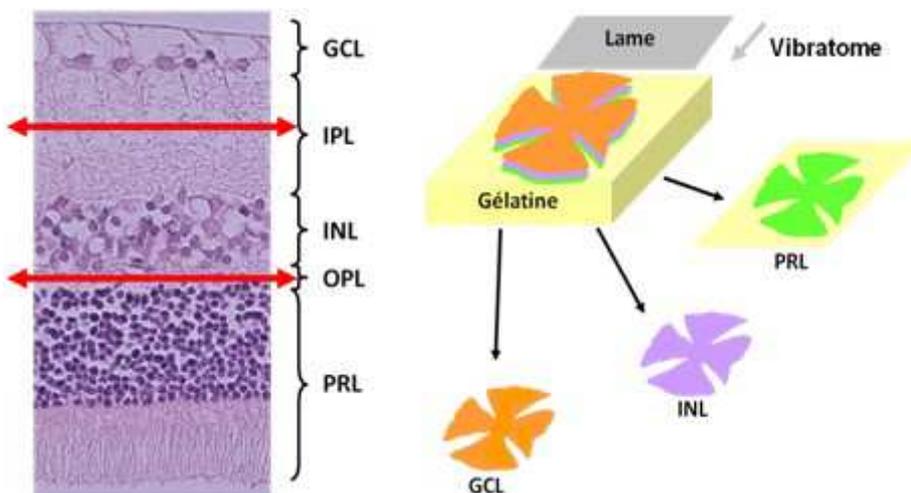


Figure 29 : Séparation des couches rétinienne au vibratome.

Le but est de couper horizontalement une rétine à plat, au niveau des couches plexiformes.

Remarques :

– En général une seule couche peut être récupérée à partir d'une rétine

– La GCL est obtenue en retournant la rétine sur le bloc de gélatine (face GCL contre le bloc)

II / L'analyse des données de bioluminescence

II.1 / Avec LumiCycle Analysis

La société Actimetrics fournit, avec le LumiCycle, un logiciel d'analyse des courbes de bioluminescence appelé LumiCycle Analysis. Les analyses sont réalisées en deux étapes. La première consiste à soustraire une ligne de base aux données afin d'aligner les oscillations sur une horizontale. La méthode que nous choisissons pour cela est une moyenne mobile sur 24 h. Une deuxième étape applique sur les données soustraites un modèle mathématique afin de déterminer leurs paramètres de période, d'amplitude, de phase et d'amortissement.

Pour certaines analyses préliminaires, nous utilisons ces options pour obtenir une amplitude moyenne des oscillations sur une fenêtre d'analyse de 72 h à partir du démarrage de la première oscillation circadienne, à l'aide de la fonction "Periodogram" basée sur l'algorithme de Bushell et Sokolove (Sokolove and Bushell, 1978). Nous déterminons également manuellement les acrophases des pics de bioluminescence des données soustraites (c'est-à-dire leurs positions sur l'axe du temps) à l'aide d'un curseur mobile (Figure 30).

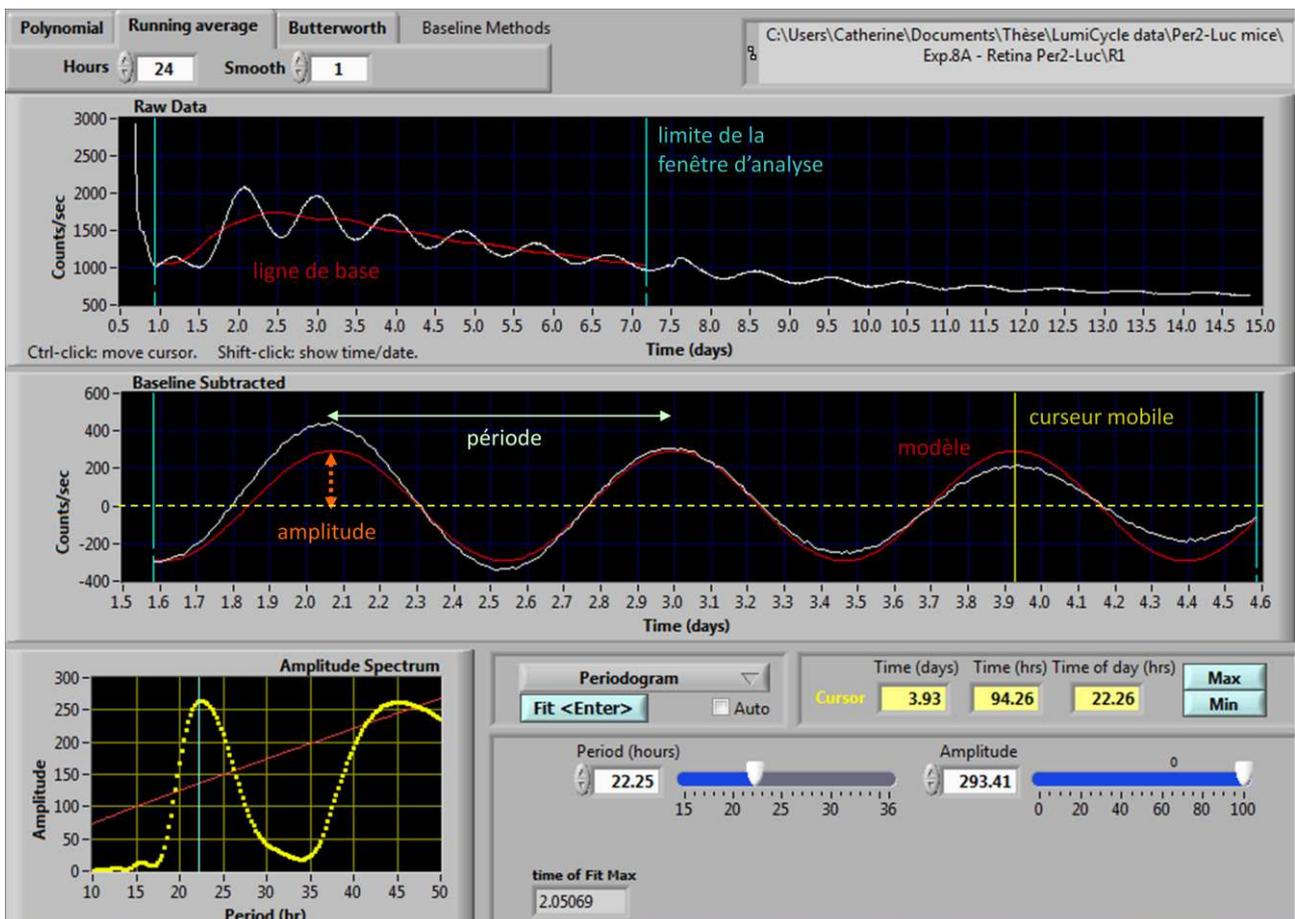


Figure 30 : Interface du logiciel LumiCycle Analysis.

La partie haute de la fenêtre représente les données brutes (en blanc) et la ligne de base (en rouge) qui leur sera soustraite (ici une moyenne mobile sur 24 h) entre les bornes délimitées par les curseurs bleus. La partie médiane présente les données soustraites (en blanc) et le modèle qui leur correspond (en rouge) suite à l'application de l'une des méthodes d'analyses proposées (ici "Periodogram"). Enfin, la partie basse indique le résultat de l'analyse et permet une lecture de la position du curseur mobile sur l'axe du temps.

Pour les expériences qui consistent en une stimulation en cours d'enregistrement, le déphasage éventuellement induit par la stimulation est calculé comme une déviation des acrophases des pics post-stimulation par rapport aux prédictions faites à partir des acrophases des pics pré-stimulation et des périodes propres à chaque échantillon, déviation qui est comparée à celle d'un groupe contrôle.

II.2 / Avec SigmaPlot

Pour certains types d'échantillons, nous avons été confrontés à des oscillations de faible amplitude et souvent très bruitées et irrégulièrement dessinées. Le logiciel LumiCycle Analysis ne permet alors pas d'effectuer une analyse satisfaisante des données, et n'offre qu'une mainmise limitée sur l'analyse elle-même.

Avec le Dr André Malan et avec l'aide de Katell Mellac (une étudiante en Master de statistiques), nous avons donc développé une méthode d'analyse de la période des oscillations (le paramètre qui s'avère le plus spécifique du type d'échantillon) à partir des données brutes avec le logiciel SigmaPlot. Le choix de l'utilisation des données brutes s'est imposé afin d'utiliser les données dès la première oscillation, sans biais apporté par le calcul d'une moyenne mobile qui prend en compte les données enregistrées en amont de la première oscillation et qui n'ont rien de circadien. Nous avons choisi une fenêtre d'analyse de trois jours à partir du démarrage de la première oscillation circadienne, ce qui nous semblait un juste milieu pour obtenir une analyse fiable de la période tout en limitant la prise en compte d'une évolution possible de cette dernière avec le temps de culture, étant donné que notre système ne permet pas le renouvellement continu du milieu de culture.

L'analyse a consisté à modéliser les oscillations par une fonction sinusoïdale amortie, et la tendance générale (la ligne de base) par un polynôme du troisième degré (**Figure 31**) :

$f(x) = c + d \cdot x + e \cdot x^2 + g \cdot x^3 + (a - b \cdot x) \cdot \sin[2 \cdot \pi \cdot (x + \phi) / \tau]$ où :

- **c**, **d**, **e** et **g** sont les paramètres du polynôme
- **a** est l'amplitude de la sinusoïde et **b** son amortissement (selon une fonction linéaire)
- **τ** et **ϕ** sont la période et la phase de la sinusoïde
- **x** est le temps

Le choix d'une fonction linéaire pour modéliser l'amortissement des oscillations n'est pas optimal, et engendre de légères imperfections dans le modèle. Ce choix a été motivé par le souci de limiter le nombre de paramètres dans l'équation et est justifié par le fait que le paramètre qui nous intéresse en premier lieu est τ (nous avons fait ce constat dès les premières expériences qui répondent à la question de l'Objectif 1 et qui seront présentées dans l'Article 2 de la partie "**Résultats**"), mais il est évident que ce modèle n'est pas adéquat pour une analyse de l'amplitude des oscillations.

Le nombre élevé de paramètres dans l'équation entraîne un phénomène de multicollinéarité qui diminue la fiabilité des paramètres calculés. Les paramètres dispensables ont été supprimés pour chaque échantillon par une méthode de régression descendante (également confirmée par une régression ascendante). Puis les paramètres indispensables (comme la valeur de ϕ) ont été progressivement remplacés par leur valeur estimée par la première analyse de manière à limiter la multicollinéarité tout en maintenant une qualité maximale du modèle. La normalité et l'homoscédasticité des résidus du modèle ont été vérifiées et leur défaillance n'a été ignorée que si la qualité du modèle était suffisamment élevée pour que ce dernier soit intrinsèquement fiable ($F > 100$ et $r^2 > 0.9$).

Les valeurs de τ issues de cette analyse sont associées à une erreur qui interdit de procéder à des analyses statistiques simples. Afin d'éviter des analyses statistiques faites de régressions lourdes sur un grand nombre de données, nous avons vérifié s'il était possible de simplifier la procédure en ignorant ces erreurs. Pour cela nous avons montré, en comparant pour chaque groupe d'échantillons la variance inter-échantillon à la variance intra-échantillon, que les erreurs sur les valeurs de τ sont négligeables par rapport à la variabilité des valeurs de τ entre échantillons d'un même groupe, et qu'il était donc possible de négliger ces erreurs. Nous avons donc considéré les valeurs de τ comme des valeurs uniques et avons procédé à des tests statistiques simples pour comparer ces valeurs entre les différents groupes.

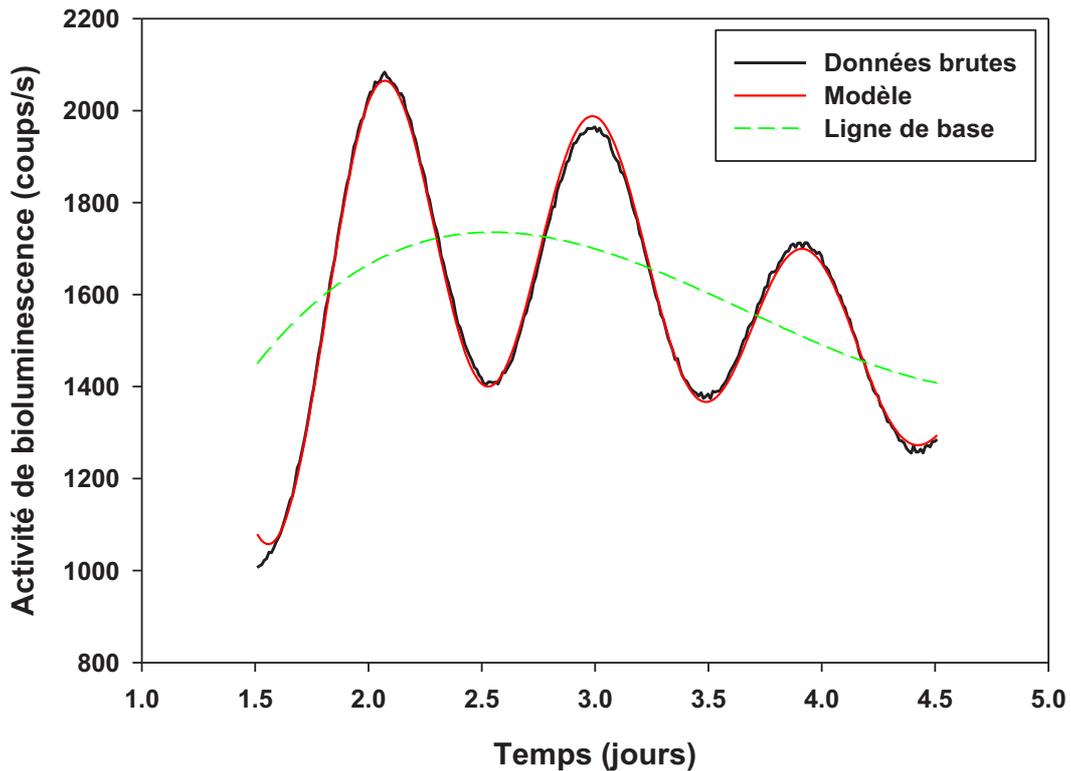


Figure 31 : Exemple de régression (en rouge) sur un jeu de données brutes (en noir) issu de l'enregistrement en bioluminescence d'une rétine de souris PER2::LUC. La ligne de base du modèle est représentée en pointillés verts.

II.3 / Les tests statistiques

Les données sont exprimées par des moyennes associées à une SEM (erreur standard à la moyenne).

Les analyses statistiques sont des ANOVA (analyses de variance) à un facteur lorsqu'il s'agit de comparaisons simples, et des ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées lorsqu'il s'agit de comparer l'évolution d'un paramètre avant et après un traitement, suivies si nécessaire de comparaisons multiples par le test post-hoc de Tukey. Le cas échéant, la variabilité des paramètres mesurés est comparée entre les groupes par un test de Bartlett d'homogénéité des variances.

Résultats

Quel spectacle inattendu !

Sur le fond jaune parfaitement translucide, apparaissaient des filaments noirs clairsemés, lisses et fins, ou épais et épineux, en même temps que des corps noirs, triangulaires, étoilés, ou en fuseau ! On aurait pu penser qu'il s'agissait de dessins à l'encre de chine sur un papier japonais transparent.

Ici, tout était simple, clair, et sans confusion.

Une fibre élancée qui naissait de la cellule s'étendait sur des distances considérables et s'ouvrait soudain en un éventail, d'où jaillissaient d'innombrables fibres.

L'œil, étonné, ne pouvait être arraché à cette contemplation.

La technique dont on avait rêvé est une réalité !

Santiago Ramón y Cajal

Figure 32 : Première page de la partition du premier mouvement de la symphonie n°101 (dite "L'horloge") de Franz Joseph Haydn.

Cette symphonie fait parties des six symphonies dites *londoniennes* que Haydn créa entre 1794 et 1795 au cours de son deuxième séjour à Londres. Elle doit son nom au rythme de balancier qui marque obstinément la pulsation, de pupitre en pupitre, dans son deuxième mouvement (*Andante*).

I / Mise au point d'un outil d'étude de l'horloge rétinienne chez le rat

Ce paragraphe est constitué de l'**Article 1** qui montre des travaux réalisés dans le but de décrire les propriétés intrinsèques de l'horloge rétinienne du rat à partir d'explants maintenus en culture. La première partie de l'article explore la rythmicité de l'expression en libre cours de différents gènes horloge et gènes de sortie de l'horloge par qPCR. La seconde partie présente la mise au point des conditions de culture pour l'enregistrement en bioluminescence d'explants rétiniens de rat *Per1-Luc* réalisée dans le cadre de ma thèse (p. 76-78).

Article 1

RAT RETINA SHOWS ROBUST CIRCADIAN EXPRESSION OF CLOCK AND CLOCK OUTPUT GENES IN EXPLANT CULTURE

Daniella C. Buonfiglio ², André Malan ¹, Cristina Sandu ¹, Catherine Jaeger ¹, José Cipolla-Neto ², David Hicks ¹ and Marie-Paule Felder-Schmittbuhl ¹

¹ Département Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives UPR3212, CNRS, Université de Strasbourg, France

² Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author: Marie-Paule Felder-Schmittbuhl, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France, Tel: +33 3 88 456644, Fax: +33 3 88 456654, email: feldermp@inci-cnrs.unistra.fr

Key Words: retina explants, clock genes, circadian rhythms, rat

The authors disclose any financial conflict of interest

Abstract

Purpose: Circadian rhythms are central to vision and retinal physiology. A circadian clock located within the retina controls various rhythmic processes including melatonin synthesis in photoreceptors. In the present study we evaluated rhythmic expression of clock genes and clock output genes in retinal explants maintained for several days in darkness. **Methods:** Retinas were dissected from Wistar rats, either wild type or from the *Per1-luciferase* transgenic line housed under a daily 12 h: 12 h light/dark cycle (LD12/12), and put in culture at zeitgeber time (ZT) 12 on semi-permeable membranes. Explants from wild type rats were collected every 4 h over 3 days and total RNA was extracted, quantified and reverse transcribed. Gene expression was assessed by quantitative PCR, and periodicity of relative mRNA amounts was assessed by non-linear least square fitting to sine wave functions. Bioluminescence in explants from *Per1-luciferase* rats was monitored for several days under three different culture protocols. **Results:** Rhythmic expression was found for all studied clock genes and for clock downstream targets such as *c-fos* and *Aanat* (arylalkylamine N-acetyltransferase) genes. Clock and output genes cycled with relatively similar periods and acrophases (peaks of expression during subjective night, except for *c-fos*, which peaked around the end of subjective day). Data for *Per1* were confirmed by bioluminescence monitoring, which also permitted to optimize culture conditions to study the retina clock. **Conclusions:** Our work shows the free-running expression profile of multiple clock genes and potential clock targets in mammalian retinal explants. It further strengthens the notion that the retina contains a self-sustained oscillator that can be functionally characterized in organotypic culture.

Introduction

Night/day transitions are major events to which living organisms have to adapt their physiology and behavior. Such daily changes rely on circadian rhythmicity in cellular and molecular events. These rhythms are generated by a hierarchical network of oscillators, comprising a central clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) which is synchronized with daily environmental light cues via the retina, and a series of peripheral oscillators receptive to synchronizing information produced by the SCN [1]. At the molecular level, circadian oscillators involve the interconnection of transcriptional/translational feedback loops, involving clock genes such as *Bmal1*, *Clock*, *Per1-2*, *Cry1-2*, *RevErb α* and *Rora* or *Ror β* , which have the property to entrain the expression of “clock-controlled genes” and thereby to drive rhythmic gene expression programs [2]. Retinas possess endogenous timekeeping systems ensuring adjustment of their function to daily changes in light intensity [3-5]. As a result, many cellular, biochemical and physiological processes in the retina, such as rod outer segment disc shedding and phagocytosis [6], synthesis and release of melatonin [7] and dopamine [8] are remarkably rhythmic [9, 10]. Several clock-controlled genes have been identified in the retina, specifically in photoreceptors: *Aanat* which encodes the rate-limiting enzyme in melatonin synthesis [11], *c-fos* [12] and visual pigment genes [13-15]. Retina was the first tissue outside of the SCN to be shown to harbor a circadian clock, based on the ability of hamster retina cultures to display an autonomous and light-entrained rhythm of melatonin synthesis [7]. Accordingly, several clock genes analyzed at the level of the whole retina *in vivo* display circadian rhythmic patterns [16-21]. In addition, the *Bmal1* gene was shown to be indispensable in the eye for optimal gene expression rhythms [14]. However, mechanisms and localization of the retinal molecular clock(s) driving these rhythms have so far remained elusive in mammals. Several studies analyzed the multi-layered distribution of clock gene transcripts in the retina [19, 20, 22-25]. Localization of circadian oscillators was also addressed more recently by *in vitro* bioluminescence studies with transgenic animals carrying a *luciferase* reporter under the control of *Period* gene promoters, but these studies mainly concentrated on expression profiles of one clock gene [17, 26].

Explanted tissues are well adapted to the investigation of mechanisms generating autonomous biological rhythms because they exclude other time-giving inputs, for instance from the central clock. Retina is especially suited to such approaches because axonal lesions are limited to the optic nerve. In the present study we asked whether whole retina explants from adult Wistar rats display rhythms in clock gene and clock output gene expression in constant conditions by qPCR analysis and bioluminescence recordings using *Per1-luciferase* rats. Our work describes free-running expression profiles of the principal clock genes as well as selected outputs in rat retinal explants, and shows that robustness of the retina clock *in vitro* strongly depends on culture conditions.

Methods

Animal care and handling

All animal procedures were performed at Chronobiotron UMS 3415 – CNRS, Strasbourg according to the rules of the French Department of Agriculture (license no 67-67-298) and the European Committee Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in agreement with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Protocols were approved by the Animal Use and Care Committee from Strasbourg. Retinal explant cultures were prepared from male Wistar rats (5-6 weeks old), either wild type or from the *Per1-luciferase* transgenic strain [27], housed under 12 h light (300 lux)/12 h dark conditions [LD: lights off at zeitgeber time (ZT) 12; ZT0 being defined as the moment lights were turned on], with water and food ad-libitum. Animals were euthanized with CO₂ (20% in an air tight box) between ZT8 and ZT9 and eye globes immediately collected and processed under room light according to subsequent use.

Sample preparation and culture

For qPCR analysis (wild type Wistar rats), eye globes were placed in cold CO₂-independent medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After the sclera, choroid and retinal pigmented epithelial tissues were removed, the retina was teased away from the vitreous body and four small radial cuts were made around the periphery of the retina to facilitate flattening. All successively dissected retinas were maintained flattened with photoreceptor side down on a glass slide covered with cold CO₂-independent medium in a humid chamber until ZT11. Between ZT11 and ZT12 each retina was transferred, photoreceptor side down, onto a 35-mm culture dish that contained a Millicell organotypic insert (Millipore, Billerica, MA, USA) and Neurobasal-A Medium (Invitrogen) supplemented with 2% B27 (Invitrogen), 2 mM L-Glutamine and antibiotics (10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin). Retinal explants were incubated under constant darkness at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere starting at ZT12 (**Figure 1**, protocol M0) and for up to 3 days. Explants (n = 3 per time point) were collected every 4 h under dim red light by using sterile forceps, snap frozen on dry ice and stored at -80°C until further processing. Four distinct experiments were performed : two in which sampling was done from 4 h to 48 h of culture and two in which sampling was done from 16 h to 72 h of culture.

For bioluminescence studies (*Per1-luciferase* Wistar rats) eye globes were processed the same way as above but in cold Hank's saline buffer (Sigma, St Louis, MO, USA) and whole retina explants were either kept in the same conditions (M0: in this case the medium was supplemented with 100 µM luciferin [Promega, Fitchburg, WI, USA] and saturated with 5% CO₂ prior to transfer into Lumicycle) or were transferred to 199 medium (Sigma, St Louis, MO, USA) 24 h later, before starting bioluminescence recording (**Figure 1**, protocol M1: 199 medium was supplemented with 20 mM glucose, 2 % B27, 0.7 mM Glutamine, 100 µM luciferin, 25 U/ml penicillin and 25 µg/ml streptomycin) or were transferred to 199 medium 24 h later and this medium was again renewed 24 h later before starting bioluminescence recording (**Figure 1**, protocol M2).

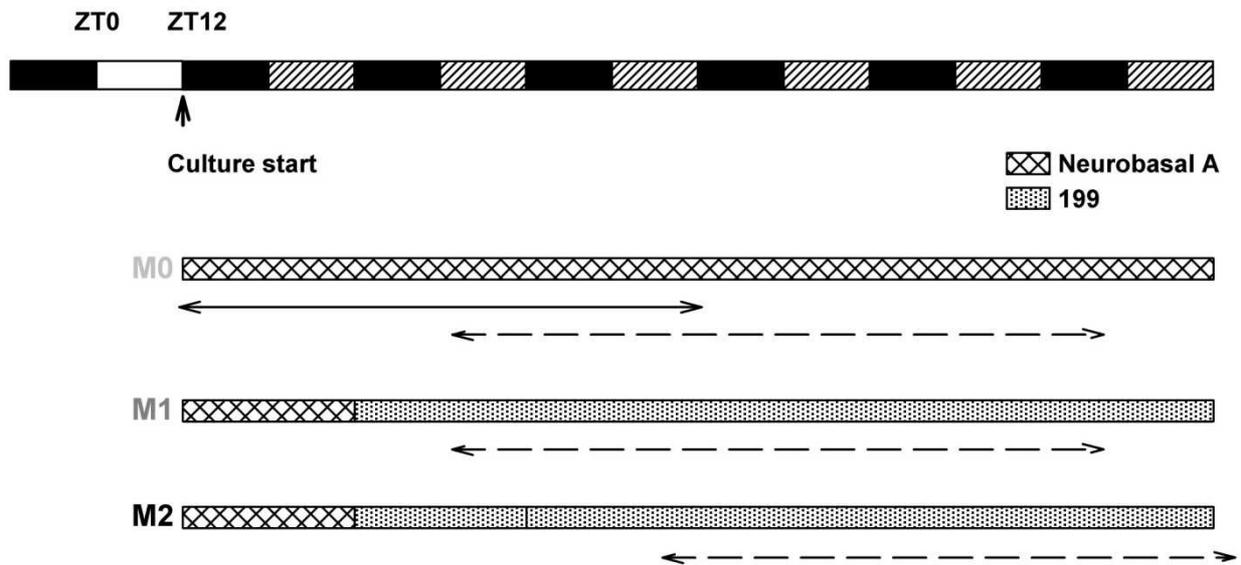


Figure 1. Schematic diagram showing the timing of retina explant cultures. Solid white and black boxes at the top left show the lighting schedule to which animals were exposed prior to sacrifice (white: 12 h light, black: 12 h dark). All cultures were started at ZT12, corresponding to the beginning of the night period and were maintained in constant dark. Alternating black and hatched rectangles thereafter indicate the projections of the previous lighting schedule (black: dark, hatched; light). In M0 protocol, retina explants were cultured on Neurobasal A medium (with luciferin when adequate) throughout the experiment, without any medium change. The time window corresponding to retina sampling for qPCR analysis is shown by a double arrow. In M1 protocol, retinas were incubated on Neurobasal A during 24 h and then transferred to 199 medium supplemented with luciferin. In M2 protocol, retinas were incubated on Neurobasal A during 24 h as in M1, transferred to 199 medium for 24 h and medium was again refreshed after 24 h and supplemented with luciferin. The time windows during which bioluminescence data were analyzed are shown by dashed double arrows.

Isolation of total RNA

Total RNA was extracted from cultured retinas using Absolutely RNA[®] Miniprep Kit (Stratagene, Santa Clara, CA, USA) including RNase free DNase treatment to remove contaminating genomic DNA. Concentration and purity of isolated total RNA was measured by spectrophotometry (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} values were between 1.8 and 2.0). Quantification was confirmed by agarose gel electrophoresis: RNA samples had sharp ribosomal RNA bands with no sign of degradation. No significant quantitative or qualitative differences between the different time point groups were visible.

Reverse transcription

Isolated RNA (0.5 μg) was transcribed into first strand cDNA with 200 U of *RevertAidTM H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas, Burlington, Canada) and 0.2 μg of random hexamer primers in a total reaction volume of 20 μl . The resulting cDNA sample was stored at -80°C .

Real-time quantitative PCR

Quantitative PCR was performed using the 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the hydrolysed probe-based TaqMan chemistry. We used optimised TaqMan[®] Gene Expression Assays designed to specifically amplify mRNA (Applied Biosystems; **Table 1**). PCR reaction was performed in duplicates with 1 μl of cDNA at appropriate dilution supplemented with 10 μl of TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, No AmpErase[®] UNG (2 X) (Applied Biosystems), 1 μl of 20 X TaqMan[®] Gene

Expression Assay Mix and 8 µl of RNase-free water. Thermal Cycler conditions were as follows: 10 min at 95°C, then 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. No-template controls were included for each primer pair to check for any contaminant. For all Gene Expression Assays, amplification efficiency was determined with a cDNA dilution curve corresponding to the ongoing experiment and had values between 1.8 and 2.0. Gene expression was measured as relative mRNA amounts by using the comparative Ct method and, as a calibrator, the 28 h time point (T28), a time point which was common to the 4 experiments. No single studied gene reached the criteria to be used as a reference gene, and thus data are presented without reference to endogenous control genes [28].

For a certain gene, relative mRNA amount in sample x (RQ_x), expressed with respect to the amount of mRNA at T28, was calculated as follows: $RQ_x = E^{-(Ct_x - Ct_{T28})}$ where E = efficiency calculated with the group of samples regarding the Taqman set, Ct_{T28} = mean Ct value for the 3 samples at T28 (= calibrator), Ct_x = the Ct value for sample x. This allowed to express RQ values for each individual sample with respect to the 28h time point, which mean RQ in the experiment was artificially set at 1.

RQ values were calculated that way in the 4 distinct experiments and were thus expressed relatively to T28 which was common to all 4 experiments and artificially rescaled to 1. Since the general drift was similar in all experiments, this allowed us to include all the RQ values into a unique analysis over 3 days in culture (see below), in which the mean RQ at T28 of the 4 experiments would still be 1.

Target Genes	TaqMan Gene Expression Assay	RefSeq
<i>Clock</i>	Rn00573120_m1	NM_021856.1
<i>Bmal1</i>	Rn00577590_m1	NM_024362.2
<i>Per1</i>	Rn01496757_m1	NM_001034125.1
<i>Per2</i>	Rn01427704_m1	NM_031678.1
<i>Cry1</i>	Rn01649292_m1	NM_198750.2
<i>Cry2</i>	Rn00591457_m1	NM_133405.1
<i>Rorb</i>	Rn01451215_m1	XM_219749.4
<i>RevErba</i>	Rn00595671_m1	NM_145775.1
<i>Aanat</i>	Rn00563117_m1	NM_012818.1
<i>c-fos</i>	Rn02396759_m1	NM_022197.1

Table 1. TaqMan Gene Expression Assays used in the study. Reference (Applied Biosystems) and GenBank accession number (RefSeq) are given for each studied mRNA.

Statistical analysis of qPCR results

Rhythmicity of gene expression was first evaluated on relative mRNA amounts (log) by the Cosinor method (Systat Software Inc. San Jose, CA, USA) after [29]. To better characterize rhythmic parameters, mathematical analysis of the time course of relative mRNA amounts (log) was performed by non-linear least-square fitting to a sine wave equation added to a linear drift term, using SigmaPlot V 12 software (Systat Software Inc. San Jose, CA, USA): $y = y_0 + b \cdot t + c \cdot \cos [2\pi(t-\phi)/\tau]$, where τ is the endogenous period (h), ϕ is the phase (h) and c is the amplitude. Normality of distribution (Kolmogorov-Smirnov), lack of collinearity (VIF) and constancy of variance were checked with the tests provided in the software and were satisfactorily fulfilled.

Bioluminescence measurement and analysis

Explant cultures sealed with vacuum grease were placed into the Lumicycle (Actimetrics, Wilmette, IL, USA) at ZT12 and *Per1* activity was measured at 36.5°C for up to 7 days. Bioluminescence was analysed with the Lumicycle Analysis software (Actimetrics) both to generate de-trended curves (24 h moving average) and to calculate their rhythmic power [30] (recording interval from day 1.5 to 6.5) in the periodogram analysis [31]. To calculate periods of oscillations, baseline-subtracted bioluminescence curves covering 4 full cycles were fitted with cosine curves adapted to each protocol. In protocol M0 there was no obvious damping of the amplitude over the 4 studied cycles and we used: $y = y_0 + c \cdot \cos[2\pi(t-\phi)/\tau]$ where τ is the endogenous period (days), ϕ is the phase (days) and c the amplitude (arbitrary units). Bioluminescence curves obtained under protocol M1 and M2 showed higher amplitude but damping oscillations and were thus fitted to cosine curves including an exponential damping component: $y = y_0 + c \cdot \exp(-t/d) \cdot \cos[2\pi(t-\phi)/\tau]$ where d represents the time (days) needed for the amplitude to display a 63 % reduction.

Statistical analyses of bioluminescence results

Differences in period and rhythmic power of bioluminescence oscillations were analysed by using one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* comparisons with the LSD Fisher test (SigmaPlot V 12 software; Systat Software).

Histology

Retina explants were prepared according to protocol M2. Fixation (1 h at 4°C) was performed either immediately after transfer of the explant onto the semi-permeable membrane, or after 2, 4 or 9 days of culture, by replacing the medium with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). Samples were embedded (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Tokyo, Japan) and 10 μm sections were prepared and stored at -20°C until ready for use. They were stained with Carazzi's hematoxylin (6.67 mg/l solution for 5 minutes) and counterstained with eosin (0.25% in acetic acid 0.16%) for 30 seconds.

TUNEL analysis

Apoptosis was assessed with a commercial kit (In situ Cell Death Detection Kit-Fluorescein; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) on sections prepared as for histology, pretreated 30 min at room temperature with Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS, Roche) and permeabilized with Triton X-100 0,1% / sodium citrate 0,1% / PBS (8 min, room temperature). The solution mixture was placed on sections in a dark humid chamber at 37°C for 1 hour according to the manufacturer's instructions and positive and negative controls were treated likewise. Cell nuclei were stained with 4,6-diaminophenyl-indolamine (DAPI diluted at 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS; Sigma) and sections were mounted with PBS/glycerol 1:1 and then observed under a fluorescent microscope (Nikon Optiphot 2). Images were obtained by CCD camera video capture linked to a dedicated PC containing image analysis software (Nikon BIA).

Results

Expression patterns of clock genes and clock output genes in rat retina explants

To investigate the capacity of the retina clock to work as an autonomous oscillator we assessed kinetics of clock gene expression in whole retina explants maintained in culture in the dark. 4 independent experiments were performed, in which retina explants were sampled every 4 hours ($n=3$ for each time point), either between 4 and 48 or between 16 and 72 hours of culture, and relative mRNA amounts were measured by quantitative real time PCR for 8 clock genes: *Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *RevErba* and *Rorb*. A common calibration time point (28 h of culture) was used to quantify gene expression across the 4 sample series. Expression of all examined clock genes over 3 days of culture showed a cyclic profile (**Figure 2**) confirmed by Cosinor analysis [29](data not shown). Moreover, the data could be fitted to an oscillating function coupled with a linear drift (**Table 2**) with calculated periods ranging from 21.29 ± 1.08 h to 23.54 ± 1.32 h. All the calculated acrophases (**Table 2**) clustered between 7 and 10 h (time after culture start); indeed, all the first peaks occurred during the second half of the subjective night (**Figure 2**). Taken together, these results show that mRNA levels of all studied clock genes oscillate in a circadian manner in explanted retinas maintained in constant, dark conditions.

Previous studies have revealed a subset of genes potentially regulated by the retinal clock, including *Aanat*, which encodes the rate limiting enzyme of melatonin synthesis, and *c-fos*, both of which display strong amplitude oscillations [11, 12, 19]. We studied expression of these clock output genes in a 48 h culture by qPCR analysis. By using the same mathematical analysis as above, we found that expression of *c-fos* and *Aanat* was rhythmic (**Figure 3**) with periods that were also in the circadian range; respectively 25.23 ± 2.04 h and 20.82 ± 1.17 h (**Table 2**), and with peaks of *Aanat* expression being delayed with respect to those of *c-fos* (**Table 2** and **Figure 3**).

	c (amplitude)	ϕ (phase in h)	τ (period in h)	p-value
Clock genes				
<i>Bmal1</i>	0.07 ± 0.02	9.02 ± 1.25	22.02 ± 1.54	<0.0001
<i>Clock</i>	0.06 ± 0.02	7.39 ± 2.00	23.54 ± 1.32	0.0009
<i>Per1</i>	0.06 ± 0.02	8.72 ± 1.53	23.17 ± 1.04	0.0012
<i>Per2</i>	0.11 ± 0.02	7.76 ± 1.32	23.23 ± 0.87	<0.0001
<i>Cry1</i>	0.07 ± 0.02	9.34 ± 1.34	21.55 ± 0.91	<0.0001
<i>Cry2</i>	0.07 ± 0.02	8.36 ± 1.54	22.51 ± 1.01	<0.0001
<i>Reverba</i>	0.07 ± 0.02	9.86 ± 1.61	21.29 ± 1.08	<0.0001
<i>Rorb</i>	0.06 ± 0.01	7.83 ± 1.62	21.91 ± 1.05	<0.0001
Clock controlled genes				
<i>Aanat</i>	0.14 ± 0.03	8.95 ± 0.83	20.82 ± 1.17	<0.0001
<i>c-fos</i>	0.12 ± 0.03	24.27 ± 2.22	25.23 ± 2.04	<0.0001

Table 2. Mathematical analysis of clock gene and clock-controlled gene mRNA rhythmicity in retina explants cultured respectively for 72 and 48 h. Data (relative mRNA amounts, in log units) were fitted to the equation $y = y_0 + b \cdot t + c \cdot \cos [2\pi(t-\phi)/\tau]$ by non linear least square regression.

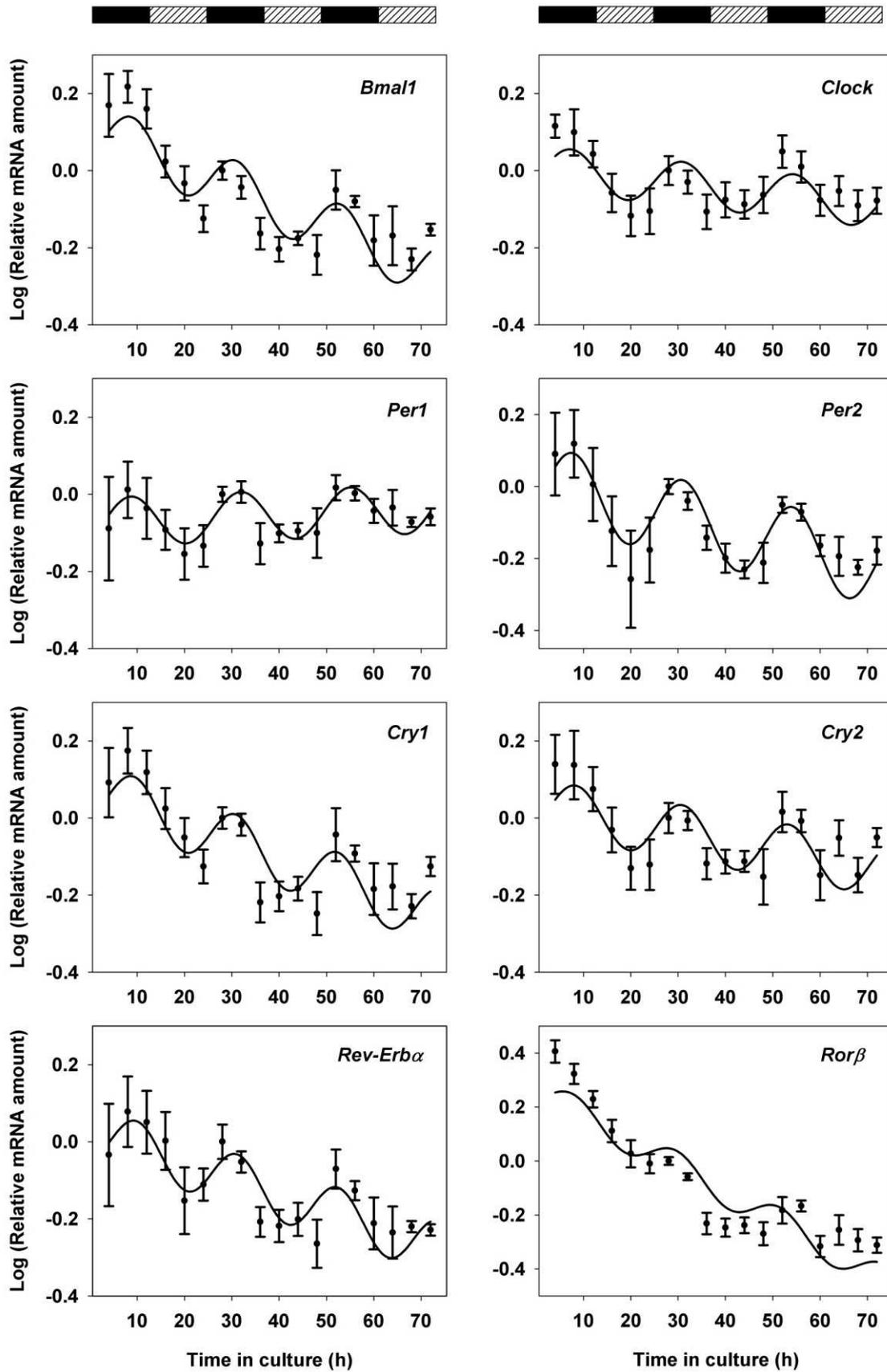


Figure 2. Temporal profiles of clock gene transcripts in retina explants cultured for 72 h. Each graph shows data from 4 independent experiments (n = 3 per time point in each experiment). mRNA amounts (log units) are expressed relative to the mean value found at a time point common to the 4 experiments: 28 h of culture. Mean values ± SEM are shown together with the best fitted sine wave curve. Alternating rectangles at the top indicate the projection of the lighting schedule (black: 12 h dark; hatched: 12 h light) to which animals were exposed prior to sacrifice.

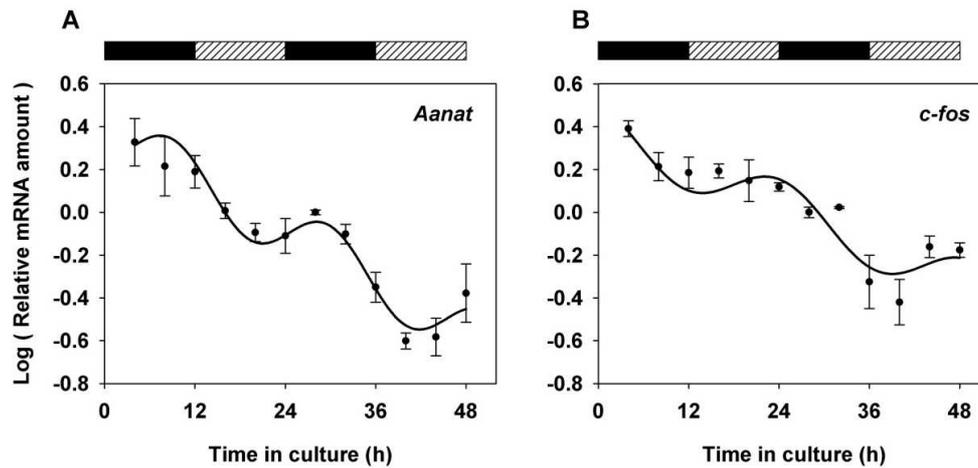


Figure 3. Temporal profiles of clock-controlled gene transcripts in retina explants cultured for 48 h. *Aanat* (A) and *c-fos* (B) mRNA amounts (log units) are expressed relative to the 28 h time point (one experiment; $n = 3$ per time point). Mean values \pm SEM are shown together with the best fitted sine wave curve. Alternating rectangles at the top indicate the projection of the lighting schedule (black: 12 h dark; hatched: 12 h light) to which animals were exposed prior to sacrifice.

Rhythmic expression of Per1 is confirmed by bioluminescence analysis in retina explants

We used the *Per1-luciferase* transgenic strain of Wistar rats to further investigate the capacity of the retina circadian clock to oscillate in vitro. Whole retinas ($n=4$) from *Per1-luciferase* rats were explanted and cultured similar to above, with the exception that 0.1 mM beetle luciferin was added and that dishes were placed into the Lumicycle (Actimetrics). Detrended bioluminescence recordings displayed low amplitude, noisy oscillations which could nevertheless be fitted with cosine curves and showed a mean period of 22.36 ± 1.27 h ($n=4$; **Figure 4A**). Moreover, peaks of the detrended curves occurred during the subjective nights, as previously observed for *Per1* by qPCR analysis. Thus, bioluminescence analysis of *Per1* gene expression confirms that a circadian clockwork is active in whole retina explants, albeit with low amplitude.

Robustness of the clock in retina explants is enhanced upon medium change

It was described that oscillations of the circadian clock present in the retina of the PER2::LUC mice could be successfully analysed in vitro, provided the explants were submitted to a specific protocol comprising 24 h of culture in Neurobasal A medium, followed by a transfer to 199 medium prior to bioluminescence recording [17]. We applied a similar protocol (called M1 in **Figure 1**) to the *Per1-luciferase* whole retina explants and observed that more sustained circadian oscillations in bioluminescence could indeed be detected (**Figure 4B**). Periods of oscillations obtained by fitting the data with a damped cosine curve over 4 cycles were of 22.44 ± 0.61 h ($n=4$). We repeated the experiment but made another round of 199 medium change 24 h later, prior to starting bioluminescence recording (protocol M2 in **Figure 1**). This led to rather robust oscillations with quite reduced noise (**Figure 4C, D**) and mean periods of 22.84 ± 0.20 h ($n=7$). Increase in robustness conferred by one or two changes of the medium (protocols M1 and M2 respectively) was further supported by the analysis of rhythmic power (**Figure 4E**, effect of medium change: $P = 0.001$) which proved significantly increased upon each supplementary medium renewal. In addition, peaks of *Per1* expression in protocols M1 and M2, as assessed by bioluminescence, again occurred during subjective nights, as was observed under M0 protocol (**Figure 4C, D**). There was no significant difference between periods calculated in the 3 culture conditions.

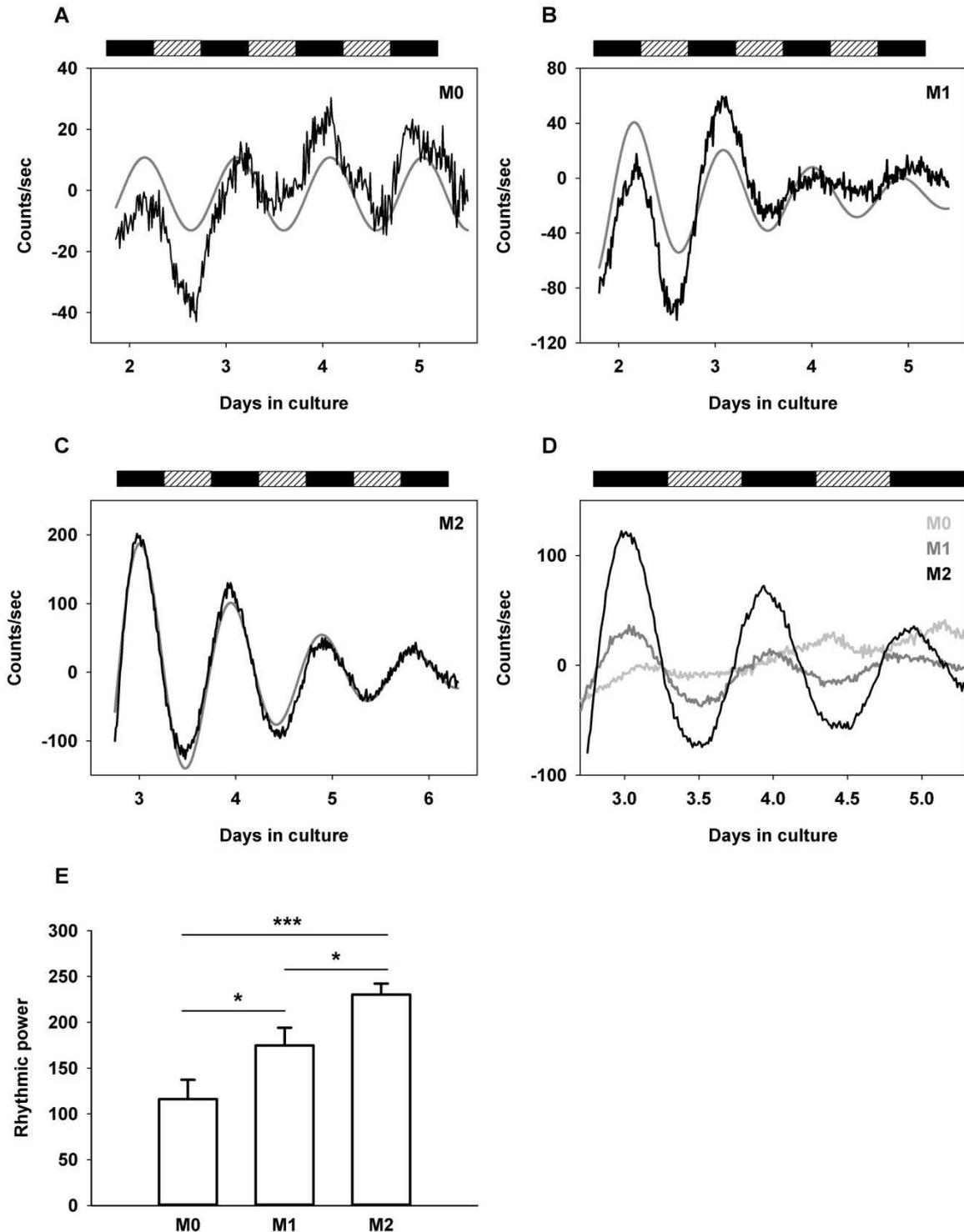


Figure 4. Bioluminescence analysis of *Per1-luciferase* rat retina explants. **A:** Detrended bioluminescence recording (black line) from a representative explant cultured under protocol M0. Data were fitted with a cosine curve ($y = y_0 + c \cdot \cos[2\pi(t-\phi)/\tau]$) shown in grey, to calculate corresponding periods. **B:** Detrended bioluminescence recording (black line) from a representative explant cultured under protocol M1. Data were fitted with a damped cosine curve (in grey; $y = y_0 + c \cdot \exp(-t/d) \cdot \cos[2\pi(t-\phi)/\tau]$) to calculate periods of oscillations. **C:** Detrended bioluminescence recording (black line) from a representative explant cultured under protocol M2. Data were fitted with a damped cosine curve (in grey) as in B. **D:** Composite graph showing averaged traces on the same scale and during 3 cycles, from samples within each treatment group (n=4 for M0, in light grey; n=4 for M1, in grey; n=7 for M2, in black). In panels A-D, alternating rectangles at the top indicate the projection of the lighting schedule (black: 12 h dark; hatched: 12 h light) to which animals were exposed prior to sacrifice. **E:** Rhythmic power in cultures under protocols M0, M1 and M2. Mean values \pm SEM are shown. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$.

Optimal conditions for culturing whole retina explants

We examined histological structure of whole retina explants maintained in culture according to protocol M2, over 2, 4 and 9 days. Retina structure was grossly conserved, with obvious increase in fragility over time and overall decrease in thickness, notably in plexiform layers (**Figure 5A-D**). TUNEL analysis at similar time points showed absence of apoptosis until 4 days of culture but some patches of apoptotic cells could be detected after 9 days of culture, most notably in the photoreceptor layer (**Figure 5E-H**), based on the comparison to DAPI staining (**Figure 5I-L**). Thus, the culture conditions delineated as protocol M2 are appropriate to identify and analyse the properties of the rat retina clock.

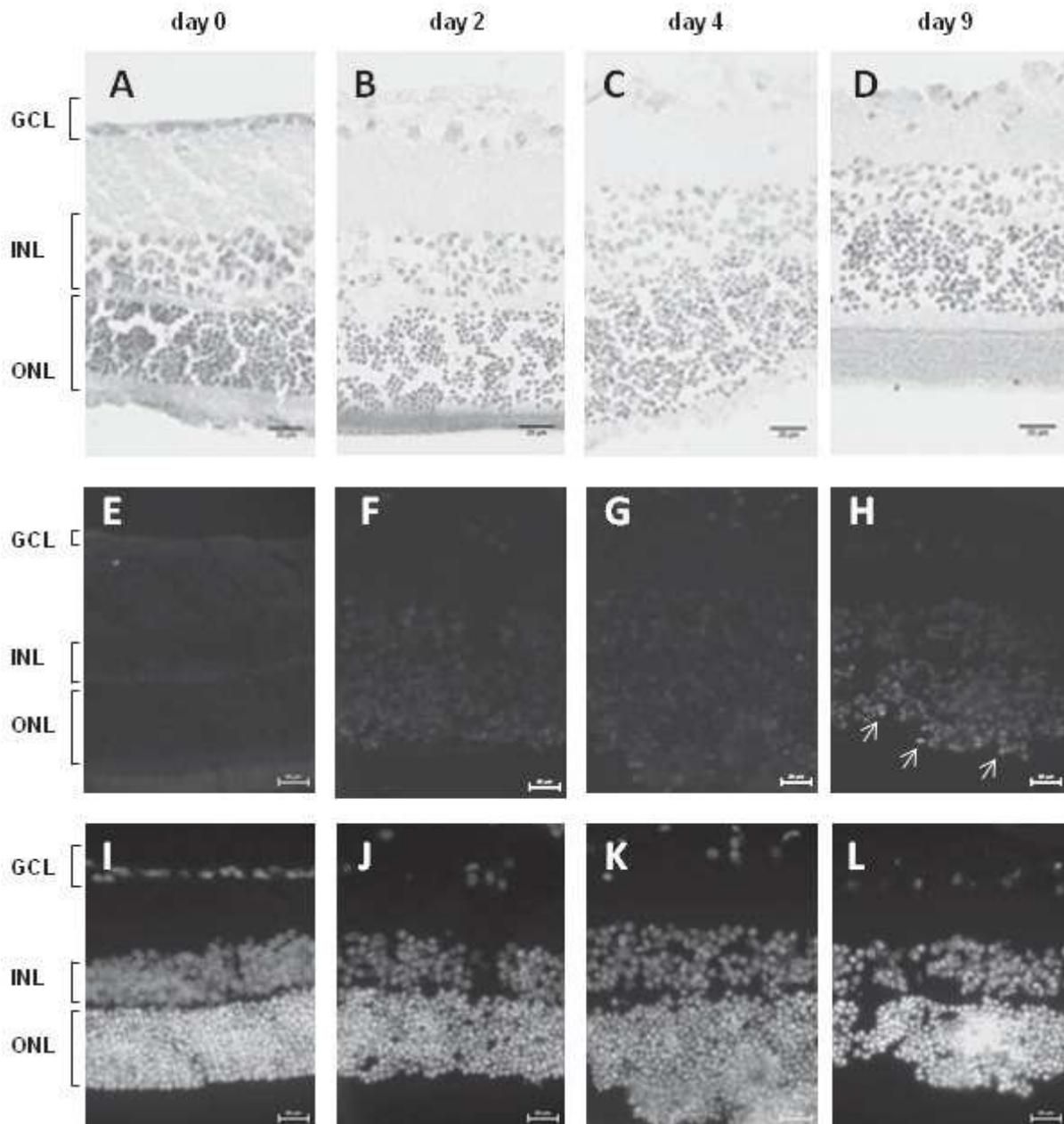


Figure 5. Retina explants cultured up to 9 days do not undergo massive cell death. A-D: Histological sections of explanted retinas cultured according to the M2 protocol and sampled at day 0 (A), 2 (B), 4 (C) or 9 (D) show that tissues did not undergo massive changes. E-H: Representative sections showing the results of TUNEL staining in retina explants prepared as in A-D and kept in culture for 0 (E), 2 (F), 4 (G) or 9 (H) days. TUNEL staining does not reveal any apoptosis until at least day 4 and becomes visible in day 9 samples, mainly in the ONL (white arrows). I-L: DAPI staining of the sections analysed by TUNEL assay in retinas sampled at day 0 (I), 2 (J), 4 (K) and 9 (L). GCL, Ganglion cell layer; INL, Inner Nuclear Layer; ONL, Outer Nuclear Layer. Scale bars: 20 μ m.

Discussion

Mammalian retina was demonstrated about 15 years ago to harbor a circadian clock [7] but the way in which it works is still a matter of debate. In search of an *in vitro* model for the analysis of retinal circadian properties in mammals, we describe here free-running expression profiles of clock genes and clock targets in the isolated rat retina. By the variety of investigated genes and the complementarity of bioluminescence analysis, this study demonstrates that the retina contains a self-sustaining oscillator which is sensitive to culture conditions.

Occurrence of a circadian clock and of clock gene expression has been investigated in the retina of various mammalian, avian and amphibian species [10]. Previous studies led to the conclusion that most clock genes are expressed in this tissue in mammals, without reaching any consensus concerning cellular localization and description of retinal clockwork pathways [14, 18-20, 26, 32, 33]. In the present analysis, retinas taken from rats sacrificed at the end of the light period were put in culture into constant darkness without any other stimulation, to follow kinetics of clock gene expression by qPCR. Occurrence of rhythmic expression patterns was shown for all clock genes which displayed periods around 21-24 h, as repeatedly observed in *in vitro* studies [17, 27, 30]. These results demonstrate the capacity of the isolated rat retina to generate circadian rhythms, in agreement with previous data showing the capacity of explanted rat retinas to synthesize and release melatonin in a cyclic manner [34]. Interestingly, the phase of *Per1* expression as assessed by qPCR, coincided roughly with the peaks of bioluminescence driven by the *Per1-luciferase* reporter, both occurring during subjective nights, which validates the qPCR data. Curiously, phases were fairly similar for all examined clock genes, their first peaks *in vitro* clustering during the second half of the subjective night (maximal phase difference of about 2 h when rescaled to a common period: data not shown). This does not conform to predictions made from the working model for circadian oscillators, in which rhythms of *Per* genes should be in antiphase with that of *Bmal1* [2, 35]. Retina is a heterogeneous tissue in which individual cell types are likely to harbour distinct oscillators showing specific phases [10]. In this context, clock gene oscillations measured at the level of the whole tissue probably reflect phases of the expression rhythms with greatest amplitudes, even if they are occurring in distinct oscillators. In support of that hypothesis, Schneider *et al.* [20] recently found *Clock*, *Bmal1*, *Per2* and *Per3* oscillating in phase in the retina of rats kept in constant darkness. Similar coincidental phase patterns of clock gene expression were reported in the retina of a diurnal mammal [13], in mouse retinal cones [33] as well as in more peripheral oscillators such as human blood mononuclear cells [36] and mouse bone marrow [37]. Conversely, we cannot exclude that some of the observed oscillations might be relevant to a transitory stage preceding the final oscillatory mechanism of the clock in explants, which might be set later than the 3rd day. Such transitory kinetics have been described for fibroblast cultures that are being submitted to synchronizing temperature cycles and which clock and clock controlled gene expression profiles shift to their final, stable phases within 3-4 days [38]. In this context, transient cycles of *Bmal1* and *Cry1* expression might be specifically and transiently induced by the process of preparing explants, even if these clock genes do not show any cyclic activity in the retina *in vivo*, in constant conditions [19]. Understanding which one of these hypotheses is right here, will require further analysis by using more gene-specific bioluminescence models and/or bioluminescence imaging to visualize clock kinetics at least at the level of retina layers.

Robust rhythmic functions have been described in photoreceptors, including melatonin release and *c-fos* transcription [10, 15, 39]. Analysis of mRNA profiles over 48 h in whole retina explants (Figure 3) showed rhythmic expression for *c-fos* and *Anat*, in agreement with the robust rhythms previously described for these genes *in vivo* [11, 12, 19], suggesting that in the explants, photoreceptors are able to maintain, at least to a certain extent, rhythmicity in physiological functions. It is important to point out that

peak phases for the expression of the two genes did not occur at the same time, ruling out the possibility that phase clustering of clock genes could be due to a sampling artefact.

Initial bioluminescence investigation in *Per1-luciferase* rats did not lead to conclusive results about the capacity of retina explants to display circadian oscillations [26], whereas similar analysis in the PER2::LUC mouse revealed robust cycles in bioluminescence, in specific culture conditions [17]. Our results grossly agree with both studies because the rhythms in clock gene expression assessed by qPCR displayed low amplitude, as could also be concluded from the bioluminescence recordings in the M0 protocol conditions. However, when the culture medium was replaced by 199 medium after 24 h (protocol M1, as in [17]) circadian oscillations in *Per1* expression could be seen quite clearly and this was even more evident when the medium was replaced twice, at 24 and 48 h. Calculation of rhythmic power as a hallmark of clock robustness confirmed that each medium change conferred increased coherence to the retina clock oscillations, as also suggested by the decreasing dispersion of calculated periods. We do not know what is the contribution of the initial 24 h incubation in Neurobasal A (saturated with 5% CO₂) to the overall rhythmicity. Based on the study by Ruan *et al.* [17] incubation of retina explants directly in 199 medium only yields small amplitude oscillations, which we observed as well with rat explants (data not shown). On the other hand, maintaining retinas on Neurobasal A throughout the recordings (protocol M0) does not promote rhythmicity, based on the present study. Thus, we propose that the medium change, likely in addition to the initial incubation in Neurobasal A, is critical regarding amplitude of the oscillations. Changing the culture medium has been reported to resynchronize oscillators in vitro and increase the amplitude of bioluminescence oscillations [30, 40]. Successive medium changes might also contribute to the health and survival of the explants in culture. Our histological and Tunel analysis indicate that retina explants are healthy in culture across the bioluminescence recording window. Similarly, explants maintained during several days on Neurobasal A medium did not show any apoptosis (data not shown). We speculate that the successive medium changes contribute to increased rhythmic power by facilitating synchronization of individual circadian oscillators located within the retina. This stands in striking contrast with other tissues in which bioluminescent oscillations can be easily monitored directly after dissection, such as SCN or lung [27]. Although it has been reported that rhythms of clock gene expression in the retina in vivo display low amplitudes with respect to other peripheral organs such as the liver [41], we do not know whether it is directly linked to the low amplitudes that we observe in vitro.

In conclusion, our study complements previous reports demonstrating that the rat retina contains a circadian clock(s) able to operate in vitro and to drive cyclic functions relevant to photoreceptor function. Thus organotypic cultures constitute an appropriate model to investigate the control of rhythmic processes in the retina, and we provide suitable protocols for this purpose.

Acknowledgements

The authors thank Drs. Sophie Reibel and Dominique Sage for animal care, Jean-Georges Lorentz for technical assistance and Adrien Bonneau for assistance in statistical analysis. They also thank Dr. Menaker for providing the *Per1-luciferase* rats. This work was supported by grants from Retina France and fellowship n°210011/2006-8 from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil) to DCB.

References

1. Stratmann M, Schibler U. Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms* 2006; 21:494-506.
2. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 2006; 15 Spec No 2:R271-7.
3. Bassi CJ, Powers MK. Daily fluctuations in the detectability of dim lights by humans. *Physiol Behav* 1986; 38:871-7.
4. Manglapus MK, Uchiyama H, Buelow NF, Barlow RB. Circadian rhythms of rod-cone dominance in the Japanese quail retina. *J Neurosci* 1998; 18:4775-84.
5. Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 2008; 59:790-801.
6. LaVail MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 1976; 194:1071-4.
7. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996; 272:419-21.
8. Pozdeyev NV, Lavrikova EV. Diurnal changes of tyrosine, dopamine, and dopamine metabolites content in the retina of rats maintained at different lighting conditions. *Journal of Molecular Neuroscience* 2000; 15:1-9.
9. Green CB, Besharse JC. Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms* 2004; 19:91-102.
10. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24:433-56.
11. Sakamoto K, Ishida N. Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 1998; 245:113-6.
12. Yoshida K, Kawamura K, Imaki J. Differential expression of c-fos mRNA in rat retinal cells: regulation by light/dark cycle. *Neuron* 1993; 10:1049-54.
13. Bobu C, Sandu C, Laurent V, Felder-Schmittbuhl MP, Hicks D. Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the *Arvicantis ansorgei* retina. *Mol Vis* 2013; 19:1060-73.
14. Storch KF, Paz C, Signorovitch J, Raviola E, Pawlyk B, Li T, Weitz CJ. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell* 2007; 130:730-41.
15. von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG. Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 72:108-14.
16. Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330:18-26.
17. Ruan GX, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol* 2008; 6:e249.
18. Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:9703-8.
19. Sandu C, Hicks D, Felder-Schmittbuhl MP. Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur J Neurosci* 2011; 34:507-16.
20. Schneider K, Tippmann S, Spiwoкс-Becker I, Holthues H, Wolloscheck T, Spatkowski G, Engel L, Frederiksen U, Spessert R. Unique clockwork in photoreceptor of rat. *J Neurochem* 2010; 115:585-94.
21. Tosini G, Kasamatsu M, Sakamoto K. Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 2007; 1159:134-40.

22. Dkhissi-Benyahya O, Coutanson C, Knoblauch K, Lahouaoui H, Leviel V, Rey C, Bennis M, Cooper HM. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70:3435-47.
23. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280:1564-9.
24. Miyamoto Y, Sancar A. Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6097-102.
25. Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, Yan L, Johnson M, Zhang DQ, McMahon D, Silver R. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene *Period 1* in the mouse retina. *J Neurosci* 2003; 23:7670-6.
26. Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *Faseb J* 2007; 21:3866-71.
27. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000; 288:682-5.
28. Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 46:69-81.
29. Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F. Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia* 1979; 6:305-23.
30. Ruan GX, Gamble KL, Risner ML, Young LA, McMahon DG. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One* 2012; 7:e38985.
31. Sokolove PG, Bushell WN. The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 1978; 72:131-60.
32. Dorenbos R, Contini M, Hirasawa H, Gustinich S, Raviola E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis Neurosci* 2007; 24:573-80.
33. Liu X, Zhang Z, Ribelayga CP. Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS One* 2012; 7:e50602.
34. Sakamoto K, Liu C, Tosini G. Circadian rhythms in the retina of rats with photoreceptor degeneration. *J Neurochem* 2004; 90:1019-24.
35. Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N. Antiphase circadian expression between *BMAL1* and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253:199-203.
36. Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustrat B, Formento JL, Delaunay F, Levi F, Milano G. Atypical patterns of circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mol Med* 2005; 83:693-9.
37. Granda TG, Liu XH, Smaaland R, Cermakian N, Filipski E, Sassone-Corsi P, Levi F. Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *Faseb J* 2005; 19:304-6.
38. Saini C, Morf J, Stratmann M, Gos P, Schibler U. Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev* 2012; 26:567-80.
39. Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Iuvone PM, Tosini G. Intraocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Mol Vis* 2006; 12:117-24.
40. Nishide SY, Honma S, Nakajima Y, Ikeda M, Baba K, Ohmiya Y, Honma K. New reporter system for *Per1* and *Bmal1* expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues. *Genes Cells* 2006; 11:1173-82.
41. Peirson SN, Butler JN, Duffield GE, Takher S, Sharma P, Foster RG. Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351:800-7.

II / Localisation de l'horloge rétinienne

La question de la localisation de l'horloge rétinienne sera adressée dans la première partie des résultats de l'**Article 2** (p. 90) en ce qui concerne le modèle de souris PER2::LUC, et dans la dernière partie des résultats de ce même article (p. 95-96) en ce qui concerne le modèle de rat *Per1-Luc*.

III / Couplage entre les couches rétiniennes

Toujours dans l'**Article 2**, le couplage des oscillateurs qui constituent l'horloge rétinienne sera abordé dans un premier temps du point de vue de l'organisation des couches en réseau, principalement grâce au modèle de souris PER2::LUC (p. 91-92 pour la souris et 95-96 pour le rat), puis d'un point de vue de leurs voies de communication avec cette fois-ci uniquement le modèle de souris PER2::LUC (p. 92-95).

Article 2

CIRCADIAN ORGANIZATION OF THE RODENT RETINA INVOLVES STRONGLY COUPLED, LAYER-SPECIFIC OSCILLATORS

Catherine Jaeger ¹, Cristina Sandu ¹, André Malan ¹, Katell Mellac ², David Hicks ¹, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl ¹

¹ Department of Neurobiology of Rhythms, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, UPR 3212 CNRS, 5 rue Blaise Pascal, 67084, Strasbourg, France

² Unit of Mathematics and Computer Science, University of Strasbourg, 7 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

Corresponding author: Marie-Paule Felder-Schmittbuhl, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences UPR 3212, CNRS, 5 Rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg, France, Tel: +33 3 88 456644, Fax: +33 3 88 456654, email: feldermp@inci-cnrs.unistra.fr

Running title: Multiple coupled oscillators in the rodent retina

Key Words: clock, circadian rhythms, bioluminescence, period, coupling, rat, mouse

Abstract

Rhythmic physiology is central to retinal function and survival, and adapts vision to daily light intensity changes. Mammalian retina is able to rhythmically release melatonin when cultured under constant conditions, and occurrence of clock gene (e.g. *Period-Per*) expression has been shown for most cellular layers. However, contribution of the distinct layers to genesis of circadian rhythms within the retina is still debated. To characterize their endogenous oscillatory capacity and their communication at the whole tissue level, we used a vibratome-based method to isolate individual or paired retina cellular layers from the *mPer2^{Luciferase}* mouse and *Per1-Luciferase* rat, and real-time recorded bioluminescence. We report that each layer of the mouse retina harbours a self-sustained oscillator which period is significantly longer (~26 h) than in whole retina explants (~22.9 h), indicating that period is correlated with the degree of coupling. Accordingly, maximal period (~29 h) is reached upon complete enzymatic dissociation of the retina. By using pharmacological approaches we demonstrate that connection between retina oscillators involves gap junctions but only minor contribution from the main retina neurochemicals. Taken together with results from *Per1-Luciferase* rats, these data show that mammalian retina consists of a network of layer-specific oscillators whose period is determined by coupling.

Introduction

Circadian timing is a highly adaptive process allowing behavior and physiological parameters of living organisms to fit to daily changes in the environment. In mammals, it results from the complex interplay between external time-giving cues such as the day/night cycle, a central clock located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus, and multiple peripheral oscillators synchronized by the SCN through diverse signals including neuronal and neuroendocrine pathways. Rhythmicity is generated at the cellular level by highly conserved mechanisms. The involved molecular machinery is mostly similar for central and secondary oscillators and composed of interconnected transcriptional / translational feedback loops involving the products of clock genes (1). Complexes of BMAL1 and CLOCK (or its homolog NPAS2) drive the expression of *Per1-3* (*Period 1-3*) and *Cry1-2* (*Cryptochrome 1-2*) clock genes whose products form heterodimers able to inhibit CLOCK/BMAL1 transcriptional activity and hence their own expression. Fine-tuning and reinforcement of this core loop is ensured by additional loops and, importantly, by post-translational events, such as phosphorylation / dephosphorylation which regulate nucleo-cytoplasmic shuttling and degradation of clock proteins (2). This self-sustained process has a period close to 24 h and, by driving gene expression, sets the rhythms of cellular activity. How this translates into well synchronized functions of cells within tissues or organs remains to be investigated. The SCN have arisen as a model regarding this question and led to the conclusion that, at least for neuronal tissues, network properties play a fundamental role (3).

Circadian physiology is central to retinal function and to the processing of visual information, optimizing retina activity with the daily variation in light intensity. A circadian clock able to drive rhythmic secretion of melatonin *in vitro* and to be entrained by light was initially described in the retina (4) and rhythms have been reported for most retinal layers and cell types (5), such as photoreceptor disk shedding (6-9) or rod-cone coupling (10, 11). The retina is composed of three nuclear layers: the photoreceptor layer (PRL) composed of rod and cone photoreceptors, the inner nuclear layer (INL) composed of bipolar, horizontal and amacrine cells and the ganglion cell layer (GCL) composed of ganglion cells (including intrinsically photosensitive ganglion cells containing the melanopsin photopigment) and displaced amacrine cells. In addition to its wide variety of cell types, the mammalian retina contains an array of neurotransmitter and neuromodulatory systems controlling not only vertical processing of light information but also the adaptation of visual function to the day/night cycle.

Location and organization of the retina clock has been a matter of long debate. One major difficulty has been lying in the cellular complexity of the retina and in the globally low levels and amplitudes of clock gene expression (12-15). Thus, results from *in situ* hybridization and qPCR studies have yielded contradictory results (16). Yet, they indicate that most clock genes are rhythmically expressed in all three layers, at least under a light/dark (LD) cycle (15, 17-20). Bioluminescence studies, which allow precise and extended monitoring of clock oscillatory activity *in vitro*, have provided decisive clues about the presence of a functional oscillator either in photoreceptor layers isolated from *Per1-Luciferase* (*Per1-Luc*) transgenic rats after excitotoxic death of the inner retina (21), or in the inner nuclear layer visualized in transversal retina sections from *mPer2^{Luc}* mice (22). However, intrinsic ability of retina layers to generate rhythmic activity as well as their capacity to coordinate to each other within the retina, remain to be clarified.

To answer these questions, we developed a unique technique for retina layer isolation that we combined with long-term bioluminescence recordings and appropriate mathematical analysis, adapted to the study of low amplitude oscillations. Individual or double cellular layers were isolated from retinas of *mPer2Luc* mice and *Per1-Luc* rats by horizontal vibratome sectioning and shown to express autonomous circadian clock oscillations. This approach also revealed an unexpected and unique property of the retina

clock, i.e. strong correlation between period length and coupling among its constituent oscillators. We found that coupling within the retina is asymmetric and involves both inter-layer and inter-cell communication, which molecular signals remain unknown. Our results lead to a model of the mammalian retina consisting of a network of layer-specific oscillators in which coupling mechanisms and the molecular clockwork are extensively linked.

Materials and methods

Animals

Experiments were performed with *mPer2^{Luc}* mice (23) (C57Bl/6J background, purchased from Jackson Laboratories) and *Per1-Luc* Wistar rats (24) (a kind gift from Dr Menaker, University of Virginia) bred and housed in our animal facility in a 12 h/12 h Light/Dark (LD) cycle (light intensity approx. 300 lux). Animals had access to water and food *ad libitum*, and were handled according to the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86 / 609 / EEC) and the Animal Use and Care Committee from Strasbourg (CREMEAS; AL/08/15/02/13). Male and female mice and rats aged between 4 and 11 weeks were euthanized with CO₂ (progressive increase up to 20% in an airtight box) all over the light phase or, for pharmacological experiments, at ZT10 (Zeitgeber Time 10 = 2 h before lights off), and enucleated. Eyeballs were placed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing antibiotics (100 µg/ml Penicillin and 100 u/ml Streptomycin), 100 mM HEPES and 4.2 mM sodium bicarbonate, at room temperature until dissection.

Sample preparation

Whole retina (WR) dissection: Dissection was performed in HBSS at room temperature. A small incision was performed with a sterile needle under the *ora serrata* and the cornea and lens were dissected out of the eyeball. The retina was peeled off from the retinal pigment epithelium, radially incised, flattened and placed, photoreceptors down, on a semipermeable membrane (Millipore, Billerica, MA, USA), in a 35 mm culture dish.

Isolation of retina layers: Retinal layers were isolated from WR by tangential sectioning using a vibratome-based (Vibratome 1000 classic; Warner Instruments, Hamden, CT, USA) procedure developed initially for retinal transplantation and modified for cell culture (18, 25). After dissection flattened retinas were mounted onto a 20% gelatine block by using 5% gelatine as glue, with either the photoreceptor or the ganglion surface facing the block. Retinas were tangentially sectioned according to the desired type of layer; GCL, INL, PRL, GCL+INL, PRL+INL (Table 1). Once the blade was in contact with the retina surface, several precise cuts (Table 1) were performed and their products rapidly observed under the microscope to follow the progression inside the retina. The remaining gelatine and edges were removed from the isolated layer before transfer onto a membrane. The entire procedure was performed in HBSS at room temperature and lasted about 1.5 h for both eyeballs. Each experiment was repeated several times until the number of analyzable samples reached at least 10 for the mouse and 5 for the rat.

Enzymatic dissociation of retinas: Dissociated cells (DC) were obtained by incubating small pieces of freshly dissected retinas in HBSS medium containing papain (20 u; Worthington, Lakewood, NJ, USA) for 30 min at 37°C. Dissociation was completed by gentle mechanical trituration in the presence of DNase I (1000 u; Worthington). After centrifugation (5 min, 160 g), dissociated cells were resuspended, counted

and seeded at a density of 2800 cells/mm² in 35 mm dishes previously coated with 20 µg/mL poly-D-lysine and 15 µg/mL laminin.

Type of sample (mouse/rat)	Orientation of the retina on the block	Depth of the cut before reaching the layer	Depth of the cut to obtain the layer
GCL	GCL down	150 µm ± 10 (mean ± SD) 200 µm ± 30 (mean ± SD)	The rest (55 µm ± 20 (mean ± SD)) +50 µm The rest (100 µm ± 40 (mean ± SD)) +50 µm
INL	PRL down	45 µm ± 10 (mean ± SD) 85 µm ± 10 (mean ± SD)	40 µm ± 5 (mean ± SD) 50 ± 0 (mean ± SD)
PRL	PRL down	90 µm ± 20 (mean ± SD) 140 µm ± 15 (mean ± SD)	The rest (100 µm ± 50 (mean ± SD)) +50 µm The rest (80 µm ± 20 (mean ± SD)) +50 µm
GCL+INL	PRL down	0 µm	90 µm ± 25 (mean ± SD) 120 µm ± 10 (mean ± SD)
PRL+INL	GCL down	0 µm	80 µm ± 25 (mean ± SD) 170 µm ± 10 (mean ± SD)

Table 1: Flowchart for section preparation from mouse (in red) and rat (in blue) retinas. One type of sample was obtained from one retina. Measures for the rat retina are in italic. SD = standard deviation.

Culture and bioluminescence recording

Mouse samples: Samples (WR and isolated layers) were pre-incubated for 24 h at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in 1 mL of Neurobasal A medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing antibiotics (25 µg/ml Penicillin and 25 u/ml Streptomycin), 2% B27 (Invitrogen) and 2 mM L-Glutamine. Then, the medium was replaced by 1 mL of 199 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) containing antibiotics (Penicillin 25 µg/ml and Streptomycin 25 u/ml), 4 mM sodium bicarbonate, 20 mM D(+)Glucose, 2% B27, 0.7 mM L-Glutamine and 100 µM Beetle Luciferin (Promega, Fitchburg, WI, USA) and dishes were sealed (Dow Corning high vacuum grease) under normal air and placed into the Lumicycle (Actimetrix, Wilmette, IL, USA) heated at 36°C. Samples were recorded during at least 5 days: photons were counted during 1 min 48 sec every 15 min. The procedure was slightly modified for mouse retina DC: pre-incubation was done in Neurobasal A medium containing 2% Foetal Bovine Serum (Invitrogen) in addition to the other supplements, for 48 h to ensure complete attachment to the dish. All medium changes were performed under dim red light.

Rat samples: The culture protocol for rat samples was described in (12). It is identical to the one for mouse samples, with an additional step: before starting bioluminescence recording, samples were pre-incubated for another 24 h at 37°C in 1 mL of 199 medium supplemented as above but without luciferin. Medium was then renewed (with luciferin) and sealed dishes placed into the Lumicycle. All medium changes were performed under dim red light. For the culture of rat DC the procedure was adapted as for mice DC.

Pharmacological treatments: These experiments were performed with mouse WR sampled at ZT10 and cut into 2 halves, later considered as independent samples and cultured as above. After 4 days of recording (control section), the medium was replaced by fresh 199 medium containing the molecule(s) to test: this was done at a moment corresponding to the trough following the 3rd complete oscillation of the samples, and the recording was continued for 6 days. Evolution of the oscillations between those 2 recording sections was compared to the same evolution in a control group. At the end of the treatment, the medium was again replaced by normal 199 medium to control that oscillations returned to normal behaviour and to exclude a possible toxic effect of the molecules: this was done at a moment

corresponding to a trough. Each experiment was repeated at least once and all paired groups (control and treated) had identical n numbers. All medium changes were performed under dim red light.

Drugs: Forskolin, Dopamine, Glutamate, Glycine and GABA (γ -aminobutyric acid) were purchased from Sigma. TPMPA ((1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl)methylphosphinic acid) was provided by Santa Cruz (Dallas, TX, USA) and all other drugs by Abcam (Paris, France): PF 670462 (4-[1-cyclohexyl-4-(4-fluorophenyl)-1H-imidazol-5-yl]-2-pyrimidinamine dihydrochloride), Carbenoxolone, Strychnine, Picrotoxin, CGP 52432 (3-[[[(3,4-Dichlorophenyl)methyl]amino]propyl(diethoxymethyl)phosphinic acid), Gabazine and TTX (Tetrodotoxin). All drugs were dissolved in water except Forskolin which was dissolved in ethanol. Final ethanol content in the culture medium was 0.1% (v/v). To avoid a potential bias due to direct effect of ethanol, the same ethanol concentration was added to the culture medium during the control recording section as well as to the culture medium of the corresponding control group.

Data analysis

Period determination: Periods of bioluminescence oscillations were determined with SigmaPlot software (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) by fitting a linearly detrended sinusoidal curve oscillating around a polynomial baseline to the raw data from each single sample. This was done in a working window of 72 h starting from the trough preceding the first complete oscillation. The equation used was:

$$y = (a - b \cdot x) \cdot \sin(2 \cdot \pi \cdot (x + \phi) / \tau) + (c + d \cdot x + e \cdot x^2 + f \cdot x^3)$$

where τ is the period (days) and ϕ the phase (days) of the fitting curve. To optimize quantitative determination of the period, multi-collinearity between the 8 estimated parameters was minimized by replacing ϕ by its estimated value in the equation, and then by eliminating the most dispensable parameters (2 or 3) or by replacing them by their estimated value taken as a constant. Normality and homoscedasticity of residues were verified by Shapiro-Wilk's and Bartlett's tests respectively. Bartlett's tests failed in many cases, even with data transformation, but coefficients of correlation (r^2) and F values of the model were strong enough ($r^2 > 0.9$ and $F > 100$) to ensure the reliability of the calculated periods. A 24 h running average subtraction was used to generate detrended curves for better visualization of the data in figures but not for data analysis.

Statistical validation of the periods obtained with non-linear regression: Homogeneity of the periods (converted from days to hours) of all samples within each group was verified by comparing (Fisher test) the residues obtained by fitting on the n sample grouped data n models with a unique period, to the residues obtained by fitting the same models with n periods and by showing they are not different. Finally, the sums of squares of the n models with n periods were compared (Fisher test) to the sum of squares of the residues of the same models. This showed that, for each group of samples, the variability among samples (i.e. errors on τ values) was negligible when compared to the variability between samples (i.e. dispersion of τ values). Therefore, we used period data as single values (without error intervals). Both procedures were carried out with R software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Statistical analyses

Comparison of mean periods: Results are presented as mean \pm SEM. Significance was evaluated by using one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way repeated measures ANOVA for pharmacological studies. The significance level was set at $p < 0.05$. Normality and homoscedasticity of residues were verified by Shapiro-Wilk's and Bartlett's tests respectively. When required, ANOVA were followed by post-hoc Tukey's tests.

Comparison of the dispersion of period values: Significant difference in period dispersion between groups was measured by Bartlett's test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Supplemental experimental procedures

Cellular composition of the different types of mouse retina preparations was determined by amplification of markers for every retinal cell type by RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction).

Total RNA extraction: Samples representative for each type of preparation (WR, GCL, INL, PRL, GCL+INL, PRL+INL, DC) were cultured for 3 days (4 days for DC) (i.e. roughly until the middle of the window for analysis of bioluminescence data) and snap frozen. Cell lysis and nucleic acid extraction were performed in RNABLE solution (Eurobio, Courtaboeuf, France) following the recommended procedure. Total RNA was precipitated with a mix of isopropyl alcohol and glycogen, resuspended and submitted to digestion by DNase I (Euromedex, Strasbourg, France). Finally, total RNA was purified by phenol / chloroform / isoamylalcohol 25:24:1 (v/v/v) extraction followed by isopropyl alcohol/sodium acetate precipitation. RNA concentration and quality were evaluated by using NanoDrop ND-1000 V 3.5 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

RT-PCR: Total RNA (100 ng) was reverse transcribed into first-strand cDNA using RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase and random hexamer primers according to the manufacturer's protocol (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). cDNA samples were stored at -80°C . cDNAs were amplified by using primers specific for *Nrl* (neural retina leucine zipper), *mGluR6* (metabotropic glutamate receptor 6), *Thy1* (thymus cell antigen 1), *GS* (glutamine synthetase), *Prox1* (prospero homeobox 1), *Stx1a* (Syntaxin1A (brain)), *Arr3* (retinal cone arrestin 3) and *Rpe65* (retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa). Protocols for amplification and primer sequences are detailed in the table below.

cDNA (amplicon length)	Cell type-specificity	Primer sequences (For – Rev)	Number of cycles	Annealing temperature	mRNA reference (GenBank)
Arr3 (434 pb)	Cone photoreceptors	5'AGACTTCGTGGATGATGTGGACAC 5'GTACAACCAGCTGCACAGAATCAC	35	56	AF156979.1
GS (373 pb)	Müller cells	5'ACCTCAGCAAGTCCCACCTTGAAC 5'GGTTGCTCACCATGTCCATTATCC	25	55	AY044241.1
mGluR6 (342 pb)	Bipolar cells	5'TGCAAATAACCAGCTCAGGTG 5'TCCATTGGTTGCTTGGTACTGG	35	55	NM_173372.2
Nrl (358 pb)	Rod photoreceptors	5'TGCTCAGTCCCAGAATGG 5'GAATAGTAGCCAAGAGGC	31	58	L14935.1
Prox1 (477 pb)	Horizontal cells	5'CCTGAGTCCTTAGACTTGACTCGG 5'GTTGTAGTGCATGTTGAGGGCTCG	30	59	NM_008937.2
Rpe65 (486 pb)	Retinal pigment epithelium	5'GGAAGTGTCTCACCCTAACAGC 5'TGTGGATGAGCAGTGGCACCATTG	30	59	AF410461.1
Stx1a (387 pb)	Amacrine cells	5'GATGACGACGACGATGTCACTGTC 5'TTCTCGGTAGTCTGACTGAGTGGC	35	59	NM_016801.3
Thy1 (236 pb)	Ganglion cells	5'CCATATCAAGGTCCTTACCC 5'CACAGAGAAATGAAGTCCAGGG	31	55	NM_009382.3

Results

The mouse retina clock is composed of three autonomous oscillators located within each cellular layer

To address the question of the retina clock location we isolated horizontal vibratome sections corresponding to the PRL, INL and GCL of retinas from *mPer2^{Luc}* mice (23). Samples were cultured on semipermeable membranes and bioluminescence recorded during several days. WR explants from the same animals were used as controls. As shown in **Figure 1A,B** WR expressed robust bioluminescence oscillations that could persist during at least 4 weeks without any medium change. Their mean period was 22.89 ± 0.10 h (n=22). All three isolated retina layers also displayed PER2::LUC oscillations (**Figure 1C**), but with a much longer period: 25.97 ± 0.44 h (n=16) for GCL, 26.25 ± 0.51 h (n=17) for INL, 26.32 ± 0.56 h (n=11) for PRL. Interestingly, these periods were not different from each other ($p = 0.87$, one-way ANOVA) but were significantly different from the one measured in WR ($p < 0.001$, one-way ANOVA). Moreover, periods were significantly more variable in the GCL, INL and PRL groups than in the WR group ($p < 0.001$, Bartlett's test of homogeneity of variances). Potential contamination by cells from adjacent layers was evaluated by RT-PCR specific to markers for distinct cell types (**Supplementary Figure S1A-B**) and confirmed that GCL and PRL layers were mostly free of any contamination. We found that some INL samples proved positive for ganglion cells and rod markers but this did not, obviously, impact on the period. These results showed that each cellular layer of the mouse retina harboured an autonomous oscillator. Moreover, the huge differences between periods measured in individual layers and in the whole retina indicated that coupling mechanisms exist between layer-specific oscillators and that their disruption would affect period length.

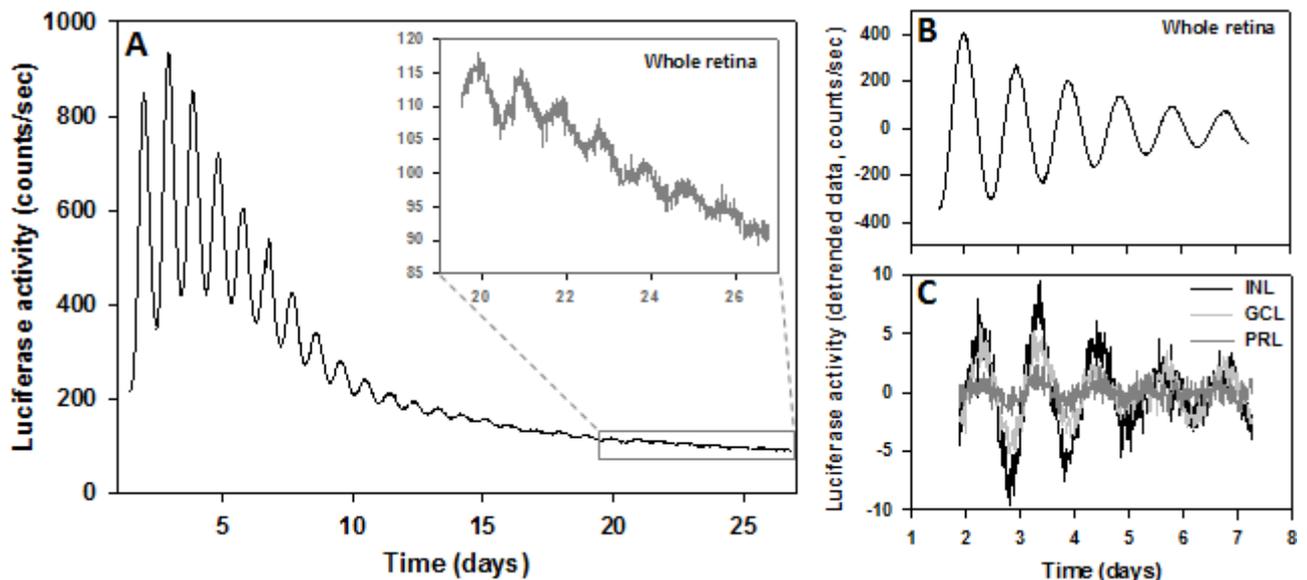


Figure 1: The mouse retina is a robust circadian clock composed of 3 self-sustained oscillators located in the GCL, INL and PRL. **A:** Representative bioluminescence recording (raw data) of a *mPer2^{Luc}* retina during 4 weeks. Last 8 days of the recording are enlarged in the upper right corner. **B:** Representative bioluminescence recording (detrended data following 24 h running average subtraction) of a *mPer2^{Luc}* retina during the first week of culture. **C:** Representative bioluminescence recordings (detrended data following 24 h running average subtraction) of a ganglion cell layer (GCL), an inner nuclear layer (INL) and a photoreceptor layer (PRL) from *mPer2^{Luc}* mice during the first week of culture.

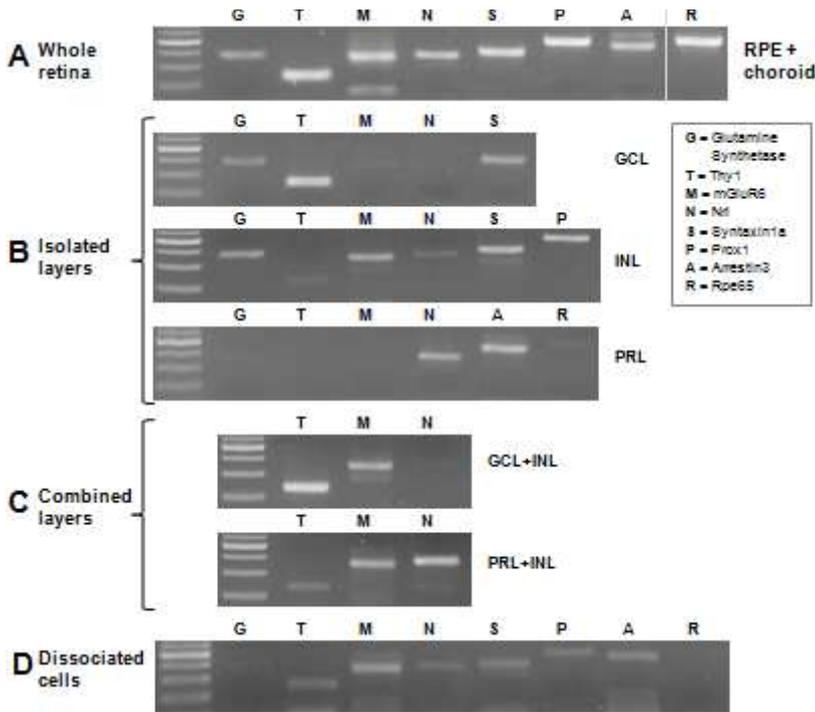


Figure S1: RT-PCR evaluation of cellular composition and contamination of the distinct types of mouse retina preparations. Representative results from amplifications with cDNAs from whole retinas (A), isolated layers (B), double layers (C) and from dissociated retinas (D). Amplification of *Thy1* (T), *mGluR6* (M) and *Nrl* (N) was used to estimate contamination by cells from other retina layers (GCL, INL and PRL respectively). Amplification of *Glutamine Synthetase* (G) was used to evaluate the presence of Müller cells in the isolated layers. Amplification of *Rpe65* (R) was used to evaluate the degree of contamination of PRL by the RPE. Control amplification for *Rpe65* (shown in A) was performed on a posterior eye globe containing RPE and choroid. Amplification of *Syntaxin1a* (S), *Prox1* (P) and *Arrestin3* (A) were used to verify the presence of amacrine and horizontal cells in the INL and of cones in the PRL.

INL and GCL oscillators are coupled by synaptic connection

To get further insight into these mechanisms, we recorded bioluminescence from horizontal sections comprising 2 layers with intact synaptic connections (“double-layers”). Sections containing GCL and INL (GCL+INL) expressed robust oscillations (**Figure 2A**) with a mean period of 23.36 ± 0.10 h ($n=13$), which is intermediate between- and significantly distinct from the mean period of WR ($p = 0.003$, one-way ANOVA) and of isolated GCL or INL ($p < 0.001$, one-way ANOVA). In addition, there was no difference in the variability of periods between the whole retina and the GCL+INL groups ($p = 0.42$, Bartlett’s test of homogeneity of variances). By contrast, sections containing PRL and INL (PRL+INL) expressed weaker oscillations (**Figure 2B**) with small numbers of cycles and periods whose mean and variability (27.46 ± 0.70 h ($n=14$)) were not different from those of isolated PRL and INL (mean period: $p = 0.11$, one-way ANOVA; period variability: $p = 0.18$, Bartlett’s test of homogeneity of variances). Yet, they significantly differed from those of WR samples ($p < 0.001$, one-way ANOVA). RT-PCR revealed that most samples of these double-layers were slightly contaminated with cells from the third layer (**Figure S1C**), but, interestingly, none of them displayed a period typical of WR samples. To further understand how the INL and GCL communicate, we co-cultured isolated GCL and INL sections on the same membrane, either side by side (CoGCL-INL) or superimposed (CoGCL+INL). There was no period difference between both types of co-cultures ($p = 0.68$, one-way ANOVA) and they behaved exactly like individual GCL or INL layers (**Figure 2C,D**). Their mean period (27.22 ± 0.31 h ($n=14$)) did not differ from the one of isolated GCL and INL ($p = 0.052$, one-way ANOVA). Likewise, variability of their periods was similar to the ones of isolated GCL and INL ($p = 0.056$, Bartlett’s test of homogeneity of variances).

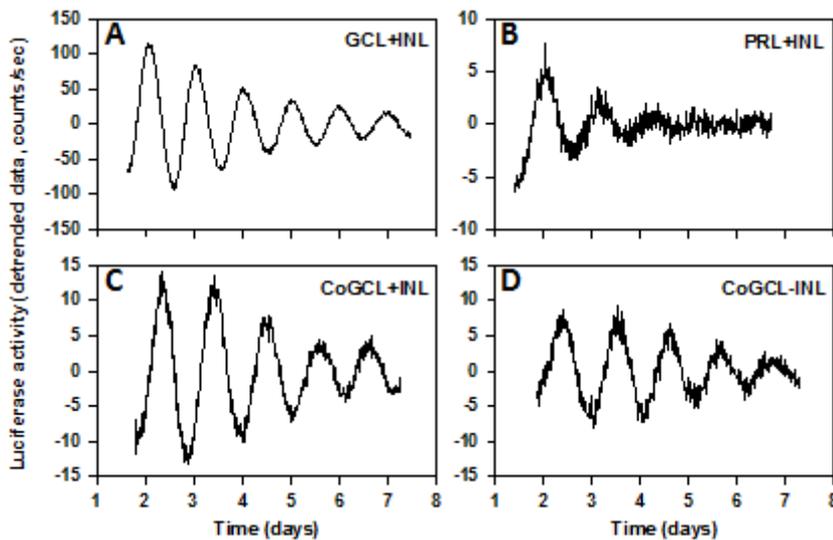


Figure 2: Double layers containing mouse retina inner nuclear- and ganglion cell layers display robust oscillations depending on the inner plexiform layer integrity. Representative bioluminescence recordings (detrended data following 24 h running average subtraction) of mixed layers from *mPer2^{Luc}* retinas or single layers co-cultured together. **A:** mixed section composed of the ganglion cell and inner nuclear layers. **B:** mixed section composed of the inner nuclear and photoreceptor layers. **C:** co-culture of one ganglion cell layer and one inner nuclear cell layer superimposed on the membrane. **D:** co-culture of one ganglion cell layer and one inner nuclear cell layer placed side by side on the membrane.

Coupling within the mouse retina clock does not rely on dopamine

Above results suggested the existence of synaptic coupling between oscillators present in the INL and in the GCL, raising the possibility that similar mechanisms might also contribute to the whole retina clock network. To get further insight into these mechanisms, we used pharmacological tools to affect known signals between retina layers. *mPer2^{Luc}* WR were recorded for 4 days and then treatments were applied during 6 days. Evolution of the period between these recording intervals was compared to the same evolution in a control group undergoing medium change only. To validate this approach, we first verified that the period of the whole retina could be modulated pharmacologically to the same extent as by isolating cellular layers. We tested 3 drugs acting on pathways known to regulate the molecular clockwork (**Figure 3A**). Forskolin (10 μ M), an activator of adenylate cyclase, produced a minor decrease of the period of around half an hour ($p = 0.002$, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$). Picrotoxin (100 μ M) was recently shown to shorten the period of the SCN clock independently of GABA_A and GABA_C receptors (26). In whole retinas it likewise induced a dramatic shortening of the period, of about 3 hours ($p < 0.001$, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$). In the presence of PF 670462 (1 μ M), an inhibitor of casein kinases I δ and I ϵ , the period of whole retina oscillations increased more than 5 hours ($p < 0.001$, two-way repeated measures ANOVA, $n=6$), reaching values which were larger than those found in isolated layers. These results confirmed that period length in the retina could be extensively modulated, both increased and decreased, by pharmacological means. We thus used this strategy to first investigate the role of dopamine, a well-known player in retinal rhythmic physiology (27). In addition, dopamine is released by interplexiform amacrine cells whose processes make contacts in the inner (IPL) and outer (OPL) plexiform layers and, given the wide distribution of its receptors, is a good candidate messenger for coupling layer-specific oscillators. Since dopamine is released (synaptically as well as extrasynaptically) following action potentials (28-30), we first cultured whole retinas in the presence of TTX (1 μ M). The drug did not alter the period of the oscillations (**Figure 3B**; $p = 0.56$, one-way ANOVA, $n=7$), indicating that dopamine is not required for coupling between retina layers. Accordingly, treatment of whole retina cultures with 50 μ M dopamine did not induce any change in the period of oscillations (**Figure 3B,C**; $p = 0.11$, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$).

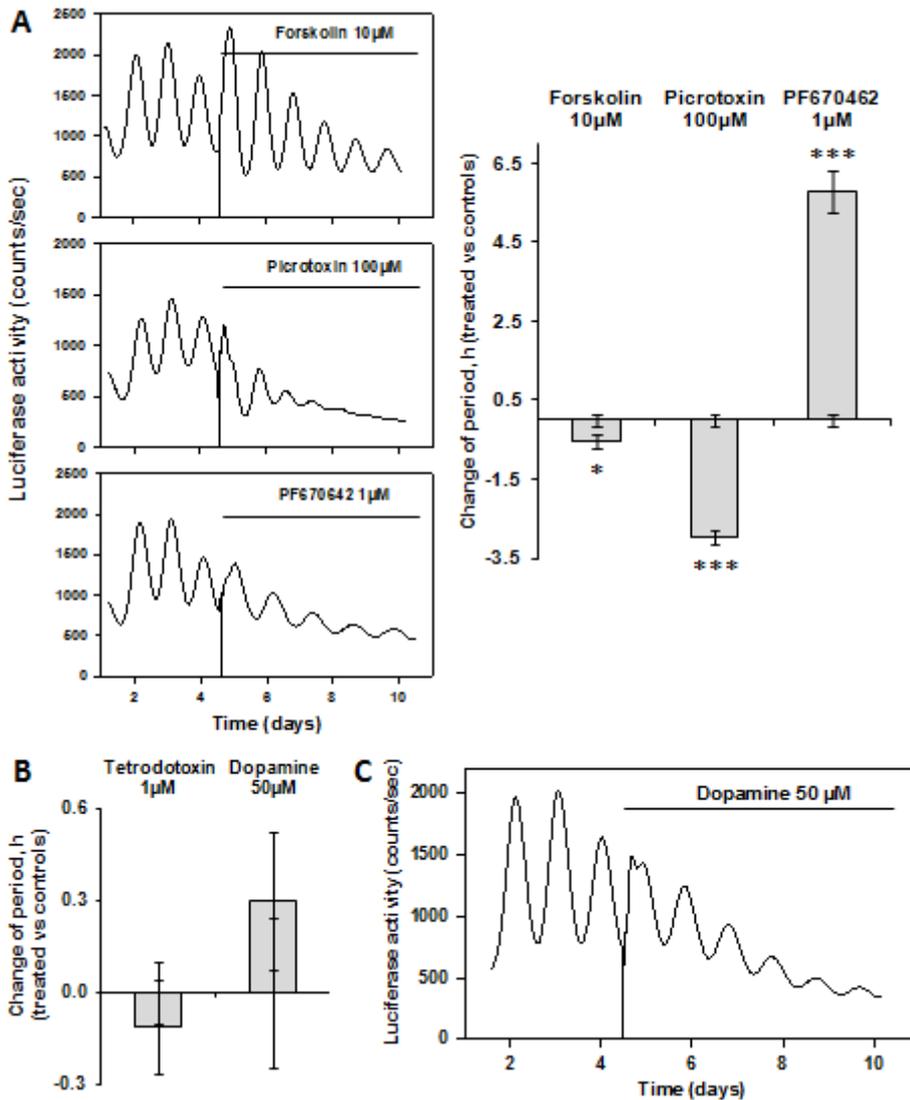


Figure 3: Treatment with TTX or dopamine does not alter the period of clock oscillation in the *mPer2^{Luc}* retina. **A:** The period of the whole mouse retina can be modulated by pharmacological treatment. Representative bioluminescence traces (raw data) from *mPer2^{Luc}* retinas submitted to indicated drugs (black bars) are shown and resulting period changes (expressed relatively to a control group in which renewed medium did not include any drug) are indicated in the histogram. Error bars from the x axis show \pm SEM for the control group (* $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$). **B:** Effects of treatment with 1 μ M TTX or 50 μ M dopamine on the period, expressed as in A. **C:** Representative bioluminescence recording (raw data) of a *mPer2^{Luc}* retina treated with 50 μ M dopamine.

GABA, glycine and glutamate are dispensable for coupling of mouse retina oscillators

GABA, glycine and glutamate are the major neurotransmitters in the retina and are known to play fundamental regulatory roles in the SCN clock (3). To investigate the potential involvement of GABA in retina clock coupling, we treated whole retinas with either GABA (1 mM) or inhibitors of GABAergic receptors applied individually or together: TPMPA 50 μ M, CGP 52432 1 μ M, gabazine 10 μ M (Figure 4A-E). None of these treatments affected the period of whole retina oscillations (Figure 4K; $p > 0.05$ in each case, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$), whereas 1 mM GABA reduced their amplitude, as previously described (22). These results indicated that GABA was not required for coupling of retina oscillators and that the effect of picrotoxin described above (Figure 3A) was non-specific, as demonstrated for the SCN clock (26). Glycine was reported not to affect retina PER2::LUC oscillations (22) but we readdressed this question by focusing on the period. Glycine at 5 mM induced a decrease of the period of around half an hour (Figure 4F,K; $p = 0.035$, two-way repeated measures ANOVA, $n=8$) but had no effect at 1 mM (Figure 4G,K; period: $p = 0.97$, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$). Curiously, strychnine (1 μ M), an inhibitor of glycine receptor, had the same effect, with similar magnitude (Figure 4H,K; $p = 0.01$, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$), raising the possibility of a non-specific effect, as for picrotoxin. Additionally, the effect of GABA 1 mM + glycine 5 mM was equivalent to the one of glycine 5 mM alone (Figure 4I,K; $p = 0.65$, two-way repeated measures ANOVA), suggesting that GABA and glycine do not act in synergy and

confirming the mild effect of higher glycine dose, on the period of the retina clock. Finally, glutamate (1 mM), the principal excitatory neurotransmitter of the retina (31) did not induce any significant change in the period of the oscillations (Figure 4J,K; $p = 0.98$, two-way repeated measures ANOVA, $n=7$), confirming the more complete pharmacology carried out by Ruan and colleagues in 2008 (22).

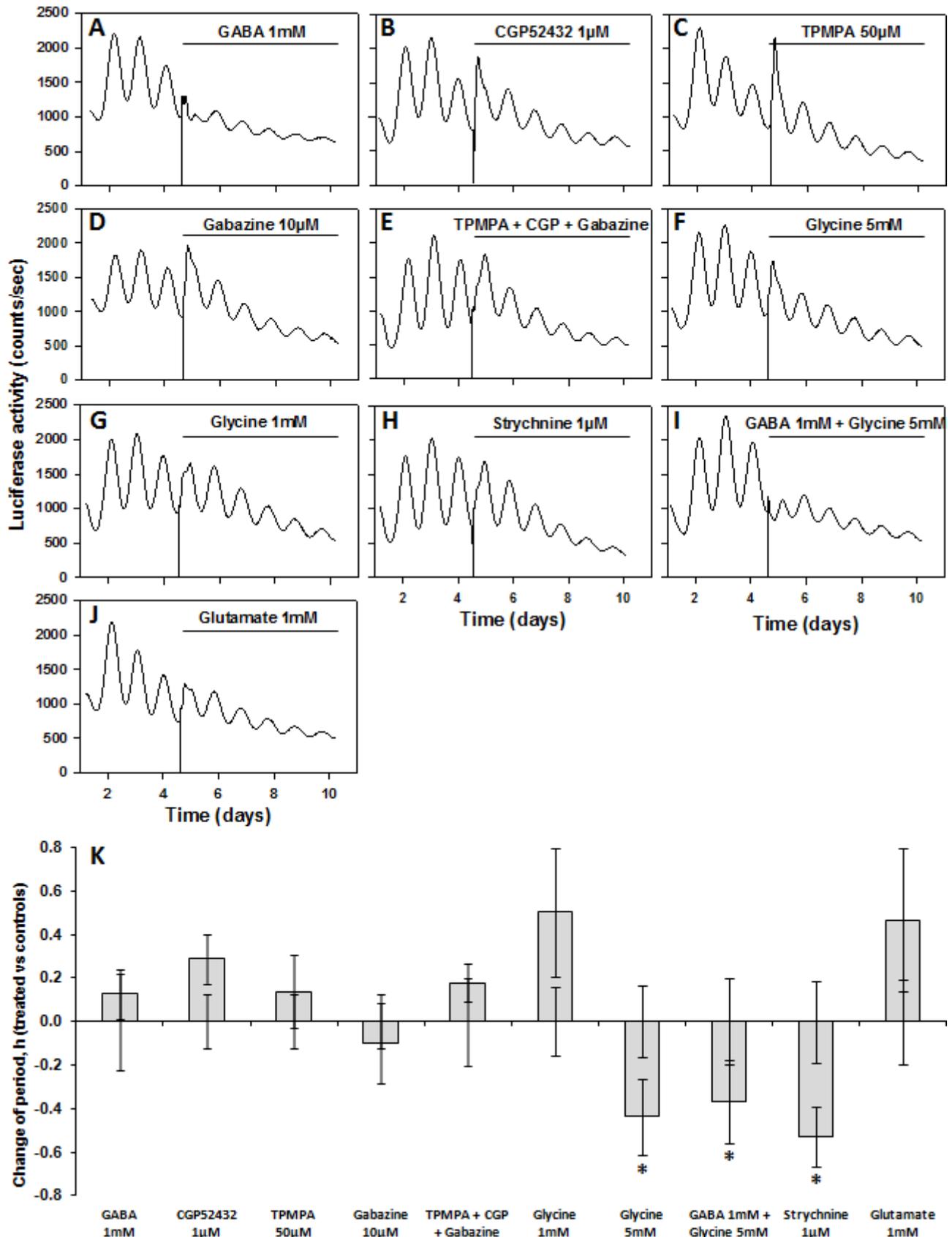


Figure 4: GABA, Glycine and Glutamate do not play major roles in the coupling of mouse retina oscillators. A-J: Representative bioluminescence traces (raw data) from *mPer2^{Luc}* retinas submitted to indicated doses of agonists and antagonists of GABAergic, glycinergic and glutamatergic receptors. **K:** Change of periods, h (treated vs. controls). Error bars on x axis: \pm SEM for the control group. (* $p < 0.05$)

Cell/cell coupling in the mouse retina clock

To further investigate the importance of cellular communication in the retina clock, we recorded bioluminescence from enzymatically dissociated retinas cultured at a density of 2800 cells/mm². Based on RT-PCR results, the cellular content of these cultures qualitatively recapitulated the composition of the whole retina (**Figure S1D**). Dissociated retina cultures expressed sustained oscillations with a mean period of 29.06 ± 0.33 h (n=14) (**Figure 5A**), which is significantly longer than those of isolated layers ($p < 0.001$, one-way ANOVA). To complete this study, we cultured whole retinas in the presence of an inhibitor of gap-junctions. Carbenoxolone (100 μ M) increased the period of the oscillations of more than half an hour as compared to the control group (**Figure 5B,C**; $p = 0.033$, two-way repeated measures ANOVA, n=7).

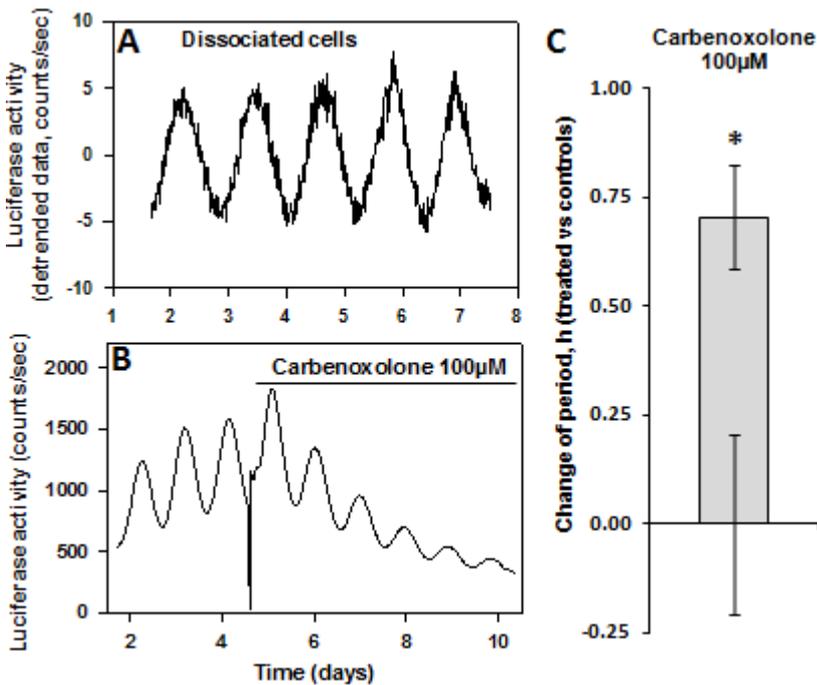


Figure 5: Direct cell-to-cell communication is involved in coupling within the mouse retina clock.

A: Representative bioluminescence recording (detrended data following 24 h running average subtraction) of a culture of *mPer2^{Luc}* dissociated retina. **B:** Representative bioluminescence trace (raw data) from a *mPer2^{Luc}* retina submitted to 100 μ M carbenoxolone. **C:** Effect of carbenoxolone treatment (100 μ M) on the period, expressed relatively to a control group in which renewed medium did not include any drug. Error bars on x axis: \pm SEM for the control group (* $p < 0.05$).

Data from rat retinas confirm the results obtained in the mouse

To strengthen the notion that coupling of single oscillators and the resulting period length are correlated, we undertook a similar study in a second rodent strain designed for bioluminescence studies, the *Per1-Luc* rat (24). To carry out this analysis we used a recently described protocol for the culture of rat retinas and bioluminescence recording (12). Rat WR oscillated in culture with a mean period of 22.90 ± 0.19 h (n=19) (**Figure 6A**), whereas isolated GCL and INL exhibited oscillations with increased period; respectively 25.69 ± 0.55 h (n=13) and 26.12 ± 1.41 h (n=5) (**Figure 6B**). PRL cultures showed baseline levels of bioluminescence in which no rhythm could be detected (**Figure 6B**). Similar to what was observed in the mouse, rat GCL+INL double layers oscillated with an intermediate period of 24.81 ± 0.54 h (n=9) (**Figure 6C**), and PRL+INL double layers oscillated with a mean period of 25.96 ± 0.70 h (n=8) which was very close to the ones of isolated layers (**Figure 6D**). By contrast, we could not detect any circadian oscillation from rat retina dissociated cells cultured at 2800 cells/mm², in spite of a high level of activity and a trend towards cyclic

behavior (Figure 6E). Although dispersion within groups did not allow comparing these period values like for mice data, it is interesting to note that they presented striking similarity to the ones measured in mouse retina samples (Figure 7). Taken together, these results strengthen the idea that period length is strongly correlated with the degree of dissociation within the retina tissue.

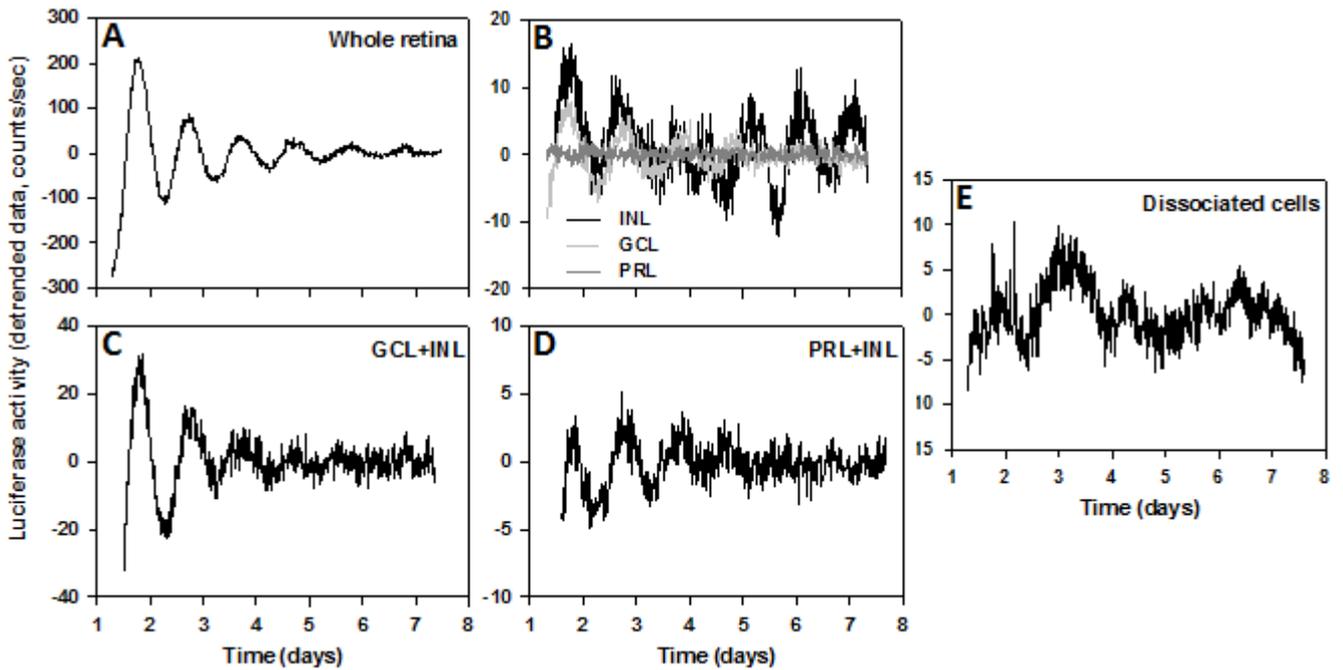


Figure 6: Retina sections from *Per1-Luc* rats show self-sustained oscillations. Representative bioluminescence recordings (detrended data following 24 h running average subtraction) of various retina preparations from *Per1-Luc* rats, during the first week of culture. **A:** Whole retina. **B:** Individual cellular layers. **C:** Mixed section composed of the GCL and INL. **D:** Mixed section composed of the INL and PRL. **E:** Dissociated retina.

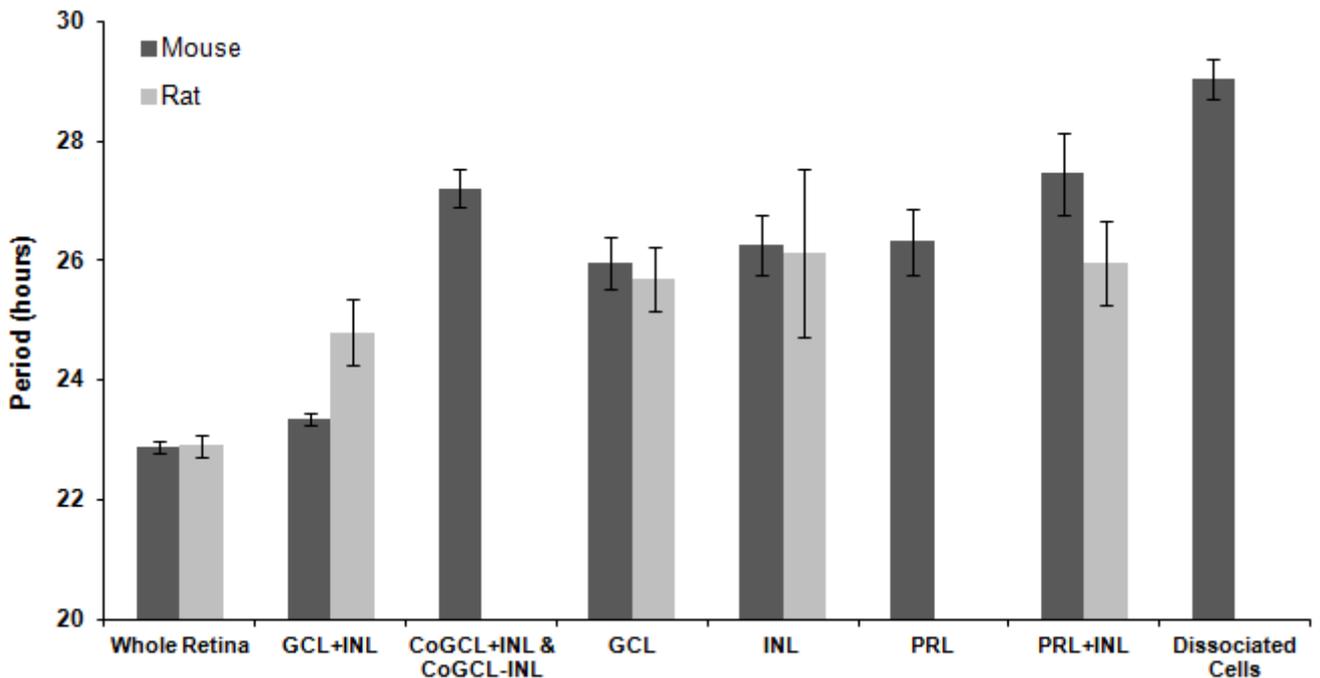


Figure 7: Circadian clocks of mouse and rat retinas display similar correlation between period length and coupling. Period lengths (mean \pm SEM) of the distinct types of retina samples prepared from the mouse (black bars) and rat (grey bars) retinas increase with the degree of retina dissociation. Rat PRL and dissociated cell cultures did not display circadian rhythmicity. Co-cultures of GCL and INL were not performed in the rat.

Discussion

In the present study, by using an original experimental procedure to isolate retina cellular layers from *mPer2^{Luc}* mice, we provide strong evidence that the retina clock consists of multiple autonomous but coupled oscillators located within each cellular layer. Analysis of periods indicates they are inversely correlated with the degree of coupling between layers or cells, the maximum being reached in cultures of dissociated retinas. Maximal period values could also be induced in whole retinas by pharmacologically inhibiting casein kinases ϵ and δ . In addition, period was increased by blocking gap junctions but only mildly modulated by altering the most common retina neurotransmission systems. Taken together with similar data obtained with the *Per1-Luc* rat, these results indicate that rhythmic properties in mammalian retinas proceed from multiple, coupled oscillators, with a major contribution from the ganglion cell and inner nuclear layers.

The mouse retina harbours three independent circadian oscillators

Occurrence of clock gene expression in retina cellular layers or defined cell types has been investigated in many studies and led to the conclusion that a circadian clockwork is likely to exist in GCL, INL and, albeit still debated, in the outer nuclear layer (reviewed in (16)). In our study with *mPer2^{Luc}* mice we demonstrate endogenous and sustained oscillating capacity in all three cellular layers isolated by horizontal vibratome sectioning. Rhythmic bioluminescence activity in isolated INL was expected based on the study by Ruan *et al.* (22), demonstrating that the oscillating signal in transverse retina sections emanates strongly from this central layer. Accordingly, more than 80% of INL samples (data not shown) showed rhythmic activity in the present analysis. Yet, given its central position this layer also displayed limited contamination, either from ganglion cells or from rods (Figure S1B), although this obviously did not impact on the period. Presence of a circadian oscillator within photoreceptors has been a matter of controversy for several years. Whereas photoreceptor layers from *Per1-Luc* rats have been reported to display cyclic luciferase activity and melatonin synthesis (21), the question of their molecular clockwork expression and their robustness has been raised (15, 18, 19). We here describe an oscillatory activity in PRL from the *mPer2^{Luc}* mouse that we did not observe in PRL from the *Per1-Luc* rat, unlike GCL and INL. Although the *Per1-Luc* rat also presents low luciferase activity, explants do not undergo massive apoptosis as assessed by TUNEL analysis after 4-5 days in culture (data not shown). It cannot be excluded, however, that the amplitude of rat PRL oscillations drops below the detection threshold of our bioluminescence recordings. We do not presently know whether the difference in PRL rhythmic property between the two models is due to species-differences or to the transgene construct itself. Besides the intrinsic properties of *Per1* versus *Per2* genes, it is expected that knock-in of the *Luciferase* gene into the *Per2* open reading frame creates an ideal reporter able to fully reflect both its transcriptional and post-transcriptional regulations (2, 32) and, consequently, to cycle with higher amplitude. However, it should be noted that less than 30% of *mPer2^{Luc}* PRL (data not shown) show sustained oscillations, which is probably related to the low expression of PER2 (13) and might explain why they were not detected in transversal sections (22). This observation also indicates a lower robustness of this oscillator. Thus, further investigation, notably with bioluminescence models targeting distinct clock genes, will be required to answer more clearly the nature of the PRL oscillator in mammals. Finally, and most strikingly, GCL also showed robust bioluminescence oscillations. Presence of a circadian oscillator in ganglion cells was demonstrated in the chicken (33) based on their capacity to drive rhythmic phospholipid metabolism *in vitro*, but has not been demonstrated in mammals, although several studies have reported the expression of the main clock genes in this layer (13, 34-37). It remains to be determined whether PER2::LUC oscillations are generated by ganglion cells or by the

numerous displaced amacrine cells also present within this layer (38) and confirmed by RT-PCR results with *Syntaxin1A* marker (Figure S1B), or by both.

Period is correlated with the level of coupling between retina oscillators

An original finding of this study is the close correlation between period of bioluminescence oscillations and the degree of retina dissociation, be it obtained mechanically or enzymatically. Periods of whole retina samples are much shorter than those recorded from separate constitutive layers. Importantly, this was not correlated with any change in the culture procedure or in media, which were constant throughout the study (except for a minor addition of serum at the start of dissociated retinal cultures). In addition, no period change was observed when recording bioluminescence from retina fragments obtained after transversal cuts or from whole retinas embedded in gelatin prior to transfer onto the membrane (data not shown). Finally, similar trends were observed for periods of vibratome-sectioned *Per1-Luc* rat retinas, even if their differences did not reach statistical significance. Although mechanisms regulating period length in the retina and in the SCN might be distinct (39) and difficult to compare, it should be underlined that changes in the period have been described in the case of the SCN as well. An extensive lengthening was reported in some studies of isolated neurons (40). More importantly, regional period differences in SCN slices have been uncovered upon exposure to an uncoupling agent (41). In spite of this complexity, SCN period appears to be mainly determined by free running periods of the multiple cell oscillators present in the tissue and to be rather close to their mean (for review, see Welsh 2010 (3)), which stands in contrast with what we observe here regarding the retina. Strength of coupling between oscillators is more usually assessed based on the amplitude and we indeed observed a decrease upon treatment of whole retinas with GABA, as previously observed (22), whereas there was no effect on the period. However, amplitude would have been difficult to quantify when analyzing retinal layers because it is also related to the total cell number, which varies considerably between the distinct kinds of preparations. We presently do not know which mechanisms underlie period changes in relation to oscillator coupling but observed strong increase of the whole retina period (even greater than those of isolated layers) upon inhibition of casein kinases 1 δ and 1 ϵ . Known as major regulators of period length (42) by phosphorylating PER2, these kinases are expressed in the retina in a cyclic manner and are located in the INL and photoreceptors (19). Thus, it is possible that coupling of retina oscillators ultimately impacts on the molecular clockwork throughout the retina via phosphorylation / dephosphorylation mechanisms involving casein kinases 1 δ and 1 ϵ .

GCL and INL are strongly coupled

Coupling between layer-specific oscillators does not appear to be uniform throughout the retina. Whereas mixed sections comprising INL and PRL behave like individual layers, those containing GCL and INL are characterized by period lengths that are intermediate between whole retinas and isolated layers, and of low dispersion. In addition, these preparations systematically show higher amplitudes and low damping rates (data not shown). These data indicate that the combination of GCL and INL layers confers particular clock properties, together constituting a rather robust oscillator. Similar conclusions have been difficult to draw from *ex vivo* studies (17) but the capacity of the inner retina to display sustained rhythmicity was previously shown *in vitro*, following degeneration of photoreceptors in the *rd* mouse (15). Additionally, retina neurons containing the requisite molecular clock machinery are widely distributed within this region (15, 43). Interestingly, rhythmic property of the inner retina was dramatically altered when INL and GCL were individually isolated and subsequently cultured together, suggesting the importance of synaptic connections in their coupling. Thus, the retina clock is likely to involve an internal, strongly coupled

oscillator comprising the GCL and INL, together with the one of the PRL. Coupling between these 2 components appears weak but the PRL oscillator obviously plays a role in the network since its absence greatly perturbs the period. Further investigation, notably using bioluminescence imaging, will be required to better understand how spatio-temporal organization of this network generates robust, synchronized rhythms.

Coupling of oscillators does not require the principal retina neurotransmitter/neuromodulator pathways

We used the period as readout of coupling strength within the whole retina clock, to investigate its neurochemical organization. Dopamine appeared as the ideal candidate because i) dopaminergic interplexiform cells make synaptic contacts within both the IPL and OPL, potentially supplying (synaptically and extrasynaptically) any retina cell with dopamine (27) and ii) dopamine signaling is able to activate the transcriptional capacity of the CLOCK/BMAL1 complex (44). However, neither TTX, an inhibitor of voltage-gated sodium channels able to block dopamine release, nor dopamine itself, had any effect on the period of whole retina oscillations, indicating that dopamine did not play a major role in coupling. Likewise, we confirmed that modulating glutamate or GABA signaling did not have any effect, as previously reported (22). This does not exclude the possibility that GABA and dopamine might act by conveying resetting information, notably in response to light, as suggested (22). By contrast, we detected a small effect of glycine, (30 minute decrease in period) that occurred only at the highest concentration (5 mM). Unexpectedly, the same effect was induced by strychnine, an inhibitor of glycinergic receptors. Strychnine was demonstrated to also inhibit nicotinic acetylcholine receptors in the retina at the applied concentration (45). Although activation or inhibition of acetylcholine receptors were not reported to affect period of *mPer2^{Luc}* retina oscillations (22), it is possible that the mild effects of strychnine in our study resulted from both glycinergic and nicotinic receptor inhibition and that these would have opposite but minor effects on the period. Thus, coupling within the oscillator network of the retina is likely to involve more complex communication pathways whose characterization requires further investigation.

Cell/cell communication contributes to coupling of circadian oscillators in the retina

In addition to inter-layer coupling, our results indicate the importance of direct, cell-to-cell connection in the retina clock. Indeed, enzymatically dissociated mouse retinas cultured at a density prohibiting cell-to-cell contact exhibited a period that was 3 h longer than those measured in isolated layers. Moreover, addition of carbenoxolone, an inhibitor of gap junctions, increased the period of WR of over 30 minutes. Although this effect was limited, likely because other mechanisms of coupling are retained in these retinas, it indicates that gap junctions, which ensure communication between cells (46), also contribute to the overall coupling of retina oscillators. In this respect, it will be interesting to analyze the effects of carbenoxolone treatment on periods of individual layers.

Conclusion

Based on the study of two rodent species we provide strong evidence that the mammalian retina consists of multiple oscillatory units located within individual layers and characterized by a specific mode of coupling to the other units. Inter-cell communication mechanisms play an important role within this network and a particularity of the retina clock is that coupling governs its period. Thus, our results suggest that rhythm generation in the retina proceeds from quite complex mechanisms whose identification will require cell-level resolution combined with additional pharmacological studies.

Acknowledgements

We thank Dr. Sophie Reibel, Dr. Dominique Sage, Aurore Senger, Laurence Huck and Nicolas Lethenet from Chronobiotron UMS 3415 (Strasbourg, France) for animal care.

We are grateful to Dr. Michael Menaker for kindly providing the *Per1-luciferase* rats.

This work was supported by grants from the association Retina France and fellowships from the French Research and Education Ministry and Retina France to CJ and from the Fondation Berthe Fouassier to CS.

References

1. Partch, C. L., Green, C. B., and Takahashi, J. S. (2014) Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 24, 90-99
2. Gallego, M., and Virshup, D. M. (2007) Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 139-148
3. Welsh, D. K., Takahashi, J. S., and Kay, S. A. (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72, 551-577
4. Tosini, G., and Menaker, M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419-421
5. Iuvone, P. M., Tosini, G., Pozdeyev, N., Haque, R., Klein, D. C., and Chaurasia, S. S. (2005) Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 24, 433-456
6. LaVail, M. M. (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194, 1071-1074
7. LaVail, M. M. (1980) Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19, 407-411
8. Tamai, M., Teirstein, P., Goldman, A., O'Brien, P., and Chader, G. (1978) The pineal gland does not control rod outer segment shedding and phagocytosis in the rat retina and pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17, 558-562
9. Terman, J. S., Reme, C. E., and Terman, M. (1993) Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 605, 256-264

10. Ribelayga, C., Cao, Y., and Mangel, S. C. (2008) The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 59, 790-801
11. Ribelayga, C., and Mangel, S. C. (2010) Identification of a circadian clock-controlled neural pathway in the rabbit retina. *PLoS One* 5, e11020
12. Buonfiglio, D. C., Malan, A., Sandu, C., Jaeger, C., Cipolla-Neto, J., Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M. P. (2014) Rat retina shows robust circadian expression of clock and clock output genes in explant culture. *Mol Vis* 20, 742-752
13. Liu, X., Zhang, Z., and Ribelayga, C. P. (2012) Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS One* 7, e50602
14. Peirson, S. N., Butler, J. N., Duffield, G. E., Takher, S., Sharma, P., and Foster, R. G. (2006) Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 800-807
15. Ruan, G. X., Zhang, D. Q., Zhou, T., Yamazaki, S., and McMahan, D. G. (2006) Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9703-9708
16. McMahan, D. G., Iuvone, P. M., and Tosini, G. (2014) Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res* 39, 58-76
17. Dkhissi-Benyahya, O., Coutanson, C., Knoblauch, K., Lahouaoui, H., Leviel, V., Rey, C., Bennis, M., and Cooper, H. M. (2013) The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell Mol Life Sci* 70, 3435-3447
18. Sandu, C., Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M. P. (2011) Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur J Neurosci* 34, 507-516
19. Schneider, K., Tippmann, S., Spiwox-Becker, I., Holthues, H., Wolloscheck, T., Spatkowski, G., Engel, L., Frederiksen, U., and Spessert, R. (2010) Unique clockwork in photoreceptor of rat. *J Neurochem* 115, 585-594
20. Tosini, G., Kasamatsu, M., and Sakamoto, K. (2007) Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 1159, 134-140
21. Tosini, G., Davidson, A. J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., and Castanon-Cervantes, O. (2007) Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *Faseb J* 21, 3866-3871
22. Ruan, G. X., Allen, G. C., Yamazaki, S., and McMahan, D. G. (2008) An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol* 6, e249
23. Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., and 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
24. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288, 682-685
25. Fontaine, V., Kinkl, N., Sahel, J., Dreyfus, H., and Hicks, D. (1998) Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 18, 9662-9672
26. Freeman, G. M., Jr., Nakajima, M., Ueda, H. R., and Herzog, E. D. (2013) Picrotoxin dramatically speeds the mammalian circadian clock independent of Cys-loop receptors. *J Neurophysiol* 110, 103-108
27. Witkovsky, P. (2004) Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 108, 17-40
28. Feigenspan, A., Gustincich, S., Bean, B. P., and Raviola, E. (1998) Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J Neurosci* 18, 6776-6789
29. Gustincich, S., Feigenspan, A., Wu, D. K., Koopman, L. J., and Raviola, E. (1997) Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron* 18, 723-736

30. Puopolo, M., Hochstetler, S. E., Gustincich, S., Wightman, R. M., and Raviola, E. (2001) Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron* 30, 211-225
31. Thoreson, W. B., and Witkovsky, P. (1999) Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 18, 765-810
32. Kojima, S., Shingle, D. L., and Green, C. B. (2011) Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J Cell Sci* 124, 311-320
33. Garbarino-Pico, E., Carpentieri, A. R., Castagnet, P. I., Pasquare, S. J., Giusto, N. M., Caputto, B. L., and Guido, M. E. (2004) Synthesis of retinal ganglion cell phospholipids is under control of an endogenous circadian clock: daily variations in phospholipid-synthesizing enzyme activities. *J Neurosci Res* 76, 642-652
34. Garcia-Fernandez, J. M., Alvarez-Lopez, C., and Cernuda-Cernuda, R. (2007) Cytoplasmic localization of mPER1 clock protein isoforms in the mouse retina. *Neurosci Lett* 419, 55-58
35. Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., and Weitz, C. J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280, 1564-1569
36. Miyamoto, Y., and Sancar, A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6097-6102
37. Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Tanahashi, Y., Ikeda, M., and Honma, K. (1999) Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the rat retina. *Neurosci Lett* 271, 1-4
38. Jeon, C. J., Strettoi, E., and Masland, R. H. (1998) The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18, 8936-8946
39. Ruan, G. X., Gamble, K. L., Risner, M. L., Young, L. A., and McMahon, D. G. (2012) Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One* 7, e38985
40. Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., Buhr, E. D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I. M., Doyle, F. J., 3rd, Takahashi, J. S., and Kay, S. A. (2007) Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* 129, 605-616
41. Koinuma, S., Asakawa, T., Nagano, M., Furukawa, K., Sujino, M., Masumoto, K. H., Nakajima, Y., Hashimoto, S., Yagita, K., and Shigeyoshi, Y. (2013) Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center. *Eur J Neurosci* 38, 2832-2841
42. Etchegaray, J. P., Yu, E. A., Indic, P., Dallmann, R., and Weaver, D. R. (2010) Casein kinase 1 delta (CK1delta) regulates period length of the mouse suprachiasmatic circadian clock in vitro. *PLoS One* 5, e10303
43. Dorenbos, R., Contini, M., Hirasawa, H., Gustincich, S., and Raviola, E. (2007) Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis Neurosci* 24, 573-580
44. Yujnovsky, I., Hirayama, J., Doi, M., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (2006) Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6386-6391
45. Renna, J. M., Strang, C. E., Amthor, F. R., and Keyser, K. T. (2007) Strychnine, but not PMBA, inhibits neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed by rabbit retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 24, 503-511
46. Bloomfield, S. A., and Volgyi, B. (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* 10, 495-506

IV / Entraînement de l'horloge rétinienne

Toutes les données présentées ici ont été obtenues avec des rétines entières de rat *Per1-Luc* et des demies rétines entières de souris PER2::LUC cultivées et enregistrées de la même manière que précédemment. Sauf mention contraire, les expériences n'ont été réalisées qu'une fois et devront être répétées pour s'assurer de leur répétabilité.

IV.1 / Entraînement par la lumière

Afin de mettre en place un outil d'étude de l'influence de la lumière sur l'horloge rétinienne, nous avons testé deux types de protocoles de stimulation par la lumière :

- Le premier consiste en l'application d'un créneau de lumière d'1 h (environ 500 lux) sur des rétines en cours d'enregistrement. Pour ce faire, les échantillons sont retirés du LumiCycle et placés sous une fibre optique dans un incubateur thermostaté à 37°C le temps que dure la stimulation.
- Le second est la soumission des échantillons à un cycle LD12/12 (12 h de lumière (environ 500 lux) / 12 h d'obscurité) durant 48 h au cours de la phase de préincubation qui précède le début des enregistrements (**Figure 33**).

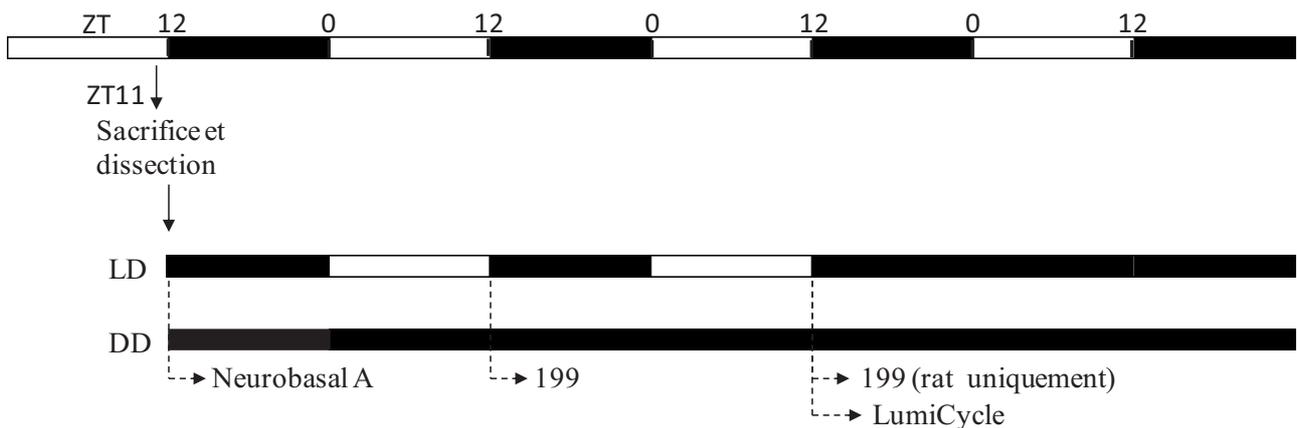


Figure 33 : Protocole d'entraînement des explants rétiniens par un cycle LD12/12.

Les tissus sont exposés à une alternance de 12 h d'obscurité et 12 h de lumière (environ 500 lux) durant 48 h entre le moment de leur mise en culture et le début des enregistrements. Ces cycles sont superposés aux étapes habituelles de changement du milieu de culture.

Les éventuelles modifications de période, de phase et d'amplitude des oscillations suite à ces traitements sont recherchées :

- Une modification de la période traduit une modulation de la cinétique de l'horloge par la lumière, suffisamment durable pour être sensible dans une fenêtre d'analyse de 72 h après la stimulation.
- Une modification de l'amplitude reflète une modification du degré de synchronisation dans le tissu et/ou un renforcement de l'amplitude des rythmes de l'horloge moléculaire, également suffisamment durable pour être sensible dans une fenêtre d'analyse de 72 h après la stimulation. Elle peut être considérée comme un signe d'entraînement car elle traduit une relance du système au niveau moléculaire et tissulaire.
- Enfin, une modification de la phase est un signe direct de l'entraînement de l'horloge moléculaire.

IV.1.A / Chez la souris PER2::LUC

IV.1.A.a / Application d'un créneau de lumière

Il a déjà été montré que l'application d'un créneau de lumière d'1 h au milieu de la phase montante ou de la phase descendante de l'oscillation émanant de rétines de souris PER2::LUC entraîne de modestes déphasages : respectivement un retard de phase de 2,3 h et une avance de phase de 1,5 h (Ruan *et al.*, 2008). Nous avons donc réalisé nos premiers essais de créneau de lumière aux mêmes moments, mais sur la 3^{ème} oscillation de manière à avoir une portion d'enregistrement suffisante en amont pour pouvoir également réaliser des mesures de période et d'amplitude, mesures qui ont été réalisées sur une fenêtre de 53 h. Nous n'avons pu mettre en évidence aucun effet de la lumière sur aucun paramètre, y compris lorsque les rétines sont cultivées en présence de 9-*cis*-rétinal à 20 μ M et/ou lorsque la dissection et la mise en culture des rétines sont réalisées en lumière rouge afin de limiter l'appauvrissement des photorécepteurs en rétinale, ce qui empêcherait leur réponse à la lumière. Un total de 20 échantillons (11 soumis à un créneau de lumière et 9 contrôles) a été testé pour l'ensemble des conditions, mais dans tous les cas les oscillations se poursuivent comme si les échantillons n'avaient pas vu la lumière (Figure 34).

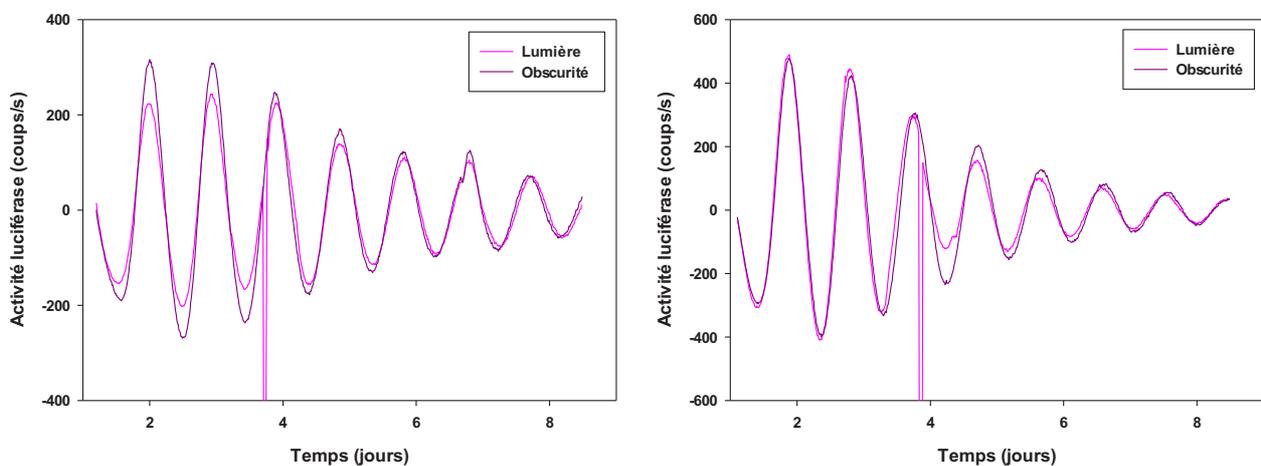


Figure 34 : Effet d'un créneau de lumière sur le cycle d'expression PER2, lorsqu'il est appliqué au cours des phases ascendante et descendante de l'expression de PER2.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à un créneau de lumière d'1 h (environ 500 lux) durant la phase ascendante (à gauche) ou descendante (à droite) de leur 3^{ème} oscillation.

L'expérience a été retentée en appliquant le créneau de lumière au moment du sommet du pic de la troisième oscillation (Figure 35 ; n = 8 dans chaque groupe). Cette stimulation ne provoque aucun effet sur l'amplitude des oscillations (Figure 36 ; p = 0,7 ; ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées), en revanche elle entraîne une légère mais significative diminution de la période d'environ 13 min (Figure 36 ; p = 0,02 ; ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées) ainsi qu'une forte tendance à un retard de phase d'environ 45 min (Figure 36 ; p = 0,052 ; ANOVA à un facteur comparant la différence entre l'acrophase réelle du premier pic après la stimulation (Pic 4) et sa prédiction d'après l'acrophase du pic qui précède la stimulation (Pic 2) pour les échantillons stimulés par rapport à cette même différence pour des échantillons contrôles). Un retard de phase identique est obtenu lorsque la prédiction de l'acrophase du Pic 4 est réalisée à partir de l'acrophase du Pic 1. Ce déphasage ne peut pas être dû à la simple différence de période qui existe entre les deux groupes parce que le groupe ayant subi le créneau de lumière a une période raccourcie, alors que son déphasage va dans le sens d'un retard de phase.

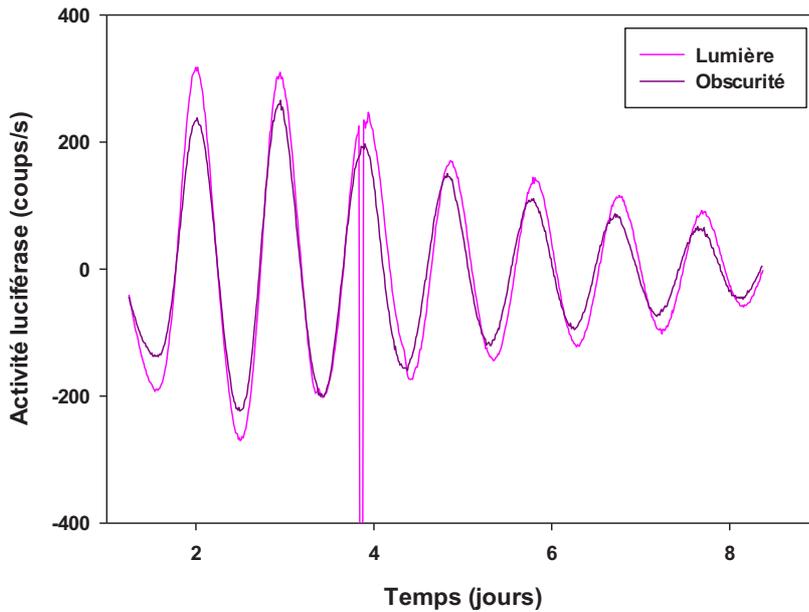


Figure 35 : Effet d'un créneau de lumière sur le cycle d'expression PER2, lorsqu'il est appliqué au moment du pic d'expression de PER2.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à un créneau de lumière d'1 h (environ 500 lux) au moment du pic de leur 3^{ème} oscillation.

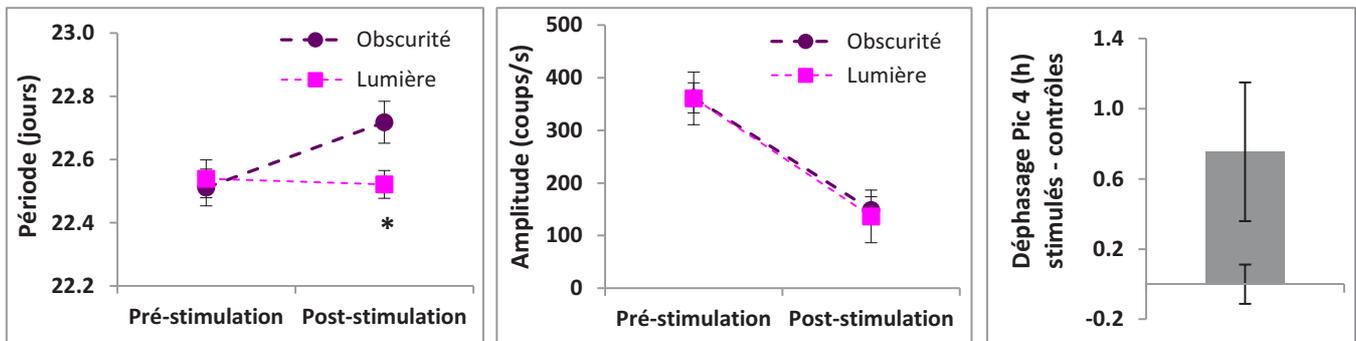


Figure 36 : Effet d'un créneau de lumière sur la période, l'amplitude et la phase du cycle d'expression de PER2, lorsqu'il est appliqué au moment du pic d'expression de PER2.

Evolution de la période (à gauche) et de l'amplitude (au milieu) moyennes des oscillations de rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à une stimulation d'1 h par un créneau de lumière (environ 500 lux) au moment du pic de leur 3^{ème} oscillation. La période du groupe contrôle passe de 22,51 h ± 0,06 à 22,72 h ± 0,07, et celle du groupe stimulé passe de 22,54 h ± 0,06 à 22,52 h ± 0,04. L'amplitude du groupe contrôle passe de 362 coups/s ± 31 à 149 coups/s ± 16, et celle du groupe stimulé passe de 361 coups/s ± 29 à 137 coups/s ± 25. Déphasage de l'acrophase du premier pic post-stimulation (à droite) : le créneau de lumière entraîne un retard de phase d'1,18 h ± 0,4 du Pic 4, ce retard de phase étant de 0,43 h ± 0,11 pour le groupe contrôle.

Les échantillons contrôles n'ont pas été retirés du LumiCycle au cours de la stimulation, et il n'est pas impossible que les effets observés soient dus à la manipulation des boîtes stimulées, bien que cela semble improbable au vu de l'absence d'effet de cette manipulation au cours des essais précédents.

Pour lever ce doute, la dernière tentative de créneau de lumière, réalisée cette fois-ci dans le creux qui sépare la 3^{ème} oscillation de la 4^{ème}, est effectuée en retirant également les boîtes contrôles du LumiCycle et en les plaçant dans un incubateur à l'obscurité (Figure 37 ; n = 6 dans chaque groupe). Ce créneau de lumière n'a pas d'effet sur l'amplitude des oscillations (Figure 38 ; p = 0,4 ; ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées), pas plus que sur leur période (Figure 38 ; p = 0,7 ; ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées). Les échantillons stimulés ont tendance à être en avance de phase d'environ 30 min, mais cette tendance n'est pas significative (Figure 38 ; p = 0,2 ; ANOVA à un facteur comparant la différence entre l'acrophase réelle du Pic 4 et sa prédiction d'après l'acrophase du Pic 2 pour les échantillons stimulés par

rapport à cette même différence pour des échantillons contrôles). Cette tendance à l'avance de phase est confirmée lorsque la prédiction de l'acrophase du Pic 4 est réalisée à partir des acrophases des Pics 1 et 3.

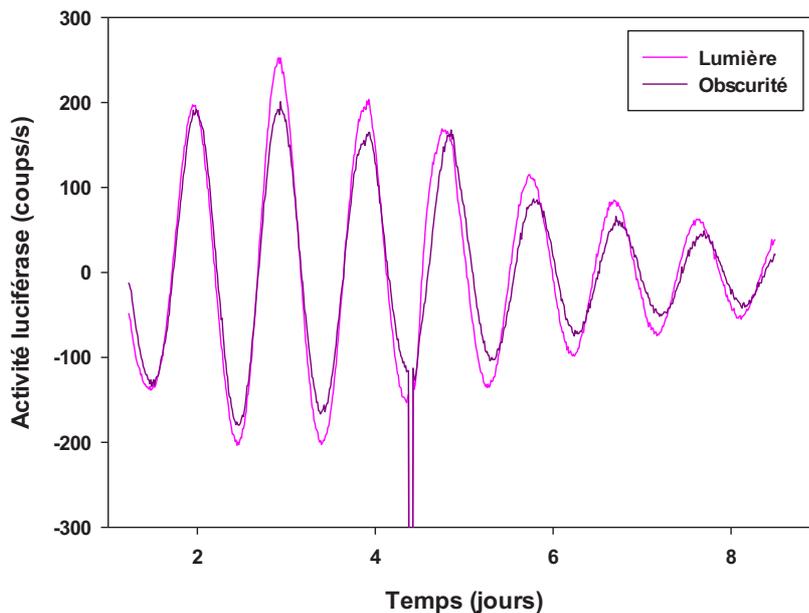


Figure 37 : Effet d'un créneau de lumière sur le cycle d'expression PER2, lorsqu'il est appliqué dans le creux de l'expression de PER2.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à un créneau de lumière d'1 h (environ 500 lux) au moment du creux qui sépare leur 3^{ème} de leur 4^{ème} oscillation.

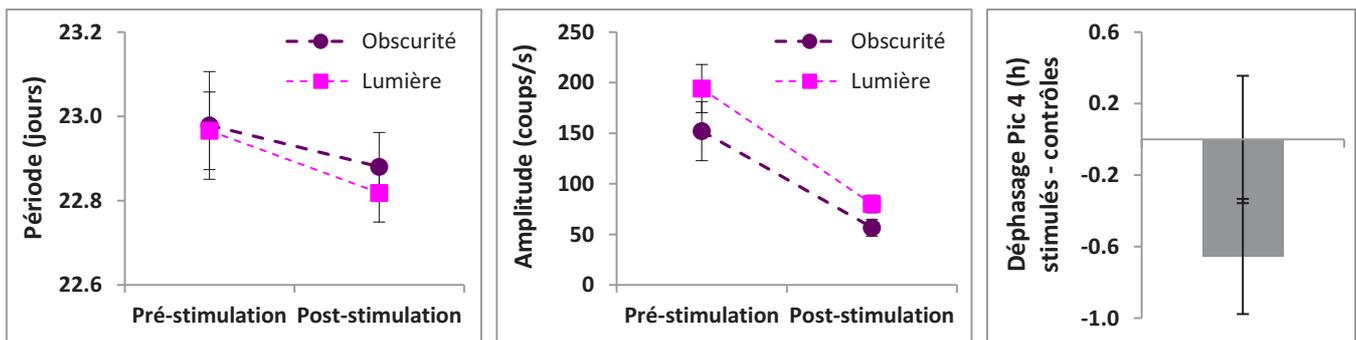


Figure 38 : Effet d'un créneau de lumière sur la période, l'amplitude et la phase du cycle d'expression de PER2, lorsqu'il est appliqué dans le creux de l'expression de PER2.

Evolution de la période (à gauche) et de l'amplitude (au milieu) moyennes des oscillations de rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à une stimulation d'1 h par un créneau de lumière (environ 500 lux) au moment du creux qui sépare leur 3^{ème} de leur 4^{ème} oscillation. La période du groupe contrôle passe de 22,97 h \pm 0,13 à 22,88 h \pm 0,08, et celle du groupe stimulé passe de 22,97 h \pm 0,09 à 22,82 h \pm 0,07. L'amplitude du groupe contrôle passe de 152 coups/s \pm 29 à 57 coups/s \pm 8, et celle du groupe stimulé passe de 194 coups/s \pm 24 à 80 coups/s \pm 9. Déphasage de l'acrophase du premier pic post-stimulation (à droite) : le créneau de lumière entraîne une avance de phase d'1,05 h \pm 0,32 du Pic 4, cette avance de phase étant de 0,40 h \pm 0,36 pour le groupe contrôle.

IV.1.A.b / Entraînement par un cycle d'alternance lumière/obscurité

La soumission des rétines à un cycle LD 12/12 durant 48 h avant le début des enregistrements en bioluminescence (n = 4 dans le groupe LD et n = 3 dans le groupe contrôle maintenu en DD) n'a pas d'effet sur la période de leurs oscillations (p = 0,7 ; ANOVA à un facteur : 22,47 h \pm 0,08 pour le groupe DD, 22,58 h \pm 0,23 pour le groupe LD) (ce qui indique que le libre cours s'installe immédiatement dans la rétine), pas plus que sur leur amplitude (p = 0,6 ; ANOVA à un facteur : 80,28 coups/s \pm 28 pour le groupe DD, 105 coups/s \pm 29 pour le groupe LD). Le cycle LD provoque en revanche une avance de phase d'environ 2h45 (Figure 39) qui n'est pas tout à fait significative sur le 1^{er} pic (Figure 40 ; p = 0,051 ; ANOVA à un facteur) mais qui est confirmée sur le 2^{ème} (Figure 40 ; p = 0,03 ; ANOVA à un facteur). Cet effet est contre-intuitif

puisque, la période endogène des rétines étant plus courte que 24 h, la synchronisation des échantillons sur un cycle de 24 h devrait conduire à des acrophases plus tardives par rapport à celles des échantillons laissés en libre cours. Mais cela prouve en tout cas un effet de la lumière, de même que le fait que les acrophases du second pic des échantillons entraînés soient moins dispersées que celles des échantillons du groupe contrôle ($p = 0,02$; test de Bartlett d'homogénéité des variances).

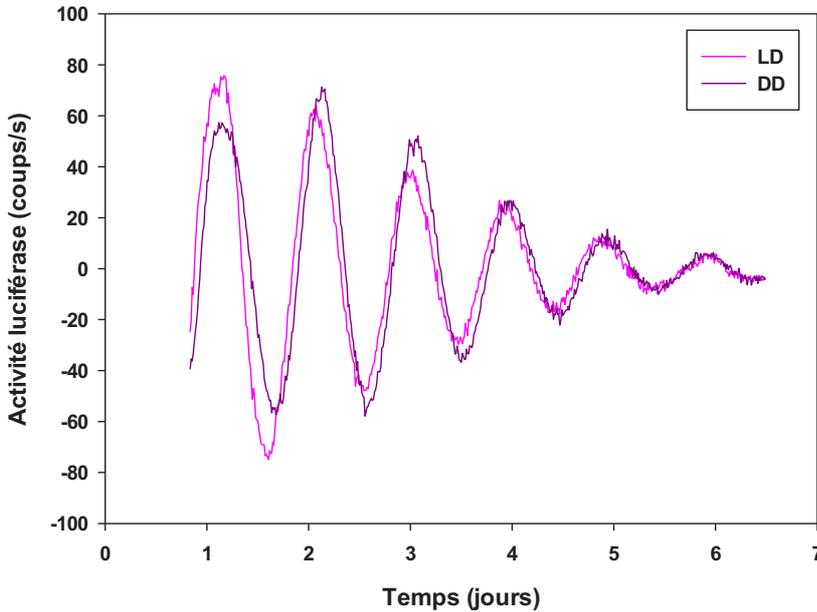


Figure 39 : Effet de l'exposition à un cycle LD12/12 sur le cycle d'expression de PER2.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à un cycle LD12/12 durant 48 h de culture précédant le début des enregistrements.

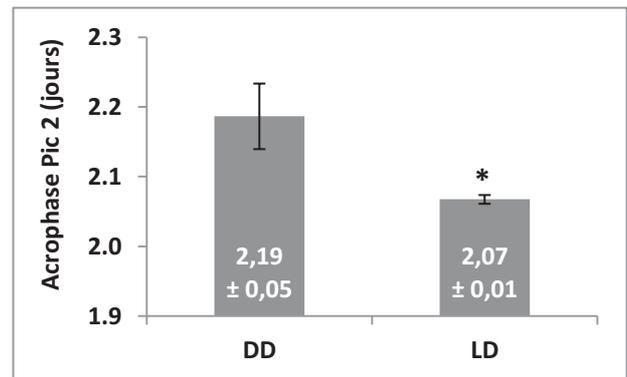
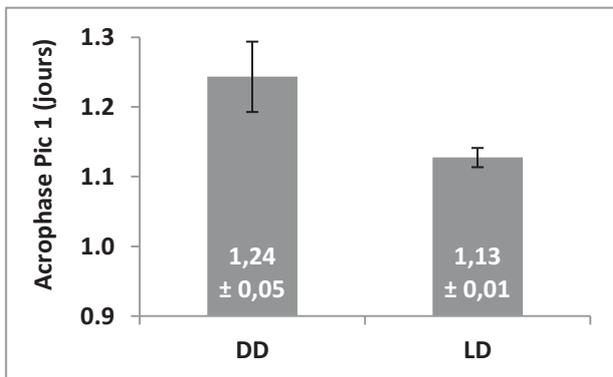


Figure 40 : Effet de l'exposition à un cycle LD12/12 sur l'acrophase de l'expression de PER2.

Comparaison des acrophases des premier (à gauche) et deuxième (à droite) pics de bioluminescence enregistrés pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à un cycle LD 12/12 durant 48 h de culture précédant le début des enregistrements.

IV.1.B / Chez le rat *Per1-Luc*

IV.1.B.a / Application d'un créneau de lumière

Chez le rat, les expériences de stimulation par un créneau de lumière sont confrontées au problème majeur de l'amortissement rapide des oscillations, de leur faible amplitude et de leur tendance à l'instabilité. De ce fait, les premières tentatives d'application d'un créneau de lumière au cours de la troisième oscillation ont été un échec puisque les portions de courbe après la stimulation ne sont plus analysables. Nous avons donc refait une tentative en administrant la lumière, à 1000 lux cette fois-ci, au cours de la deuxième oscillation (phase descendante), nous n'avons à nouveau pas pu mettre en évidence d'effet de la lumière. En effet, la

précocité de l'application de la stimulation ne permet pas de calculer proprement des valeurs de période pré-stimulation, et la faiblesse de l'amplitude des oscillations après la stimulation limite le calcul de la période post-stimulation et empêche de déterminer précisément des acrophases. Il est cependant intéressant de noter que, sur 16 échantillons répartis en deux expériences (4 contrôles et 4 traités pour chacune des expériences), seuls 9 présentaient encore des oscillations après la stimulation, avec des amplitudes très faibles et un amortissement rapide (**Figure 41**), mais que parmi ces 9 échantillons oscillants, 6 étaient issus des groupes ayant vu la lumière et 3 seulement étaient issus des groupes contrôles (retirés du LumiCycle le temps de la stimulation mais maintenus dans le noir), ce qui laisse penser que la lumière favorise la persistance des oscillations.

Cette approche expérimentale n'est donc pas adaptée à l'étude de l'entraînement de l'horloge rétinienne des rats *Per1-Luc*.

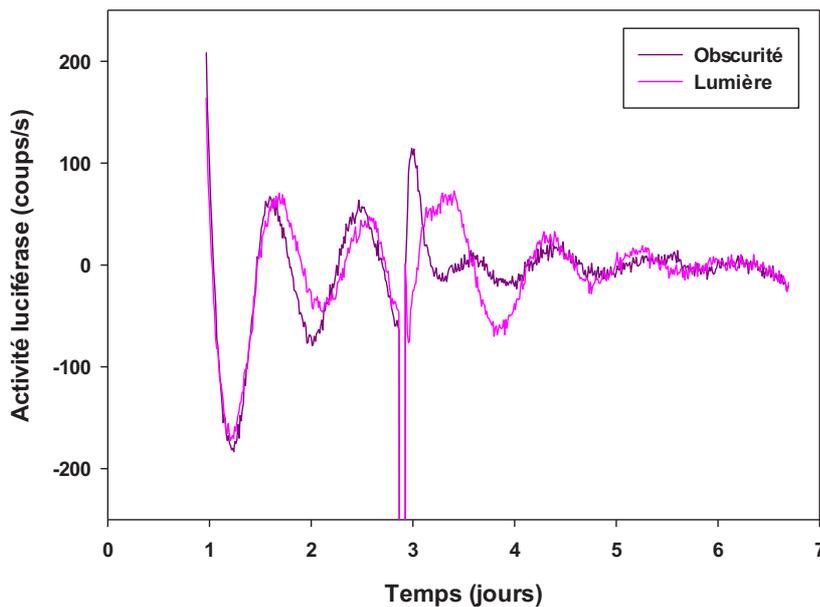


Figure 41 : Effet de l'exposition à un cycle LD12/12 sur le cycle d'expression de *Per1*.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de rat *Per1-Luc* soumises ou non à un créneau de lumière d'1 h (environ 1000 lux) durant la phase descendante de leur 2^{ème} oscillation.

IV.1.B.b / Entraînement par un cycle d'alternance lumière/obscurité

Nous avons également comparé les oscillations de rétines exposées à un cycle LD 12/12 durant les 48 h de pré-incubation qui précèdent le début des enregistrements à celles de rétines maintenues à l'obscurité. Une première expérience qui comprend 7 échantillons contrôles et 8 échantillons traités indique que le cycle LD a tendance à provoquer une augmentation de l'amplitude des oscillations et un retard de phase d'environ 30 min (**Figure 42**). L'expérience a donc été répétée, avec 10 échantillons contrôles et 11 traités, et aboutit aux mêmes tendances. La difficulté pour mettre en évidence des effets avec les rétines de rat est que la variabilité est toujours très importante, quels que soient les paramètres testés. Le rassemblement des échantillons des deux expériences permet de rendre l'augmentation d'amplitude pratiquement statistiquement significative (**Figure 43** ; $p = 0,053$; ANOVA à un facteur) mais ne confirme en revanche pas le retard de phase (**Figure 43** ; $p = 0,18$; ANOVA à un facteur). De même que pour les rétines de souris PER2::LUC, le cycle LD ne modifie pas la période des rétines de rat *Per1-Luc* qui y ont été exposées ($p = 0,7$; ANOVA à un facteur : $23,29 \text{ h} \pm 0,16$ pour le groupe DD et $23,17 \text{ h} \pm 0,10$ pour le groupe LD).

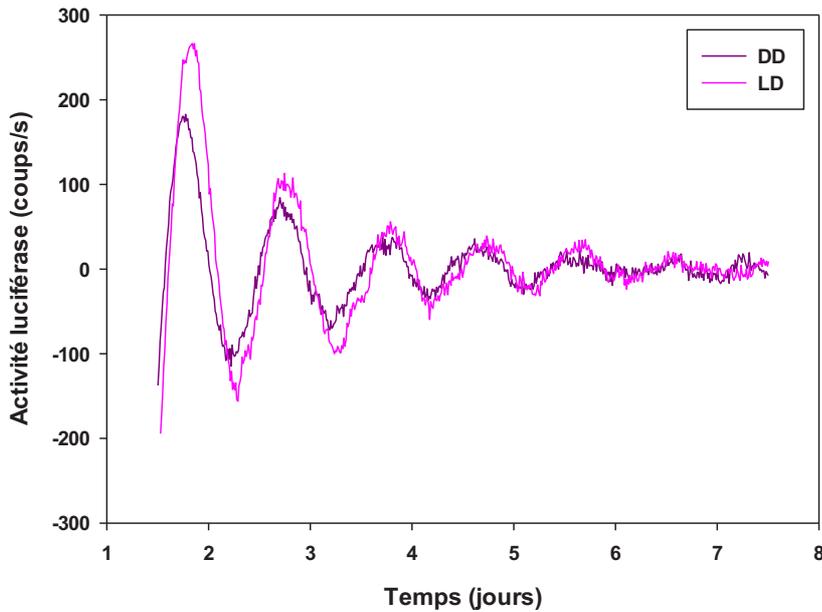


Figure 42 : Effet de l'exposition à un cycle LD12/12 sur le cycle d'expression de *Per1*.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de rat *Per1-Luc* soumises ou non à un cycle LD12/12 durant 48 h de culture précédant le début des enregistrements.

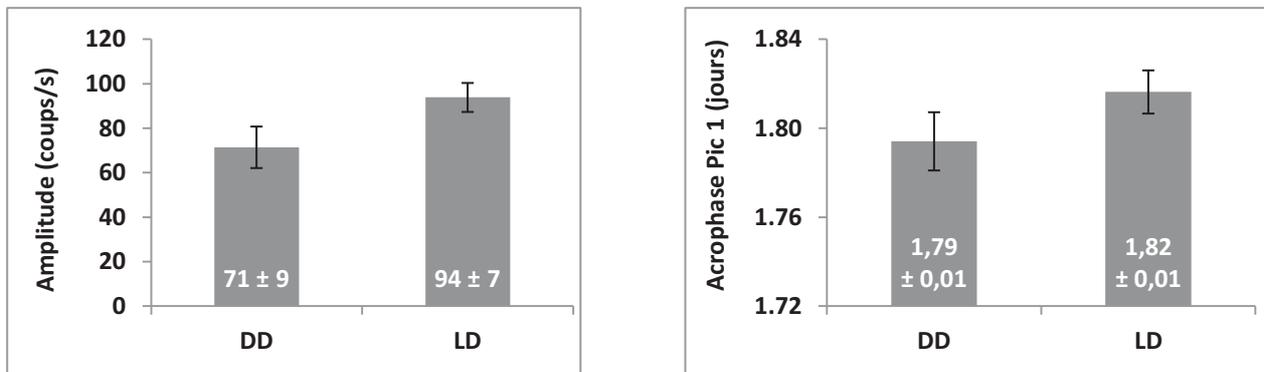


Figure 43 : Effet de l'exposition à un cycle LD12/12 sur l'amplitude et l'acrophase de l'expression de *Per1*.

Comparaison de l'amplitude (à gauche) et de l'acrophase du premier pic (à droite) des oscillations de bioluminescence enregistrées pour des rétines de rat *Per1-Luc* soumises ou non à un cycle LD12/12 durant 48 h de culture précédant le début des enregistrements.

IV.1.C / Discussion

De l'ensemble de ces résultats, la première conclusion qui peut être tirée est que les effets de la lumière sur l'horloge rétinienne sont difficiles à mettre en évidence, tout particulièrement avec le modèle du rat *Per1-Luc* chez qui le seul indice de l'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière est une augmentation de l'amplitude des oscillations suite à la soumission à un cycle LD 12/12.

Chez le modèle de souris PER2::LUC, les indices de l'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière sont plus évidents : un créneau de lumière a tendance à provoquer un retard ou une avance de phase selon que son application est réalisée au moment du pic ou du creux de l'oscillation, mais ces déphasages sont d'une ampleur très faible (moins d'1 h). Ces effets, qui vont dans des directions opposées lorsqu'ils sont provoqués à des moments différents du cycle, sont typiques d'une réponse d'entraînement à un Zeitgeber. Les déphasages que nous avons observés tendent à rejoindre ceux observés par (Ruan *et al.*, 2008) : les effets qu'ils décrivent sur les phases ascendante et descendante de l'oscillation de PER2, nous les avons observés respectivement sur le pic et dans le creux de cette oscillation, avec des amplitudes très limitées dans tous les cas. L'avance de phase que nous avons observée lorsque la stimulation lumineuse est

appliquée dans le creux de l'oscillation est cohérente avec l'effet décrit par (Ruan *et al.*, 2008) lors de l'application d'un agoniste du récepteur D1 au même moment, un effet d'une ampleur très faible également (environ 1 h).

La soumission des rétines PER2::LUC à un cycle LD 12/12 provoque, quant à elle, une tendance à l'avance de phase un peu plus conséquente (d'environ 2h45). La direction de cet effet est difficile à comprendre, d'autant plus que la tendance est inverse avec les rétines de rat *Per1-Luc*, mais il faut garder à l'esprit que le cycle LD est superposé aux changements de milieu de culture qui interviennent durant la pré-incubation des échantillons, et que les rétines de rat et de souris ne sont pas soumises au même protocole de pré-incubation. Les rétines de souris PER2::LUC ayant des oscillations très durables, il est possible d'envisager de retarder de 24 h le début du cycle LD afin d'éviter cette superposition. L'inconvénient de l'approche par cycle LD est qu'il n'est pas possible d'enregistrer les échantillons au cours de la stimulation. En revanche, l'approche par créneau d'1 h appliqué en cours d'enregistrement permet de comparer l'évolution des paramètres des oscillations de chaque échantillon avant et après la stimulation, mais ne donne que des effets ténus chez la souris PER2::LUC.

On peut s'interroger sur les raisons de cette sensibilité très limitée de l'horloge rétinienne à la lumière lorsqu'on considère l'ampleur et la rapidité d'apparition du déphasage du rythme de sécrétion de la mélatonine qu'un déphasage du cycle LD est capable de provoquer dans des rétines de hamster et de souris en culture (Tosini and Menaker, 1996, 1998a). Deux explications peuvent être proposées à cela :

- Nos conditions de culture ne permettent pas à l'horloge rétinienne de répondre pleinement à la lumière. Les raisons en sont inconnues, puisque l'ajout de 9-*cis*-rétinal dans le milieu de culture et la dissection des échantillons sous une lumière rouge n'améliorent pas leur capacité de réponse.
- Les protocoles que nous avons utilisés ne sont pas adaptés à la mise en évidence des effets de la lumière sur l'horloge rétinienne. Nous avons réalisé quelques essais, en augmentant de la durée du créneau de lumière (2 h) ou l'intensité de la lumière (jusqu'à 3000 lux), qui ne se sont pas révélés plus concluants.

Une étude vient tout juste d'apporter quelques éclairages sur cette question, en montrant d'une part que des décalages de phase de l'horloge de souris PER2::LUC peuvent être obtenus en culture avec des créneaux de lumière de 3 h à 457 nm (avec un sens et une ampleur de décalage variables selon le moment de la stimulation), et d'autre part qu'il faut un minimum de 4 jours de cycle LD pour que l'horloge de ces mêmes rétines soit pleinement entraînée (Buhr and Van Gelder, 2014). Il est donc possible d'envisager que seules des stimulations lumineuses longues sont efficaces, ce qui rendrait l'horloge rétinienne insensible à des stimulations courtes non pertinentes. Dans le cas des études de Tosini et Menaker (Tosini and Menaker, 1996, 1998a), un effet de masquage du rythme de libération de la mélatonine pourrait alors se superposer à l'effet d'entraînement via l'horloge, ce qui se justifierait par le fait que la synthèse de mélatonine dans la rétine est directement sous le contrôle de la lumière, en plus de celui de l'horloge (Fukuhara *et al.*, 2004; Tosini *et al.*, 2006). Mais il reste encore à tester les autres longueurs d'onde du spectre visible, qui ont peut-être des effets très différents de celle de 457 nm.

IV.2 / Rôle de l'AMPC dans l'entraînement de l'horloge rétinienne

Au vu de l'importance de l'AMPC dans l'entraînement de l'horloge des SCN (Tischkau *et al.*, 2000), nous avons cherché à savoir ce qu'il en est dans la rétine, grâce à l'utilisation de stimulations par la forskoline, un activateur de l'AC largement utilisé pour resynchroniser les rythmes de bioluminescence des cellules et tissus en culture (Abe *et al.*, 2002; Izumo *et al.*, 2003) et connu pour induire l'expression de *Per1* et *Per2* (Yagita and Okamura, 2000). Il a d'ailleurs été récemment montré que la forskoline entraîne les rythmes dans les os

de souris PER2::LUC en provoquant soit un retard, soit une avance de phase selon le moment de son administration (Okubo *et al.*, 2013).

IV.2.A / Chez le rat *Per1-Luc*

Nous avons testé les effets d'une augmentation transitoire de l'AMPC sur les différents paramètres des oscillations de rétines de rat *Per1-Luc* en réalisant une stimulation aiguë de l'AC par la forskoline (10 μ M) durant 1 h juste avant le début des enregistrements et avons comparé les périodes, amplitudes et phases des oscillations de ces échantillons (n = 8) à celles d'échantillons contrôles (n = 8) traités avec une concentration d'éthanol (1 ‰) équivalente à celle présente dans le milieu de stimulation (Figure 44).

La forskoline entraîne un raccourcissement de la période moyenne d'environ 1 h (Figure 45 ; p < 0,001 ; ANOVA à un facteur) ainsi qu'une très nette augmentation de l'amplitude (Figure 45 ; p < 0,001 ; ANOVA à un facteur). Le premier pic de bioluminescence a également tendance à être retardé d'une petite heure chez les échantillons traités (Figure 45 ; p = 0,06 ; ANOVA à un facteur), et cet effet ne peut pas être dû à la différence de période qui existe entre les deux groupes parce que la période des échantillons traités est raccourcie, ce qui tendrait plutôt à entraîner une avance de phase.

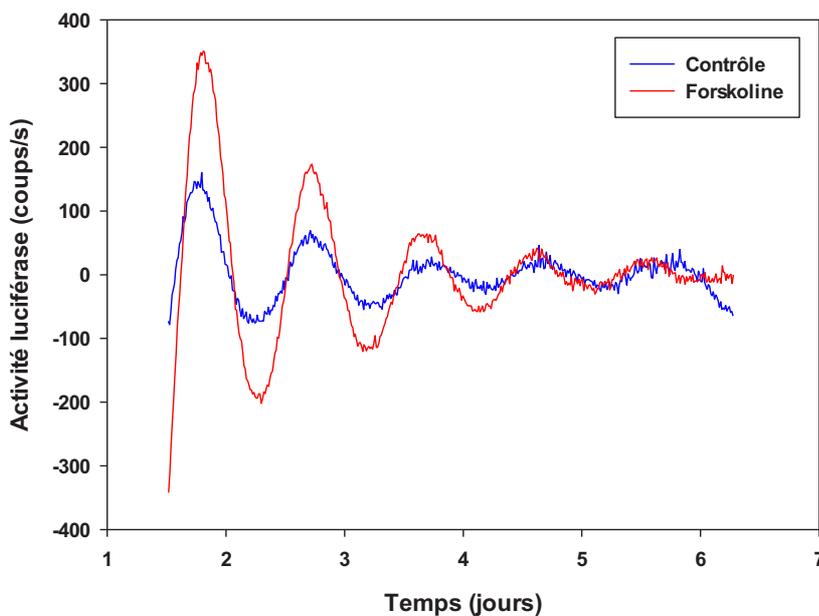


Figure 44 : Effet d'une augmentation transitoire du taux d'AMPC sur le cycle d'expression de *Per1*.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de rat *Per1-Luc* soumises ou non à une stimulation par de la forskoline (10 μ M) pendant 1 h juste avant le début des enregistrements.

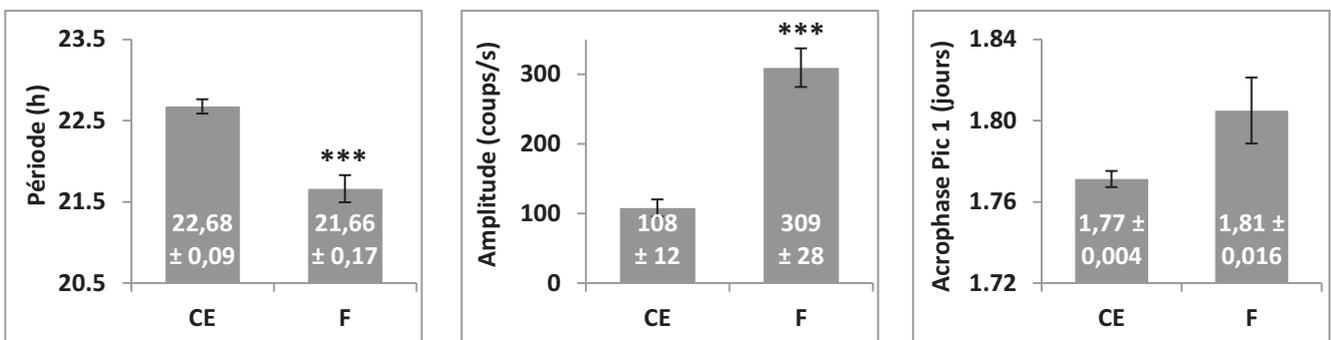


Figure 45 : Effet d'une augmentation transitoire du taux d'AMPC sur la période, l'amplitude et l'acrophase de l'expression de *Per1*.

Comparaison de la période (à gauche), de l'amplitude (au milieu) et de l'acrophase du premier pic (à droite) des oscillations de bioluminescence enregistrées pour des rétines de rat *Per1-Luc* soumises ou non à une stimulation par de la forskoline (10 μ M) pendant 1 h juste avant le début des enregistrements. CE = contrôle ; F = forskoline.

Cette expérience a été répétée dans les mêmes conditions (par Ngyuen-Vy Vo au cours de son stage de Master) avec 12 échantillons par groupe : elle a confirmé les résultats précédemment cités et a pu cette fois-ci mettre en évidence un retard significatif de phase de près de 2 h dans le groupe des échantillons traités avec la forskoline ($p = 0,006$; test t de Student : acrophase à 1,80 jours \pm 0,02 pour le groupe contrôle et à 1,88 jours \pm 0,01 pour le groupe traité).

IV.2.B / Chez la souris PER2::LUC

La même expérience est réalisée avec des rétines de souris PER2::LUC (Figure 46 ; $n = 7$ dans chaque groupe). Cette fois-ci, aucun effet sur la période ($p = 0,2$; ANOVA à un facteur : 22,77 h \pm 0,07 pour les échantillons contrôles et 22,63 h \pm 0,09 pour les échantillons traités), sur l'amplitude ($p = 0,9$; ANOVA à un facteur : 319 coups/s \pm 135 pour les échantillons contrôles et 313 coups/s \pm 32 pour les échantillons traités) ou sur l'acrophase du premier pic de bioluminescence ($p = 0,7$; ANOVA à un facteur : 2,15 jours \pm 0,01 pour les échantillons contrôles et 2,15 jours \pm 0,02 pour les échantillons traités) n'a pu être mis en évidence.

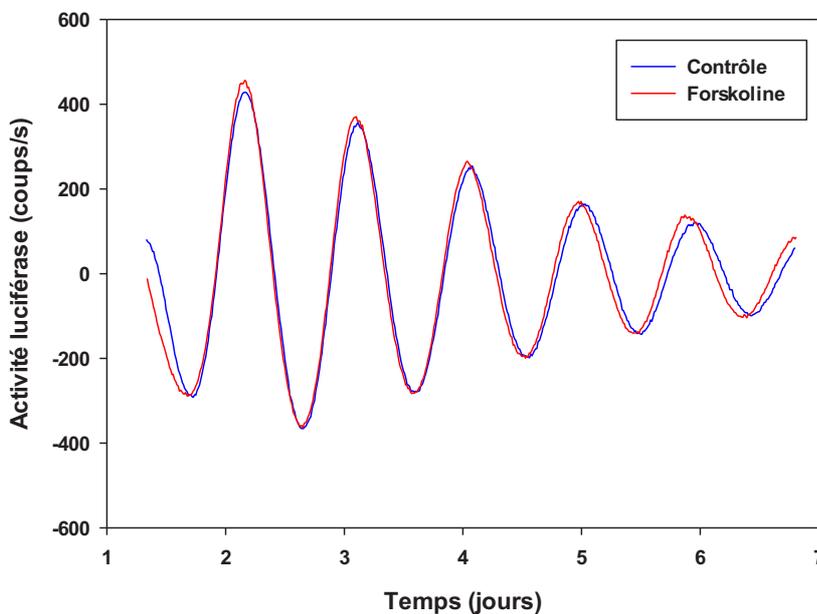


Figure 46 : Effet d'une augmentation transitoire du taux d'AMPc sur le cycle d'expression de PER2.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à une stimulation par de la forskoline (10 μ M) pendant 1 h juste avant le début des enregistrements.

Il est vraisemblable que la forskoline puisse exercer des effets différents selon le moment du cycle où elle est administrée. L'administration avant le début des enregistrements ne permet pas de contrôler ce paramètre. Etant donné que les rétines de souris présentent des oscillations très durables, ce modèle est optimal pour réaliser des stimulations en cours d'enregistrement. Nous avons donc stimulé un groupe de rétines de souris PER2::LUC (Figure 47 ; $n = 9$ dans chaque groupe) au milieu de la phase descendante de leur quatrième oscillation. Alors qu'aucune différence de période n'est observée entre les deux groupes (Figure 48 ; $p = 0,4$; ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées), l'amplitude des oscillations a tendance à être augmentée par le traitement, bien que cela ne soit pas significatif (Figure 48 ; $p = 0,09$; ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées). Il y a en revanche un large retard de phase d'un peu plus de 4 h des échantillons traités (Figure 48 ; $p = 0,005$; ANOVA à un facteur). Pour mesurer ce déphasage, une prédiction de l'acrophase du pic de bioluminescence qui suit la stimulation (le Pic 5) a été réalisée à partir du 3^{ème} pic de bioluminescence (c'est-à-dire le pic qui précède celui qui subira la stimulation) à l'aide de la période propre à chaque échantillon, puis les différences entre cette prédiction et l'acrophase réelle ont été comparées entre les deux groupes. Afin de vérifier la fiabilité du déphasage mis en évidence, la même

comparaison a été réalisée avec les prédictions issues des 1^{er} et 2^{ème} pics de bioluminescence et aboutissent au même déphasage de 4 h. Enfin, la durabilité de ce déphasage est également confirmée sur le 6^{ème} pic de bioluminescence (le 2^{ème} pic post-stimulation) et exclut ainsi un éventuel effet transitoire de la stimulation.

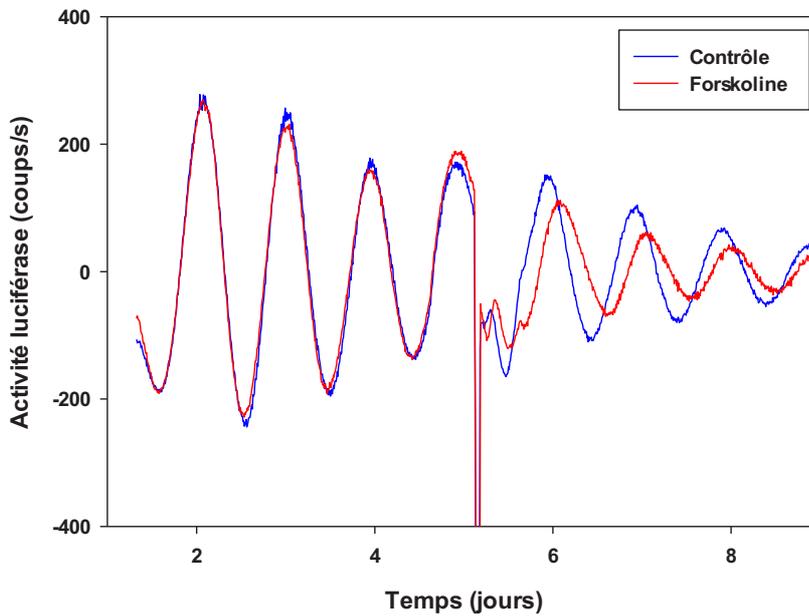


Figure 47 : Effet d'une augmentation transitoire du taux d'AMPC sur le cycle d'expression PER2, au moment de la phase descendante de l'expression de PER2.

Exemples de données de bioluminescence, après soustraction d'une ligne de base, enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à une stimulation par de la forskoline (10 μ M) pendant 1 h au cours de la phase descendante de leur quatrième oscillation.

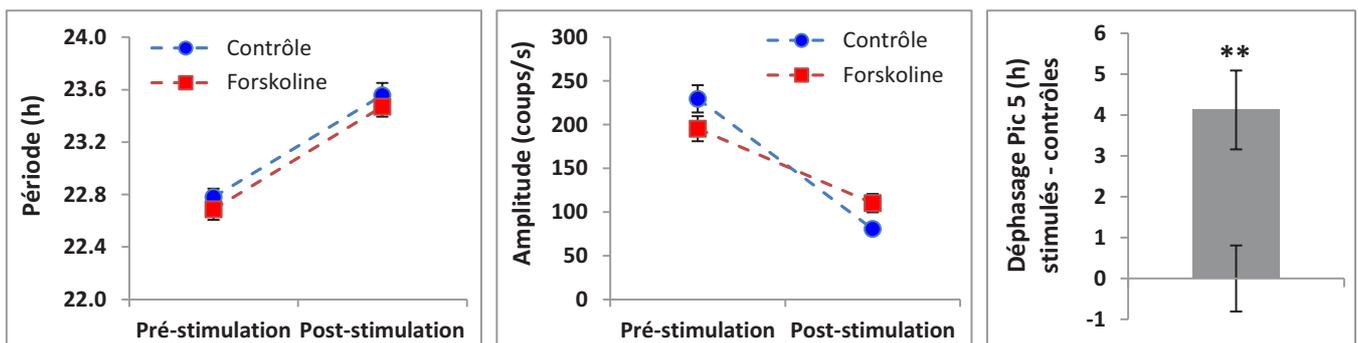


Figure 48 : Effet d'une augmentation transitoire du taux d'AMPC sur la période, l'amplitude et la phase du cycle d'expression de PER2, au moment de la phase descendante de l'expression de PER2.

Evolution de la période (à gauche) et de l'amplitude (au milieu) moyennes des oscillations de rétines de souris PER2::LUC soumises ou non à une stimulation d'1 h par de la forskoline (10 μ M) au cours de la phase descendante de leur quatrième oscillation. La période du groupe contrôle passe de 22,78 h \pm 0,07 à 23,56 h \pm 0,08, et celle du groupe stimulé passe de 22,69 h \pm 0,08 à 22,47 h \pm 0,08. L'amplitude du groupe contrôle passe de 230 coups/s \pm 16 à 81 coups/s \pm 5, et celle du groupe stimulé passe de 195 coups/s \pm 14 à 110 coups/s \pm 11. Déphasage de l'acrophase du premier pic post-stimulation (à droite) : la forskoline entraîne un retard de phase de 8,73 h \pm 0,97 du Pic 5, ce retard de phase étant de 4,61 h \pm 0,81 pour le groupe contrôle.

IV.2.C / Discussion

Bien que ces quelques expériences préliminaires ne suffisent pas à décrire l'ensemble des rôles de l'AMPC pour l'horloge rétinienne, elles indiquent que l'AMPC est capable d'entraîner cette horloge. En effet, chez le rat comme chez la souris, une stimulation d'1 h par la forskoline provoque un retard de phase des oscillations. Chez la souris, cet effet fait suite à une stimulation qui a eu lieu dans la phase descendante de l'expression de PER2, et est en accord avec le retard de phase observé par (Ruan *et al.*, 2008) suite à une stimulation par un agoniste au récepteur D1 (qui active l'AC) au même moment. L'amplitude et la direction de l'effet de la forskoline dépendent probablement du moment de l'administration de la stimulation, il

faudrait tracer la courbe de réponse de phase de l'horloge rétinienne à la forskoline pour le caractériser. Ceci serait techniquement aisé chez la souris, et pourrait expliquer l'absence de déphasage lorsque la stimulation a été réalisée 1 h avant le début des enregistrements, mais serait plus compliqué chez le rat comme le prédisent les tentatives de créneau de lumière présentées dans le **paragraphe IV.1.B.a** /. S'il est montré que la lumière entraîne l'horloge rétinienne par la voie de l'AMPC, cette courbe de réponse de phase pourra constituer un outil de prédiction des effets de la lumière sur l'horloge rétinienne plus facile d'accès que la stratégie du créneau de lumière.

Chez le rat *Per1-Luc*, l'augmentation de l'amplitude des oscillations par la forskoline traduit un effet durable de synchronisation et/ou d'augmentation de l'amplitude des rythmes dans les cellules, car l'amplitude est mesurée comme une moyenne sur 3 jours d'enregistrement. Dans les deux cas cet effet est en accord avec un rôle de l'AMPC d'induction de l'expression de *Per1* déjà décrit. Chez la souris, l'augmentation d'amplitude est plus ténue, peut-être parce que, le couplage étant plus fort dans la rétine de souris, la désynchronisation est faible au sein du tissu et l'amplitude des oscillations est maintenue à un niveau élevé. Une autre explication possible serait un effet d'augmentation de l'amplitude de l'expression de *Per1* qui ne se produirait pas au niveau de la protéine PER2.

Enfin concernant l'effet de la forskoline sur la période des oscillations, une diminution est observée chez le rat alors qu'aucun effet n'est mis en évidence chez la souris. Nous ne pouvons actuellement que proposer des conjectures pour expliquer cette différence : premièrement, la différence peut se situer au niveau de l'espèce, les horloges rétiniennes n'étant pas forcément tout à fait équivalentes chez le rat et la souris. Deuxièmement, deux rapporteurs différents sont suivis dans les deux lignées (dans un cas il reflète l'expression du gène *Per1* et dans l'autre celle de la protéine PER2), et peuvent potentiellement répondre différemment à un même stimulus.

V / Fonctionnement de l'horloge au cours de la maturation de la rétine

Chez le rat comme chez la souris, nous avons réalisé quelques mises en culture de jeunes rétines afin de déterminer à quel âge l'horloge rétinienne commence à fonctionner. L'évolution des paramètres des oscillations avec l'âge pourra être corrélé aux stades de maturation de la rétine et apporter des indices sur l'importance des différents types cellulaires et de leur connexions pour l'expression de l'horloge.

V.1 / Chez le souriceau PER2::LUC

Des rétines de souris PER2::LUC âgées de 11 jours (P11) sont mises en culture selon les protocoles habituels et enregistrées en bioluminescence. Les paramètres de période et d'amplitude des oscillations sont déterminés de la manière habituelle et comparés à ceux d'un groupe de rétines adultes de même effectif constitué en tirant au hasard des échantillons dans le groupe "Whole retina" présenté dans l'Article 2.

A P11, les rétines de souris présentent des oscillations de bioluminescence. Elles ont cependant un niveau global d'activité inférieur à celui des rétines adultes (Figure 49). La comparaison des périodes indique que les jeunes rétines ont une période moyenne significativement plus élevée que celle des rétines adultes (Figure 50 ; $p < 0,001$; ANOVA à un facteur ; $n = 9$ dans chaque groupe), mais également plus variables ($p = 0,01$; test de Bartlett d'homogénéité des variances).

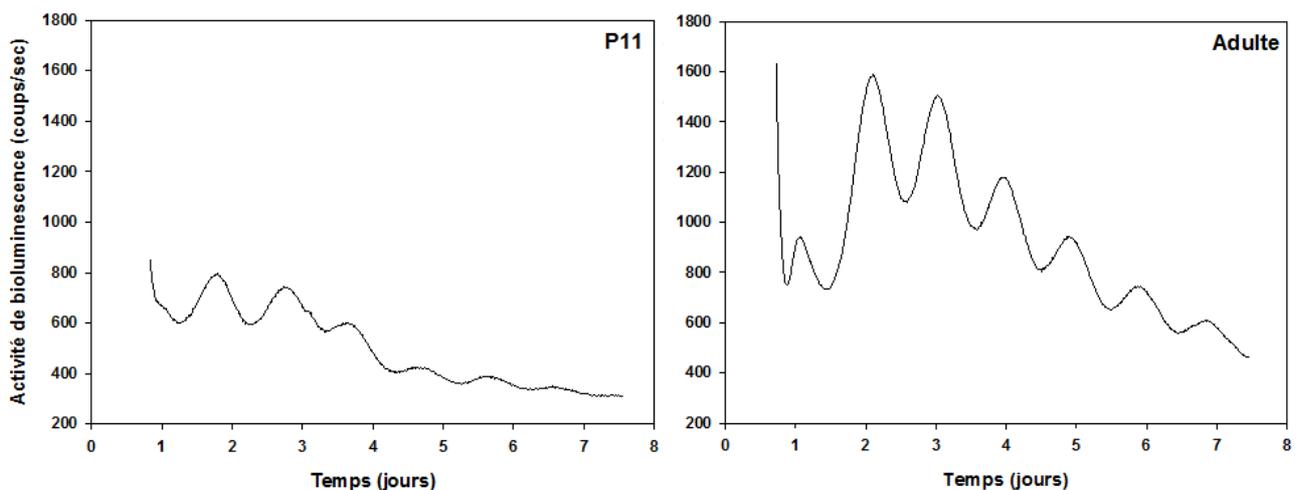


Figure 49 : Evolution du profil d'expression de PER2 dans la rétine de souris jeune et adulte.

Exemples représentatifs d'enregistrements en bioluminescence d'une jeune rétine (P11, à gauche) et d'une rétine adulte (à droite) de souris PER2::LUC.

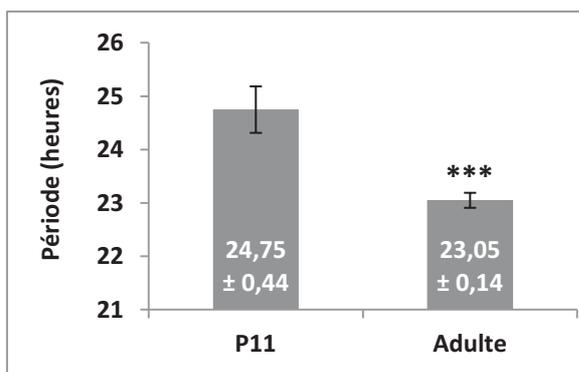


Figure 50 : Evolution de la période de l'expression de PER2 dans la rétine entre une souris jeune et une souris adulte.

Comparaison de la période moyenne des oscillations de bioluminescence enregistrées pour des rétines de souris PER2::LUC jeunes (P11) et adultes.

V.2 / Chez le raton *Per1-Luc*

Des rétines de rats *Per1-Luc* âgés de 10 et de 15 jours (P10 et P15) ont été mises en culture selon les protocoles habituels et enregistrées en bioluminescence.

Les rétines de rat à P10 ne présentent aucune oscillation ($n = 6$), bien qu'elles aient un niveau d'activité très élevé (aussi élevé que celui des rétines adultes) (**Figure 51**). Notons tout de même qu'au cours des enregistrements, presque tous les échantillons (5/6) ont spontanément présenté une ré-augmentation de leur niveau d'activité, qui n'a pas la cinétique d'une oscillation circadienne mais qui n'est pourtant pas un artéfact de culture puisque cet événement se produit à des moments différents selon les échantillons (entre le 8^{ème} et le 14^{ème} jour de culture). Ceci laisse penser qu'une évolution active du réseau horloger se produit dans le tissu en culture.

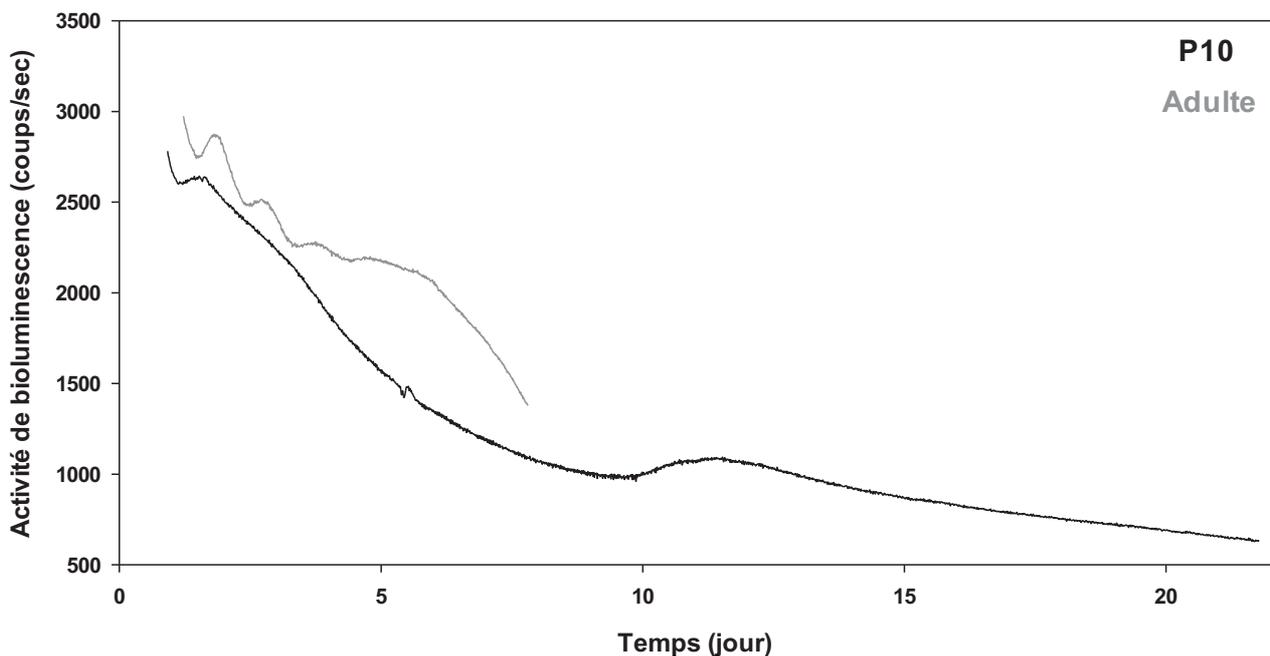


Figure 51 : Evolution du profil d'expression de *Per1* dans la rétine de rat jeune et adulte.

Exemples représentatifs d'enregistrements en bioluminescence d'une jeune rétine (P10, en noir) et d'une rétine adulte (en gris) de rat *Per1-Luc*.

En l'absence d'oscillations visibles à P10, des rétines d'animaux âgés de 15 jours ont été mises en culture ($n = 6$). Le comportement des échantillons est intéressant à deux moments distincts des enregistrements (**Figure 52**). Le premier correspond au premier jour des enregistrements, au cours duquel 5 des 6 échantillons ont présenté une oscillation de leur activité de bioluminescence, qui semble de l'ordre du circadien, mais qui ne se confirme pas les jours suivants. La seconde portion intéressante se situe, selon les échantillons, entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour des enregistrements : à ce moment 4 des 6 échantillons ont présenté un démarrage spontané d'oscillations circadiennes, qui cette fois se confirment sur plusieurs jours.

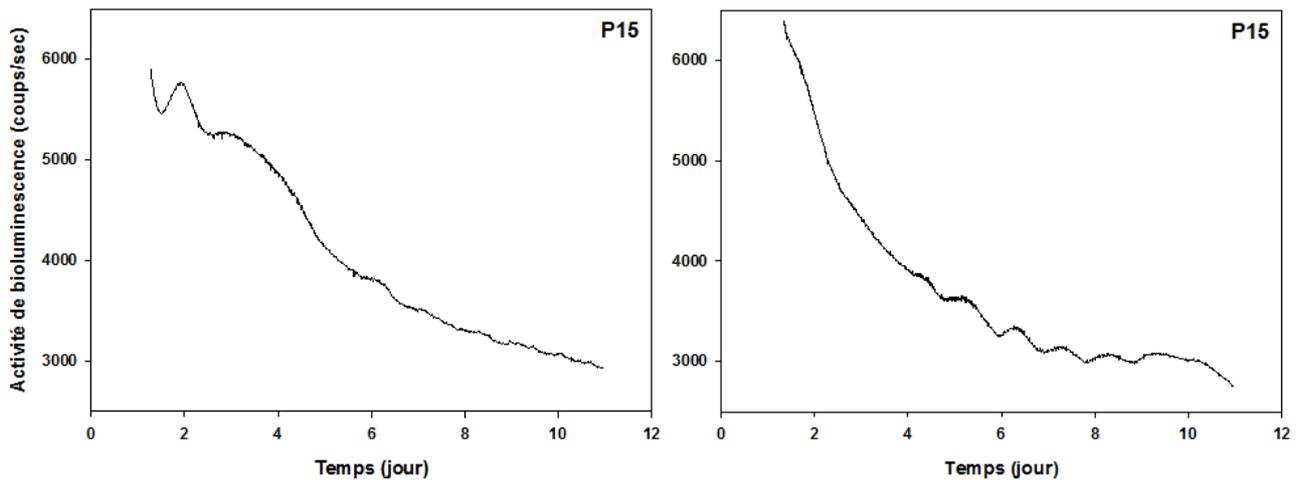


Figure 52 : Exemples d'enregistrements en bioluminescence de jeunes rétines (P15) de rat *Per1-Luc*.

V.3 / Discussion

V.3.A / Maturation rétinienne chez le souriceau

Chez le souriceau à P11, l'horloge rétinienne est fonctionnelle et tourne avec une période de la gamme circadienne, alors que les yeux ne sont pas encore ouverts (ils s'ouvrent à partir de P12). Ses caractéristiques sont cependant différentes de celles de l'horloge rétinienne adulte : sa période est plus longue et plus variable et le niveau d'expression de PER2 est réduit (en association avec une amplitude diminuée également). Comme à cet âge la prolifération cellulaire est achevée alors que les processus de mort cellulaire liés à la maturation du tissu ne le sont pas encore complètement (Vecino *et al.*, 2004), la rétine contient plus de cellules à P11 qu'à l'âge adulte. La diminution du niveau d'activité observée à P11 provient donc vraisemblablement d'une expression moins importante de PER2 à cet âge, soit au niveau de chaque cellule soit au niveau du nombre de cellules oscillantes.

À P11, tous les types cellulaires rétiens ont achevé leur différenciation (Figure 53) et les trois couches nucléaires sont séparées par les deux couches plexiformes (Figure 54). Mais la maturation de la rétine n'est pas encore pleinement achevée : si les connexions synaptiques dans l'OPL ont déjà atteint un degré avancé de maturité, il n'en est pas de même dans l'INL. Les connexions synaptiques qui unissent les cellules ganglionnaires et amacrines commencent à s'établir dès la naissance mais n'accroissent leur formation qu'à partir de P10, tandis que les synapses faites par les cellules bipolaires dans l'INL commencent seulement à apparaître à cet âge (Olney, 1968). À P11, la l'intégrité de la connexion entre les couches externe et interne est donc tout juste naissante. Il est donc possible d'envisager que les oscillateurs rétiens ne soient alors pas autant couplés que dans la rétine adulte et engendrent des oscillations d'une période plus longue.

Ainsi, si l'horloge rétinienne est présente et fonctionnelle à P11, ses propriétés ne sont pas encore tout à fait identiques à celle de la rétine adulte. Il sera intéressant de réaliser des mises en culture de rétines plus jeunes encore afin de connaître le moment de sa mise en route, et notamment à P1 et P5, les âges où s'établissent les synapses conventionnelles dans l'IPL et les synapses dans l'OPL respectivement, pour déterminer quelles connexions sont les plus cruciales pour définir la période de l'horloge.

Figure 53 : Chronologie de l'émergence des cellules rétiniennes chez la souris. (Hatakeyama and Kageyama, 2004)

A la naissance, les cellules horizontales et les cônes sont les seules cellules à avoir achevé leur différenciation. Après la naissance, les cellules ganglionnaires et amacrines les rejoignent. Les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller sont les dernières cellules à achever leur différenciation. D'après (Young, 1985)

Figure 54 : Chronologie de la mise en place de la structure laminaire de la rétine. (Mumm *et al.*, 2005)

(1) A la naissance, la rétine est constituée de deux couches nucléaires (la couche des cellules ganglionnaires et la couche des cellules neuroblastiques) séparées par l'IPL où seules les synapses conventionnelles formées par les cellules amacrines (entre elles et avec les cellules ganglionnaires) s'établissent alors. **(2)** Puis, à partir de P5 chez la souris, la couche des cellules neuroblastiques se scinde en deux couches nucléaires (l'INL et la PRL) séparées par l'OPL où les photorécepteurs forment leurs synapses (dites à ruban) avec les cellules horizontales, puis avec les cellules bipolaires. Dans un second temps (à partir de P10 chez la souris), les synapses des cellules bipolaires (à ruban également) s'établissent dans l'IPL, connectant enfin la rétine externe à la rétine interne pour permettre le flux vertical de l'information. **(3)** Mais la rétine n'est alors pas entièrement mature : durant encore une à trois semaines après l'ouverture des yeux (selon l'événement considéré) et notamment grâce à l'expérience visuelle, les photorécepteurs poursuivent l'expansion de leurs segments externes et internes, les prolongements neuronaux affinent de manière très dynamique leur morphologie et leur localisation dans les sous-couches de l'INL, les connexions synaptiques continuent à s'établir. (Grün, 1982; Olney, 1968; Tian, 2004)

V.3.B / Maturation rétinienne chez le raton

Chez le raton, il semblerait que l'horloge rétinienne se mette à tourner plus tardivement que chez le souriceau, quoiqu'une absence d'oscillation de *Per1* ne signifie pas forcément qu'aucun système horloger ne fonctionne à ce moment-là. Pour le vérifier il faudra déterminer si les autres gènes horloge n'oscillent pas non plus.

Il est cependant intéressant de constater que les événements remarquables qui surviennent sur les courbes de bioluminescence lors de la culture des deux groupes de jeunes rétines de rat coïncident au niveau de l'âge de la rétine : autour du 5^{ème} jour chez les animaux âgés de 15 jours et autour du 10^{ème} jour chez les animaux âgés de 10 jours. Sachant que les rétines sont préincubées durant 48 h avant le début des enregistrements, il est vraisemblable qu'un événement particulier pour l'horloge rétinienne se produise chez le raton autour de P22, peut-être sa mise en route. Il faudrait le confirmer en réalisant des mises en culture autour de cet âge.

Ces observations supposent que la rétine continue à se développer au cours de la culture. Nous ne l'avons pas vérifié mais plusieurs auteurs l'ont montré (Johansson and Ehinger, 2001; La Vail and Hild, 1971).

Le développement de la rétine du raton suit la même chronologie que celle du souriceau, mais sur une échelle de temps un peu plus étendue. A P10, les yeux sont encore fermés. Au niveau de la rétine, les trois couches nucléaires et les deux couches plexiformes sont distinctes. Les segments externes des photorécepteurs sont en pleine expansion, mais les synapses sont formées avec l'INL. En revanche, les synapses des cellules bipolaires dans la couche plexiforme interne ne sont pas encore formées et l'électrorétinogramme est encore complètement plat (cet âge correspond au milieu de la phase (2) de la **Figure 54**). A P15 en revanche, alors que les yeux sont juste ouverts, l'ERG indique que l'information photique est véhiculée et traitée de part en part, bien que les connexions synaptiques soient encore en pleine formation (phase (3) de la **Figure 54**). (Weidman and Kuwabara, 1969)

Si des expériences complémentaires confirment que les autres gènes horloge ne sont pas non plus rythmiques dans la rétine du rat à P15, cela signifiera que l'horloge rétinienne commence à tourner dans une rétine plus mature chez le rat que chez la souris. Ceci est en accord avec l'une des conclusions de l'**Article 2** qui propose que le couplage des oscillateurs rétiniens est moins robuste chez le rat que chez la souris, ce qui expliquerait que l'horloge rétinienne du rat nécessite un degré de maturité de la connectivité plus élevé pour pouvoir s'exprimer. Il s'agira alors de réaliser des mises en culture à des âges croissants jusqu'à l'âge adulte pour connaître le moment de la mise en route de cette horloge, et particulièrement autour de P22 où les segments des photorécepteurs achèvent leur formation et où les connexions synaptiques ont atteint un degré important de maturité dans l'IPL. (Weidman and Kuwabara, 1968)

La poursuite de ces travaux à des âges plus précoces et plus tardifs chez les deux espèces pourra permettre de mieux connaître le déroulement de la mise en route de l'horloge rétinienne et, en le corrélant aux étapes de la maturation rétinienne, nous pourrons avoir une meilleure connaissance du rôle des différents types cellulaires et de l'organisation du réseau horloger.

Discussion & Perspectives

*Voir un monde dans un grain de sable,
Et un ciel dans une fleur sauvage,
Tenir l'infini dans la paume de ta main,
Et l'éternité dans une heure.*

William Blake

Figure 55 : L'œil d'Horus (ou œil Oudjat).

Stèle d'un musicien défunt représenté jouant de la harpe devant Horus (Stuc et peinture sur bois ; XIXe dynastie, vers 1290-1224 avant J.-C. ; Musée du Louvre, Paris ; Encyclopédie Universalis). La mythologie égyptienne raconte que le dieu-faucon Horus, fils d'Isis et Osiris, perdit un œil au cours d'un combat qui l'opposa à son oncle Seth. Sur les 6 morceaux d'œil dispersés dans le Nil par Seth suite à ce combat, le dieu Toth en repêcha 5, les assembla en supplantant au fragment manquant par magie et rendit à Horus un organe fonctionnel. L'œil d'Horus est un symbole de l'intégrité, la santé, la fécondité et la clairvoyance. D'innombrables représentations sur des bijoux, amulettes, gravures et peintures témoignent de l'importance de son pouvoir symbolique dans la vie d'un égyptien.

Le jeu des ressemblances. Si je vous demande de positionner sur ce dessin de cerveau humain en coupe médio-sagittale le thalamus, l'épiphyse, le corps calleux, l'hypothalamus et le tronc cérébral, vous êtes incontestablement capables de le faire. Mais si je vous propose de positionner ces mêmes structures sur le dessin de l'œil d'Horus... C'est pourtant ce que certains ésotéristes n'ont pas hésité à faire, le considérant tout d'abord comme une représentation antique du troisième œil puis, les connaissances évoluant, l'associant à la glande pinéale (pour sa fonction supposée de siège de l'âme et de la conscience, puis pour sa capacité de photoréception directe ou indirecte selon les espèces) et enfin à la partie centrale du cerveau (centre de contrôle, siège des perceptions sensorielles, ...). Corrigé de l'exercice : sourcil = corps calleux, pupille = thalamus, trait de khôl = épiphyse, larme (oblique) = tronc cérébral et tache de faucon (verticale) = hypothalamus.

I / Les modèles animaux et techniques utilisés

I.1 / Modèles animaux

I.1.A / Rat *Per1-Luc* vs souris PER2::LUC

Nous avons utilisé deux lignées de rongeurs transgéniques pour étudier l'horloge rétinienne : une lignée de rat *Per1-Luc* (dont la bioluminescence reflète l'expression du gène *Per1*) et une lignée de souris KI PER2::LUC (dont la bioluminescence reflète l'expression de la protéine PER2). L'utilisation conjointe de ces deux modèles a pour avantage de donner de la robustesse aux observations lorsqu'elles vont dans le même sens. En revanche, les deux modèles ne peuvent pas être comparés lorsque les observations divergent, parce que différents éléments peuvent être à l'origine de cette différence : l'espèce, le gène horloge, ou encore la construction génétique du transgène.

Sur l'ensemble des travaux réalisés, la souris PER2::LUC se révèle le modèle le plus facile à exploiter dans le cadre de la rétine parce que leurs oscillations de bioluminescence présentent de nombreux avantages :

- Elles sont extrêmement robustes : elles persistent très longtemps en culture, ce qui permet de mener des expériences sur le long terme, et notamment de réaliser des stimulations en cours d'enregistrement afin de comparer différents paramètres avant et après la stimulation.
- Elles ont une très grande amplitude : il est de ce fait possible de travailler sur des rétines divisées en deux moitiés, ce qui réduit le nombre d'animaux nécessaires aux expériences.
- Leur période endogène est peu dispersée : ceci permet d'étudier les variations de ce paramètre dans différentes conditions. Il faut cependant tenir compte du fait que cette période évolue au cours de la culture (en général dans le sens d'un allongement), probablement à cause de l'évolution progressive de la composition du milieu de culture.
- Elles sont très stables : leur tracé est aussi rigoureux que celui d'une fonction mathématique, ce qui rend l'analyse de leurs paramètres aisée et précise.

Au contraire, les oscillations enregistrées avec les rétines de rat *Per1-Luc* s'amortissent rapidement et sont instables (leur période varie de manière sensible d'un cycle à l'autre et leur tracé présente de nombreuses irrégularités). De ce fait, leur analyse est difficile et les moyennes des paramètres qui en résultent sont assorties d'une importante variabilité qui empêche de mettre en évidence des différences significatives. Ce modèle reste néanmoins précieux pour confirmer les observations réalisées chez la souris. Il peut également s'avérer utile dans le cadre des expériences qui visent à entraîner l'horloge rétinienne parce qu'il se laisse plus facilement "perturber", et permet ainsi de visualiser des effets qui sont moins évidents chez la souris PER2::LUC (je fais référence aux expériences d'entraînement par l'AMPC présentées dans la partie "**Résultats**"). Mais l'inconvénient est que, contrairement au modèle de souris PER2::LUC, les stimulations ne peuvent pas être réalisées en cours d'enregistrement (seulement en début de culture), ce qui empêche le contrôle de ce qu'il se passe pour l'horloge au moment de la stimulation (et notamment sa phase) et ne permet pas de comparaison des paramètres pré- et post-stimulation.

I.1.B / *Rev-Erbα* ?

Parmi les lignées luciférase disponibles pour l'étude des gènes horloge, il existe une souris transgénique *RevErbα-Luc* (en cours de caractérisation et donc encore non publiée). Nous avons procédé à des mises en

culture de rétines entières (n = 6) issues de ces animaux (selon le même protocole que pour les rétines issues des souris PER2::LUC) afin de déterminer si :

- *Rev-Erb α* est suffisamment exprimé dans la rétine pour qu'un signal de bioluminescence soit détectable
- *Rev-Erb α* oscille dans la rétine entière
- Ce modèle peut être utilisé pour l'étude de l'horloge rétinienne chez la souris en apportant des informations complémentaires à celles fournies par le modèle PER2::LUC, notamment parce que l'observation d'un seul gène horloge ne rend pas forcément toujours compte du fonctionnement de toute l'horloge.

Les enregistrements montrent que le transgène est exprimé à un niveau largement exploitable. Des oscillations de l'ordre du circadien sont détectables pour la moitié des échantillons, en accord avec des quantifications réalisées en DD par qPCR sur des rétines de rat, aussi bien *ex vivo* (Sandu *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2010; Tosini *et al.*, 2007a) qu'*in vitro* (Buonfiglio *et al.*, 2014), et confirment que *Rev-Erb α* fait partie de la machinerie moléculaire de l'horloge rétinienne, ou en constitue une sortie. L'amplitude de ces oscillations est cependant extrêmement faible (expliquant qu'elles n'apparaissent que pour une partie des échantillons), ce qui empêche toute analyse de leurs propriétés et fait de cette lignée transgénique un modèle inopportun pour l'étude de l'horloge rétinienne, en tout cas dans le contexte de la rétine entière.

Pour en savoir plus sur la place de *Rev-Erb α* dans la machinerie moléculaire de l'horloge rétinienne, nous avons mis en culture des rétines de souris issues du croisement entre la lignée PER2::LUC et une lignée invalidée pour *Rev-Erb α* . Les enregistrements de bioluminescence montrent qu'en aucun cas *Rev-Erb α* n'est indispensable aux oscillations de PER2. Leur analyse indique qu'il n'y a pas de différence de période des oscillations enregistrées avec ces animaux par rapport à celles enregistrées avec des animaux sauvages des mêmes fratries (p = 0,5 ; n = 8 dans chaque groupe). Le test de Bartlett d'homogénéité des variances indique également que la période endogène des rétines *Rev-Erb α ^{-/-}* n'est pas plus variable que celle des rétines *Rev-Erb α ^{+/+}* (p = 0,3). Ces données indiquent que *Rev-Erb α* n'a pas de rôle dans la détermination de la période endogène de l'horloge rétinienne, alors que sa délétion a pour conséquence un raccourcissement et une plus grande dispersion de la période de l'activité locomotrice (Preitner *et al.*, 2002). D'autres effets de sa délétion sur les paramètres des oscillations de PER2 n'ont pas pu être explorés ici mais peuvent néanmoins être envisagés, comme une modification de leur amplitude ou de leur robustesse, ou un déphasage en libre cours. Enfin, il reste également la possibilité que *Rev-Erb α* ait un rôle important dans la réponse de l'horloge rétinienne à l'entraînement par la lumière, comme c'est le cas pour le déphasage de l'activité locomotrice en réponse à des créneaux de lumière (Preitner *et al.*, 2002).

I.2 / Techniques mises en œuvre

I.2.A / La bioluminescence

Les lignées transgéniques dont nous disposons nous permettent de suivre directement les oscillations de l'horloge. Ceci constitue une évolution majeure pour l'étude des horloges puisque leur suivi indirect par le biais de sorties pose la difficulté de faire la part entre l'influence de l'horloge et celle d'éventuelles autres sources qui peuvent provoquer des phénomènes de masquage.

L'enregistrement de la bioluminescence avec le LumiCycle a pour principal avantage de permettre le suivi simultané d'un grand nombre d'échantillons sur le long terme. Le suivi longitudinal d'un même échantillon

avec une fréquence élevée de comptage, outre la diminution des animaux nécessaire à l'étude d'un rythme, permet de révéler plus facilement les rythmes que les techniques de qPCR ou de quantifications diverses. Il donne également accès à des informations plus précises sur les rythmes enregistrés (amplitude, période, persistance). En revanche, cette technique est focalisée sur un unique gène ou une unique protéine et ne permet pas de recueillir en parallèle des informations sur d'autres entités cellulaires. Enfin, elle ne donne pas d'indications sur la localisation intra-tissulaire des rythmes enregistrés. Pour cela, une technique complémentaire est actuellement en cours de développement au laboratoire : c'est un système d'enregistrement de la bioluminescence par caméra, appelé Luminoview (Olympus), qui associe une résolution spatiale à la résolution temporelle du suivi des rythmes.

I.2.B / L'analyse des données de bioluminescence

Nous avons développé une méthode d'analyse qui permet une mesure précise de la période des oscillations, à partir des données brutes. Cette méthode est efficace même sur des oscillations de faible amplitude et dont le tracé est bruité et irrégulier et donne accès à des indices de la qualité de l'ajustement par rapport aux données, mais aussi à l'erreur assortie à la période mesurée. Elle n'est en revanche pas efficace sur des oscillations dont la période varie trop dans l'intervalle de la fenêtre d'analyse, mais dans une telle situation seule une analyse de la période cycle par cycle pourrait aboutir.

Il sera utile de développer à l'avenir des méthodes d'analyse similaires pour l'amplitude, l'amortissement et les acrophases des oscillations afin d'en obtenir des mesures fines pour pouvoir mettre en évidence des effets subtils. L'amplitude moyenne sur plusieurs oscillations et l'amplitude de chaque cycle apportent des informations complémentaires, la première indique un comportement général et met en évidence plutôt des effets durables tandis que la deuxième informe sur la réponse immédiate à une stimulation par exemple. Le taux d'amortissement des oscillations informe sur la robustesse de l'horloge.

I.2.C / La culture

La culture est l'outil idéal pour l'étude des propriétés endogènes d'un tissu, puisqu'il n'y subit pas l'influence des autres tissus, et que les influences du milieu extérieur peuvent être contrôlées (dans la limite des connaissances actuelles). Il est évident que les observations effectuées *in vitro* ne reflètent pas forcément la réalité de ce qu'il se passe *in vivo* mais traduisent les potentialités du tissu livré à lui-même dans un contexte particulier (milieu de culture fourni, conditions de culture, ...). C'est dans ce cadre notamment qu'il y aura lieu de déterminer si le manque de réactivité à la lumière des rétines que nous avons étudiées est lié à leurs propriétés endogènes ou à un élément non maîtrisé des protocoles expérimentaux.

Le principal inconvénient de notre système expérimental est le fait que le milieu de culture ne peut pas être continuellement renouvelé, et a donc une composition qui évolue au fil du temps de culture. Les échantillons ne sont donc pas exposés à un milieu constant et contrôlé. Le maintien des échantillons peut se faire par un renouvellement régulier du milieu de culture, mais cet événement, qui implique une modification brutale des constituants chimiques avec lesquels le tissu est en contact, mais également une variation transitoire de la température à laquelle il est exposé et une exposition à de la lumière rouge, induit forcément des réponses cellulaires qui peuvent interférer avec l'horloge. Pour cette raison, il est prévu d'associer aux enregistrements avec le Luminoview un système de renouvellement permanent du milieu de culture.

I.2.D / La coupe au vibratome

L'extension de la technique de séparation horizontale par un vibratome à l'ensemble des 3 couches rétinienne est inédite et a permis de franchir un pas important quant à la question de la localisation tissulaire de l'horloge rétinienne. Elle fournit également un outil pour l'étude de ces couches en culture de manière générale. Sa difficulté réside dans le fait qu'elle ne peut que difficilement être standardisée, ce qui en fait une technique de préparation longue et qui n'aboutit pas à des populations complètement homogènes d'échantillons (en termes de pureté, de taille, d'intégrité). Pour ce qui est des couches GCL et PRL, il est possible d'obtenir des échantillons relativement purs, voire complètement purs pour une partie des préparations, mais pour ce qui est de l'INL c'est plus difficile. Comme l'INL et la GCL isolées expriment des rythmes qui ont des propriétés différentes de celles de la rétine entière et de la "double couche" GCL+INL, il est possible d'avoir la certitude qu'elles expriment leur comportement propre tout en ne connaissant pas exactement leur degré de pureté. En ce qui concerne la PRL, c'est la couche qui peut être obtenue avec le plus grand degré de pureté (du fait de l'importance de son épaisseur), comme l'indiquent les résultats de PCR. En revanche, son comportement en bioluminescence ne peut pas être utilisé comme un reflet de sa pureté dans la mesure où la "double couche" PRL+INL a le même comportement. Il serait néanmoins intéressant de réaliser une étude systématique de ces préparations par immunohistochimie car cela complèterait les informations de composition cellulaires réalisées par PCR en indiquant l'étendue de la contamination et leurs positionnements les plus fréquents (ce qui pourrait alors être pris en compte au moment de la préparation des échantillons pour la culture).

II / Localisation et couplage des oscillateurs rétiniens

II.1 / Localisation de l'horloge rétinienne

La technique d'isolement des couches rétiniennes au vibratome a permis d'apporter une réponse claire à la question de la localisation de l'horloge rétinienne chez le rongeur : chez la souris, nous avons mis en évidence que chacune des trois couches a une capacité oscillatoire endogène, mais chez le rat il subsiste un doute pour la PRL. Il reste à trancher entre une perte de leur capacité oscillatoire dans notre modèle pour des raisons inconnues (à moins que ce ne soit le système de comptage des photons qui ne soit pas assez sensible) et des oscillations induites par une trop grande contamination par d'autres types cellulaires dans le modèle généré par dégénérescence de la rétine interne par excitotoxicité (Tosini *et al.*, 2007b). Les données obtenues *ex vivo* par qPCR sur des PRL de rat vont dans le sens d'une perte de la rythmicité de la plupart des gènes horloge (dont *Per1*) en condition DD alors qu'elle est maintenue dans la rétine entière (Sandu *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2010). Bien que ces données ne soient pas suffisantes pour exclure tout fonctionnement de l'horloge dans la PRL de rat en condition DD, elles indiquent qu'il est vraisemblable que les oscillations de nos préparations aient une amplitude réduite (ce qui rend leur mise en évidence difficile) étant donné que les enregistrements sont réalisés en obscurité constante.

Chez la souris, bien que les trois couches isolées expriment des comportements identiques en bioluminescence (mêmes périodes et amplitudes équivalentes), il semble qu'elles n'aient pas toutes la même importance. En effet les PRL, bien que les préparations les plus riches en cellules, ont tendance à avoir les amplitudes les plus faibles. Il faudrait développer une méthode d'analyse précise de l'amplitude des oscillations de chacune des couches, relativement à leur richesse en cellules, pour pouvoir le démontrer et mettre en évidence la hiérarchie de la capacité oscillatoire des trois couches. Une telle stratégie analytique pourra également permettre d'évaluer dans quelle mesure les couches exercent un renforcement mutuel de leurs oscillations (comme cela semble être le cas entre l'INL et la GCL dans les préparations de type GCL+INL) ou non (comme cela semble être le cas entre l'INL et la PRL dans les préparations de type PRL+INL). En attendant, nous pouvons déjà mentionner que, parmi l'ensemble des essais effectués, seules 27% des préparations de PRL ont présenté des oscillations analysables contre 81% pour les INL et 55% pour les GCL. Ces données vont dans le même sens que l'étude qui a montré que la co-expression des gènes horloge dans des cellules individuelles existe dans une part importante de cellules de l'INL, dans une part un peu moins importante de cellules de la GCL et dans une part nulle de photorécepteurs (mais seuls des bâtonnets ont été testés) (Ruan *et al.*, 2006). En combinant ces observations avec le fait que le couplage semble inexistant entre la PRL et l'INL (alors qu'il est très fort entre la GCL et l'INL) et que la PRL apporte une contribution mineure à l'établissement de la période dans la rétine entière par rapport aux deux autres couches, il semble sensé d'avancer que ce sont les couches internes de la rétine (GCL et INL) qui apportent l'essentiel de la contribution à l'horloge rétinienne. Le fait que les PRL de souris expriment une rythmicité moindre par rapport aux autres couches isolées (INL et GCL) peut également expliquer pourquoi nous n'avons pas pu observer d'oscillations avec les PRL de rat. Une hypothèse pour expliquer la faible contribution de la PRL à l'horloge rétinienne pourrait être le fait que seuls les cônes, qui représentent une très faible proportion des photorécepteurs chez le rat et la souris, apportent une contribution. Des données montrant une expression des protéines horloge préférentiellement dans les photorécepteurs de type cônes chez la souris va dans ce sens (Liu *et al.*, 2012).

L'utilisation du Luminoview pourra nous permettre d'avancer sur cette question de la contribution de chaque couche à l'horloge rétinienne en visualisant l'intensité de la bioluminescence émise par chacune lorsqu'elles sont réunies. La dimension spatiale qu'apporte cet appareil nous permettra également de

savoir si les rythmes sont alors en phase dans les trois couches ou si, comme dans les SCN, la rythmicité se propage par vagues.

L'étape suivante concernant la localisation de l'horloge rétinienne sera de comprendre quels types cellulaires y contribuent dans chaque couche, et quel est le rôle de chacun. Dans ce but, les mêmes modèles de couches isolées, combinaisons de couches et cellules dissociées pourront être enregistrés avec le Luminoview, en association avec l'identification des différents types cellulaires. Cet outil, associé à la pharmacologie, pourra également fournir des informations sur la communication entre les types cellulaires et les couches.

II.2 / Couplage des oscillateurs réiniens

Ainsi que je l'ai déjà mentionné dans le paragraphe précédent, nous avons montré que les oscillateurs réiniens sont couplés. Ce couplage se traduit par une propriété tout à fait particulière qui est une diminution de la période lorsque le degré de couplage augmente. Il a été montré récemment que, lorsque les cellules des SCN sont découplées pharmacologiquement ou mécaniquement, des sous-régions expriment des périodes variables, allant d'environ 23 h à environ 26 h, selon un gradient médio-latéral (de la coquille vers le cœur) (Koinuma *et al.*, 2013). Mais la rétine a cela de particulier que ses trois couches expriment une période élevée à l'isolement, et non une gamme de périodes, et que la période plus courte du tissu entier semble une propriété propre de ce réseau.

Avec le modèle murin PER2::LUC, nous avons pu montrer que le couplage des couches réiniennes est asymétrique : la GCL et l'INL sont fortement couplées, et ce couplage requiert l'intégrité de l'IPL, tandis que la PRL et l'INL ont un couplage qui semble inexistant en-dehors du contexte de la rétine entière.

Nous avons cherché à savoir, parmi les principaux neurotransmetteurs et neuromodulateurs de la rétine, quelles molécules pouvaient constituer un vecteur de ce couplage. Parmi le GABA, la glycine, le glutamate et la dopamine, nous n'avons pu identifier aucune molécule (ou type cellulaire) particulièrement impliquée. Cependant, la glycine et la strychnine sont capables de moduler très légèrement la période de la rétine entière des souris PER2::LUC, ce qui laisse ouverte la possibilité que la signalisation glycinergique ait un rôle dans ces couplages. Nous avons observé que l'inhibition des caséines kinases 1δ et 1ε entraîne une forte augmentation de la période des oscillations de la rétine entière, ce qui laisse envisager que le couplage réinien exerce son effet sur la période de l'horloge via la modulation des équilibres de phosphorylation / déphosphorylation des protéines horloge exercée par ces enzymes.

Parmi les candidats encore en liste figurent la mélatonine ou encore les cellules de Müller : la mélatonine au même titre que l'a été la dopamine dans l'**Article 2**, et les cellules de Müller parce qu'en tant que cellules traversant l'intégralité de l'épaisseur du tissu et contactant tous les autres types cellulaires, elles sont potentiellement capables de distribuer un message de couplage unique.

II.2.A / La mélatonine

La souche de souris C57Bl/6J avec laquelle nous travaillons est connue pour être déficiente en mélatonine (Goto *et al.*, 1989), y compris dans la rétine (Tosini and Menaker, 1998a), du fait de plusieurs mutations qui touchent leur gène *Aanat* (Roseboom *et al.*, 1998) aussi bien que *Hiomt* (Kasahara *et al.*, 2010). Cependant, les données ne sont pas si tranchées à ce sujet (y compris au sujet de la rythmicité de la mélatonine (Conti and Maestroni, 1996; Vivien-Roels *et al.*, 1998)) et il est maintenant admis que ces souris peuvent produire de la

mélatonine dans certains tissus (Conti *et al.*, 2000), et en ont un taux circulant seulement réduit (Gómez-Corvera *et al.*, 2009). Ceci s'explique par le fait que l'enzyme AANAT n'a pas l'exclusivité de la capacité à synthétiser le précurseur de la mélatonine (Slominski *et al.*, 2003) mais aussi par l'existence d'un épissage alternatif de l'ARNm *Aanat*, qui permet la production d'une enzyme fonctionnelle dans les tissus où cet épissage a lieu (Gómez-Corvera *et al.*, 2009). Cependant, aucune publication ne propose de stratégie alternative pour pallier aux mutations du gène *Hiomt* et expliquer les capacités différentielles de production de la mélatonine entre les différentes souches de souris dites déficientes et entre les différents tissus chez la souris C57Bl/6J.

En-dehors d'une publication qui montre la présence d'une faible quantité de mélatonine dans la rétine de ces souris (Doyle *et al.*, 2002a), il n'y a pas de données récentes y rapportant une éventuelle synthèse de mélatonine. Aussi nous avons exposé des rétines de souris PER2::LUC à 50 µM de mélatonine présente dans leur milieu de culture et comparé la période de leurs oscillations à celle de rétines contrôles, mais nous n'avons vu aucune différence de période entre les deux groupes ($p = 0,4$; $n = 8$ dans chaque groupe).

L'exposition des rétines de souris de la souche C57Bl/6J à la mélatonine n'affectant pas la période de leurs oscillations, il faudrait utiliser des souris issues du croisement de la lignée PER2::LUC avec une souche connue pour produire de la mélatonine dans la rétine pour répondre à la question du rôle de la mélatonine dans le couplage des oscillateurs rétiniens.

II.2.B / Les cellules de Müller

Pour tester l'implication des cellules de Müller dans le couplage des couches rétinienne, nous avons réalisé quelques tests préliminaires en exposant des rétines de souris PER2::LUC, à des concentrations de 100 µM, 500 µM et 1 mM d'acide L-α-aminoadipique (L-AAA), un analogue gliotoxique du glutamate qui inhibe le transporteur et certaines enzymes du métabolisme du glutamate (McBean, 1994). Parmi les neurones et les cellules gliales de la rétine murine, le D,L-AAA fut initialement décrit comme affectant spécifiquement des cellules de Müller (Olney *et al.*, 1971), et il fut plus tard démontré que c'est l'énantiomère L qui est le plus toxique (Olney *et al.*, 1980).

Nous avons observé un effet graduel du L-AAA sur les oscillations, allant d'une absence d'effet à la plus faible dose à une perte complète des oscillations accompagnée d'une chute brutale du niveau d'activité à la plus forte concentration. La concentration intermédiaire, quand à elle, provoque également une perte des oscillations et du niveau d'activité, un peu plus tardivement mais suffisamment tôt pour que l'analyse de la période ne soit pas possible. Le renouvellement du milieu de culture ne permet pratiquement pas de récupération du niveau d'activité ou des oscillations.

L'utilisation de cette gliotoxine pose manifestement le problème d'une toxicité généralisée qui dépend de la concentration utilisée. Avant de pousser plus loin les investigations sur le rôle des cellules de Müller pour l'horloge rétinienne avec cette stratégie, il est nécessaire de caractériser les effets du L-AAA sur les différentes populations de cellules rétinienne. La littérature est difficile à exploiter sur cette question du fait de la diversité des concentrations, modes d'administration, protocoles expérimentaux, espèces et tissus utilisés et des paramètres observés. Sachant que le L-AAA est effectivement aussi neurotoxique et que cela dépend de l'espèce, la concentration et le temps d'exposition (Casper and Reif-Lehrer, 1983; Jablonski and Iannaccone, 2000; Szamier *et al.*, 1981), il s'agira de trouver un équilibre optimal entre ces critères. Il faudra donc envisager de ne pas maintenir la toxine dans le milieu de culture mais plutôt d'y exposer les rétines durant un temps limité, en veillant à ce que ce temps soit dosé de manière à ne pas permettre une récupération des cellules de Müller avant la fin des enregistrements (Karlsen *et al.*, 1982; Szamier *et al.*, 1981).

Enfin, il serait peut-être préférable de travailler avec le mélange racémique, qui a une gliotoxicité moindre, mais également une neurotoxicité moindre (Casper and Reif-Lehrer, 1983; Olney *et al.*, 1980), mais il faudra alors prendre en compte le fait que l'énantiomère D est capable d'activer les neurones (ce qui se traduit par une augmentation du calcium intracellulaire) (Wakakura and Yamamoto, 1992).

Nous pourrions également adresser la question du rôle des cellules de Müller dans la rythmicité et la période de la rétine en cultivant de cellules rétinienne dissociées en présence et en absence de sérum (ce qui permet ou non la survie de cette population (Betz and Müller, 1982)), ou au contraire en enregistrant des cellules de Müller pures (Hicks and Courtois, 1990).

II.2.C / Les jonctions communicantes

Grâce à des cultures de cellules dissociées, nous avons montré l'existence d'un couplage au niveau cellulaire également, qui met en jeu au moins en partie les jonctions communicantes. L'utilisation des jonctions communicantes pour assurer la synchronie des cellules ainsi mises en réseau est sensée à plusieurs titres. Le premier est le fait que les jonctions communicantes sont très largement présentes dans la rétine, unissant les cellules d'un même type mais également certaines cellules de types différents entre elles, bien que les degrés de couplages soient variables d'un type cellulaire à l'autre (Völgyi *et al.*, 2013). Le second est le fait que la perméabilité des jonctions communicantes qui unissent les cônes et les bâtonnets suit un rythme circadien (Ribelayga and Mangel, 2010; Ribelayga *et al.*, 2008) et constitue donc une voie de transmission rythmique de signaux de communication qui pourrait éventuellement exister entre d'autres types cellulaires également.

Cette voie de communication pourrait être associée à l'AMPc à plusieurs niveaux (notamment en ce qui concerne les photorécepteurs). D'une part la voie de l'AMPc est mise en jeu par les signalisations dopaminergiques et adénoenergiques qui contrôlent l'ouverture des canaux par le degré de phosphorylation des connexines (Li *et al.*, 2013), d'autre part l'AMPc elle-même pourrait constituer un signal de couplage en passant d'une cellule à l'autre par les jonctions communicantes. Deux arguments viennent justifier cette hypothèse : le premier est le fait que le taux d'AMPc est élevé la nuit dans la rétine (Fukuhara *et al.*, 2004), au moment où les jonctions communicantes sont ouvertes entre les photorécepteurs (Ribelayga *et al.*, 2008) et le second est le fait que l'AMPc constitue un signal de couplage crucial dans les SCN (O'Neill and Reddy, 2012).

II.2.D / L'AMPc

Dans les SCN, plus importante encore que son rôle dans l'entraînement est sa place dans la construction même de l'horloge (Wang and Zhou, 2010) par sa participation au contrôle de l'amplitude, de la phase et de la période de l'horloge (O'Neill *et al.*, 2008). En constituant tout à la fois une sortie et une entrée de l'horloge, l'AMPc renforce et maintient les oscillations dans les cellules, mais également entre les cellules : son taux participe à la régulation du taux de décharge des neurones et son induction par les voies de signalisation paracrine des SCN en fait un élément de couplage des cellules oscillantes (O'Neill and Reddy, 2012).

Dans la rétine, un tel rôle peut également être envisagé, que l'AMPc soit mobilisée par des voies de signalisation ou par le flux des jonctions communicantes. Nous avons donc réalisé quelques expériences visant à moduler chroniquement le taux d'AMPc, soit en l'élevant soit en l'abaissant, sur des rétines de rat *Per1-Luc* (ces expériences ont été réalisées par Nguyen-Vy Vo au cours de son stage de Master) et de souris *PER2::LUC*. Chez le rat, l'exposition chronique des rétines au MDL-12,330A (MDL, un inhibiteur de l'AC) à

2,5 μM abolit les oscillations alors que le niveau d'activité des échantillons reste élevé et que le renouvellement du milieu de culture permet un retour des oscillations à la normale. Chez la souris les oscillations sont également abolies, ou tout du moins très fortement réduites, mais il faut entre 3 et 11 jours pour ce résultat soit effectif, ce qui suggère encore une fois que le réseau horloger de la rétine est plus robuste chez le modèle de souris que chez le modèle de rat. Cet effet montre à quel point la présence d'AMPC est cruciale pour le fonctionnement de l'horloge, tout comme cela a été montré dans les SCN de souris PER2::LUC (O'Neill *et al.*, 2008). A l'inverse, l'exposition des rétines à de la forskoline (10 μM) de manière chronique a pour effet d'augmenter fortement l'amplitude des oscillations avec les deux modèles (rat : $p = 0,02$; $n = 4$ pour le groupe contrôle, 8 pour le groupe traité ; souris : voir la **Figure 3** de l'**Article 2** p. 93), un effet en faveur d'une augmentation possible du couplage entre les cellules oscillantes.

Pour déterminer si c'est la présence d'AMPC ou son rythme qui est important, nous avons maintenu pour les échantillons de rat un niveau élevé et arythmique d'AMPC en associant à la forskoline un inhibiteur des phosphodiésterases, l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), à deux couples de concentrations : forskoline 10 μM – IBMX 100 μM et forskoline 20 μM – IBMX 500 μM . Le couple 10 – 100 μM entraîne à nouveau une forte augmentation de l'amplitude des oscillations. En revanche, le couple 20 – 500 μM abolit les oscillations, qui ne redémarrent pas suite au renouvellement du milieu de culture. L'activité globale de bioluminescence de ces échantillons étant fortement abaissée durant le traitement et ne récupérant pas après le traitement, il faut s'interroger sur la probabilité d'une large mort cellulaire dans ces conditions, et il sera nécessaire de le contrôler avant de pouvoir conclure sur la perte des oscillations. Les résultats du traitement chronique avec la forskoline seule et avec la combinaison forskoline 10 μM – IBMX 100 μM suggèrent que la présence d'AMPC plus que sa rythmicité soit essentielle au fonctionnement de l'horloge rétinienne, mais il faudra vérifier les taux d'AMPC au long de la stimulation chronique pour s'en assurer. Si on envisage l'hypothèse d'une transmission de l'AMPC par les jonctions communicantes associée à une perméabilité rythmique généralisée de ces jonctions, la rythmicité du taux d'AMPC n'est finalement pas indispensable. Ceci reste bien entendu à vérifier.

Il est vraisemblable que l'AMPC soit, comme dans les SCN, tout à la fois une entrée et une sortie de l'horloge. La rythmicité de l'AMPC dans la rétine en conditions constantes et le fait que l'expression de l'AC1 soit rythmique grâce à une séquence "boîte E" (Fukuhara *et al.*, 2004) font de l'AMPC une sortie directe de l'horloge, et nos résultats préliminaires avec des agents pharmacologiques qui modulent le taux d'AMPC en font également une entrée probable. Ces données font de l'AMPC un candidat de choix pour le couplage des cellules rétiniennes oscillantes.

III / Entraînement de l'horloge rétinienne

III.1 / La lumière

Grâce à un faisceau d'indices, nous avons pu mettre en évidence un effet d'entraînement de la lumière sur l'horloge rétinienne du rat et de la souris, mais les effets observés sont toujours très discrets. Pourtant, les premières études sur l'horloge rétinienne avaient montré un effet très fort d'entraînement par la lumière (Tosini and Menaker, 1996, 1998a). Mais cet effet était observé par l'intermédiaire d'une sortie de l'horloge, la sécrétion de mélatonine. Afin d'éviter des interférences avec un éventuel effet de masquage, il vaut mieux dans la mesure du possible suivre directement la réponse de l'horloge. C'est ce que nous avons fait, mais les résultats que nous avons obtenus (et que (Ruan *et al.*, 2008) ont obtenus également) nous amènent à remettre en question nos différentes approches expérimentales, d'autant qu'avec une stimulation par la forskoline nous avons pu obtenir un déphasage de 4 h chez la souris, ce qui indique que l'horloge rétinienne est capable d'un large décalage de phase dans nos conditions expérimentales. D'autres travaux suggèrent cependant un effet direct d'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière chez le rat (Namihira *et al.*, 1999, 2001) et chez la souris (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2013; Yujnovsky *et al.*, 2006) *in vivo* : ce sont des études qui montrent que l'administration d'un créneau de lumière induit l'expression de gènes horloge (*Per1* et *Per2*, mais également *Clock* et *Bmal1* (Namihira *et al.*, 1999)) dans un délai trop court pour envisager un effet qui passerait d'abord par l'entraînement des SCN (30 – 60 min après le début de la stimulation). Parmi ces études, celles qui ont testé plusieurs points horaires montrent également que l'induction des gènes horloge dépend du moment où la lumière est administrée (Namihira *et al.*, 1999, 2001), ce qui est en accord avec les effets différentiels de la lumière que nous avons observés. Etant donné que le tissu en culture est dans un contexte très différent des conditions *in vivo*, il s'agira de déterminer si nos explants rétiniens sont pleinement capables de répondre à la lumière dans nos conditions expérimentales et d'étudier les conditions de leur entraînement par la lumière et, éventuellement, par les SCN. Comme la rétine est directement exposée au facteur qui l'entraîne (la lumière), il est envisageable que son horloge ne se déphase que suite à des stimuli de longue durée, ou d'une certaine composition spectrale (ou qui rassemblent plusieurs critères) dans le but d'éviter une trop grande capacité de réponse face des stimuli inopportuns. Une toute récente étude abonde justement dans ce sens, en montrant que des stimuli de 3 h à une longueur d'onde de 475 nm induisent des déphasages de l'horloge rétinienne de souris PER2::LUC allant jusqu'à plusieurs heures (Buhr and Van Gelder, 2014). Pour de prochaines expériences il semble donc essentiel de s'inspirer de ce protocole, tout en poursuivant les investigations en balayant les autres longueurs d'onde du spectre visible.

III.2 / L'AMPC

Chez le rat comme chez la souris, nous avons pu mettre en évidence un effet d'entraînement de l'horloge rétinienne par la forskoline (sous la forme de décalages de phase) en adoptant une stratégie de stimulation aiguë. Certains effets observés suite à des stimulations chroniques (déjà abordées dans le **paragraphe II.2.D /**) vont dans ce sens également : la présence de forskoline et d'IBMX (10 μ M – 100 μ M) entraîne un retard de phase de l'horloge de la rétine de rat d'un peu plus de 3 h ($p = 0,002$; $n = 4$ pour le groupe contrôle, 3 pour le groupe traité), alors que le traitement ne modifie pas la période des oscillations.

Ce rôle de l'AMPC dans les voies d'entraînement restera à étudier plus en détail, dans un premier temps en caractérisant ses effets en fonction du moment du cycle de l'horloge, puis en déterminant de quel élément

synchroniseur elle est le messenger (la lumière ?) et par quelle(s) voie(s) elle atteint la machinerie horlogère. Dans les SCN, l'AMPc a un rôle de modulateur des voies qui mènent la signalisation glutamatergique à induire l'expression de *Per1*, en favorisant l'avance de phase qui accompagne un créneau de lumière appliqué en début de nuit (Tischkau *et al.*, 2000), tandis que le GMPc a l'effet inverse en permettant le retard de phase qui accompagne un créneau de lumière appliqué en fin de nuit (Weber *et al.*, 1995). Un tel rôle de restriction d'un événement à un moment du cycle de l'horloge a été montré dans la rétine pour la synthèse de mélatonine (Fukuhara *et al.*, 2004) : l'horloge rétinienne contrôle le rythme de synthèse de la mélatonine en contrôlant l'expression de l'AANAT via une séquence "boîte E". Mais l'expression et l'activité de l'AANAT sont également sous le contrôle de l'AMPc (via une séquence CRE et via la PKA). Comme le taux d'AMPc dépend de l'horloge (l'expression de l'AC1 est contrôlée par l'horloge) et de l'obscurité (qui stimule l'AC), la synthèse de mélatonine est sous le contrôle de l'horloge et de l'environnement, mais l'environnement a des influences variables selon le moment du cycle de l'horloge : en fin de jour / début de nuit, l'obscurité renforce la production de mélatonine par l'activation de l'AC, mais l'obscurité ne peut pas induire la production de mélatonine en fin de nuit / début de jour parce que l'expression de l'AC est alors minimale. Sachant que le taux d'AMPc est rythmique dans la rétine et que certains gènes horloge possèdent une séquence CRE dans leur promoteur (Travnickova-Bendova *et al.*, 2002), un tel mécanisme pourrait être envisagé pour l'entraînement de l'horloge par l'intermédiaire de l'AMPc.

La forskoline raccourcit également la période des oscillations de l'ordre d'1 h chez nos deux modèles, chez la souris lorsqu'elle est appliquée de manière chronique et chez le rat lorsqu'elle est présente transitoirement. Ainsi, l'AMPc a la capacité d'influer sur tous les paramètres des oscillations des rétines de souris PER2::LUC comme des rats *Per1-Luc*, comme dans les SCN (O'Neill *et al.*, 2008). Ceci laisse entrevoir un rôle central de l'AMPc dans le mécanisme de l'horloge rétinienne, mais nos données sont trop encore partielles pour saisir entièrement la place de l'AMPc dans l'horloge rétinienne et il restera à faire la part entre son rôle dans l'entraînement du mécanisme et son rôle comme acteur du mécanisme.

IV / Conclusion et perspectives

Ces travaux ont permis de développer des outils d'étude de l'horloge rétinienne en bioluminescence chez deux espèces de rongeur (le rat et la souris). Ces outils consistent en la culture de différentes préparations rétiniennes (rétines entières, couches rétiniennes isolées) et en une méthode d'analyse de la période des oscillations enregistrées.

Avec ces outils, nous avons pu montrer que l'horloge rétinienne est composée (au moins chez la souris) de trois oscillateurs autonomes (localisés dans chacune des trois couches nucléaires) mais fortement interconnectés. Le couplage de ces oscillateurs détermine la cinétique de l'horloge rétinienne et fait intervenir une communication asymétrique entre les couches. Nous n'avons pas pu révéler le(s) message(s) qui véhicule(nt) ce couplage, mais nous avons pu confirmer qu'il ne consiste de manière cruciale en aucun des principaux neurotransmetteurs rétiniens (GABA, glutamate, glycine), ni en la dopamine.

Nous proposons de poursuivre ces investigations en utilisant un nouvel outil de suivi de la bioluminescence, le Luminoview. Des enregistrements de cellules dissociées, de couches isolées et de rétines entières, couplés à des méthodes d'identification des types cellulaires, permettront tout à la fois de connaître les types cellulaires qui génèrent les oscillations de bioluminescence et de caractériser le rôle de chacun au sein du tissu.

Dans ce même but, nous estimons que la poursuite du travail sur les rétines en cours de maturation pourra apporter des indices sur les types cellulaires essentiels à l'horloge rétinienne, sur le réseau de communication qu'elles établissent, ainsi que sur les caractéristiques de couplage qui distinguent la rétine du rat de celle de la souris.

Nous recommandons également la poursuite du travail de pharmacologie visant à identifier les messages de couplage des oscillateurs, en testant l'hypothèse de la mélatonine (chez des souris connues pour en produire dans la rétine), mais aussi en se penchant sur d'autres candidats comme des neuropeptides et des neuromodulateurs (NO, adénosine, endocannabinoïdes).

La question du rôle des cellules de Müller dans ce couplage est également intéressante et n'a pratiquement pas pu être investiguée dans ces travaux, mais des outils peuvent être développés pour cela (l'utilisation de la gliotoxine AAA dans des conditions maîtrisées, la culture de cellules rétiniennes dissociées en présence et en absence de sérum).

Nous avons également commencé à investiguer les propriétés d'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière et par l'AMPc. Nous avons pu mettre en évidence quelques effets d'entraînement, mais les méthodes d'étude des effets de la lumière devront encore être améliorées, notamment en commençant par vérifier la capacité de réponse du tissu en culture à la lumière (en mesurant l'influence de la lumière sur le taux de GMPc ou sur l'expression de *c-fos* par exemple, afin de vérifier que la transduction du signal lumineux a bien lieu). Le cas échéant il faudra établir de nouvelles stratégies expérimentales pour étudier l'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière, comme des déphasages d'un cycle LD appliqué sur les tissus en culture, ou encore l'utilisation d'une gamme restreinte de longueurs d'ondes. Une fois au point, ces stratégies pourront être utilisées pour déterminer quelles sont les voies d'entrée du signal lumineux et de transmission jusqu'à l'horloge. Les couches rétiniennes isolées comprenant des cellules photosensibles (GCL et PRL) pourront être utilisées dans ce but, ou encore différentes lignées de souris invalidées pour les différents photopigments.

Ces études sur l'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière pourront être complétées par des investigations sur l'influence des SCN, notamment en testant les effets de l'histamine sur les oscillations rétiniennes.

En ce qui concerne l'AMPC, un vaste sujet d'étude s'ouvre pour caractériser pleinement la place de ce second messenger dans l'entraînement de l'horloge, mais aussi comme sortie, et pourquoi pas comme élément intégral du mécanisme horloger. Le rôle d'autres voies de signalisation intracellulaires dans l'entraînement de l'horloge, comme celles du GMPc et des MAP kinases, pourra être envisagé.

Afin d'avoir un meilleur reflet du fonctionnement de l'horloge rétinienne dans sa globalité et du rôle spécifique de chaque gène horloge, nous avons vérifié si la souris *RevErb α -Luc* pouvait constituer un modèle supplémentaire d'étude de l'horloge rétinienne. Nous savons dorénavant que ce n'est pas le cas, mais d'autres lignées de souris (*Per1-Luc* (Wilsbacher *et al.*, 2002), *Cry1-Luc* (Maywood *et al.*, 2013)) et de rat (*Per2-Luc* (He *et al.*, 2007)) pourraient être testées. L'utilisation combinée de ces modèles apporterait des éclairages sur la manière dont le mécanisme horloger fonctionne dans la rétine.

Nous proposons également de nous pencher notamment sur les places des gènes *Rev-Erb* et *Ror*, qui ont été assez peu questionnées à ce jour.

Bibliographie

A

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., and Block, G.D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 350–356.
- Abraham, U., Prior, J.L., Granados-Fuentes, D., Piwnica-Worms, D.R., and Herzog, E.D. (2005). Independent circadian oscillations of *Period1* in specific brain areas in vivo and in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 8620–8626.
- Agez, L., Laurent, V., Pévet, P., Masson-Pévet, M., and Gauer, F. (2007). Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* *144*, 522–530.
- Ait-Hmyed, O., Felder-Schmittbuhl, M.-P., Garcia-Garrido, M., Beck, S., Seide, C., Sothilingam, V., Tanimoto, N., Seeliger, M., Bennis, M., and Hicks, D. (2013). Mice lacking *Period 1* and *Period 2* circadian clock genes exhibit blue cone photoreceptor defects. *Eur. J. Neurosci.* *37*, 1048–1060.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., and 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.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G., and Lee, C.C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* *91*, 1055–1064.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., and Meijer, J.H. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol. CB* *15*, 886–893.
- Alcantara-Contreras, S., Baba, K., and Tosini, G. (2011). Removal of melatonin receptor type 1 increases intraocular pressure and retinal ganglion cells death in the mouse. *Neurosci. Lett.* *494*, 61–64.
- Anafi, R.C., Lee, Y., Sato, T.K., Venkataraman, A., Ramanathan, C., Kavakli, I.H., Hughes, M.E., Baggs, J.E., Growe, J., Liu, A.C., *et al.* (2014). Machine learning helps identify *CHRONO* as a circadian clock component. *PLoS Biol.* *12*, e1001840.
- 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., and Takahashi, J.S. (1997). Functional identification of the mouse circadian *Clock* gene by transgenic BAC rescue. *Cell* *89*, 655–667.
- Aschoff, J. (1954). Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* *41*, 49–56.
- Aschoff, J. (1965). Circadian Rhythms in Man: A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. *Science* *148*, 1427–1432.
- Aschoff, J.V., and Wever, R. (1962). Spontanperiodik des Menschen bei Ausschluß aller Zeitgeber. *Naturwissenschaften* *49*, 337–342.

B

- Baba, K., Pozdeyev, N., Mazzoni, F., Contreras-Alcantara, S., Liu, C., Kasamatsu, M., Martinez-Merlos, T., Strettoi, E., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2009). Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15043–15048.
- Baba, K., Sengupta, A., Tosini, M., Contreras-Alcantara, S., and Tosini, G. (2010). Circadian regulation of the *PERIOD 2::LUCIFERASE* bioluminescence rhythm in the mouse retinal pigment epithelium-choroid. *Mol. Vis.* *16*, 2605–2611.
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* *93*, 929–937.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schütz, G., and Schibler, U. (2000a). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* *289*, 2344–2347.
- Balsalobre, A., Marcacci, L., and Schibler, U. (2000b). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr. Biol. CB* *10*, 1291–1294.
- Bargiello, T.A., and Young, M.W. (1984). Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 2142–2146.

- Barnard, A.R., Hattar, S., Hankins, M.W., and Lucas, R.J. (2006). Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Curr. Biol.* *16*, 389–395.
- Barnes, J.W., Tischkau, S.A., Barnes, J.A., Mitchell, J.W., Burgoon, P.W., Hickok, J.R., and Gillette, M.U. (2003). Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science* *302*, 439–442.
- Bear, M.F., Connors, B.W., and Paradiso, M.A. (2007). *Neurosciences: à la découverte du cerveau* (Paris: Éditions Pradel).
- Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* *295*, 1070–1073.
- Betz, H., and Müller, U. (1982). Culture of chick embryo neural retina in serum-free medium. Expression of cholinergic proteins. *Exp. Cell Res.* *138*, 297–302.
- Bobu, C., and Hicks, D. (2009). Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 3495–3502.
- Boos, R., Schneider, H., and Wässle, H. (1993). Voltage- and transmitter-gated currents of all-amacrine cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *13*, 2874–2888.
- Breuninger, T., Puller, C., Haverkamp, S., and Euler, T. (2011). Chromatic bipolar cell pathways in the mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 6504–6517.
- Buhr, E.D., and Van Gelder, R.N. (2014). Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., and Bradfield, C.A. (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* *103*, 1009–1017.
- Bünning, E. (1932). Über die Erbllichkeit der Tagesperiodizität bei den Phaseolus Blättern. *Jahrb. Für Wiss. Bot.* *77*, 283–320.
- Bünning, E. (1935). Zur Kenntnis der erblichen Tagesperiodizität bei den primarblättern von Phaseolus multiflorus. *Jahrb. Für Wiss. Bot.* *81*, 411–418.
- Buonfiglio, D.C., Malan, A., Sandu, C., Jaeger, C., Cipolla-Neto, J., Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M.-P. (2014). Rat retina shows robust circadian expression of clock and clock output genes in explant culture. *Mol. Vis.* *20*, 742–752.

C

- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z., and Keesler, G.A. (2001). Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett.* *489*, 159–165.
- Cameron, M.A., Barnard, A.R., Hut, R.A., Bonnefont, X., van der Horst, G.T.J., Hankins, M.W., and Lucas, R.J. (2008). Electroretinography of wild-type and Cry mutant mice reveals circadian tuning of photopic and mesopic retinal responses. *J. Biol. Rhythms* *23*, 489–501.
- Cameron, M.A., Pozdeyev, N., Vugler, A.A., Cooper, H., Iuvone, P.M., and Lucas, R.J. (2009). Light regulation of retinal dopamine that is independent of melanopsin phototransduction. *Eur. J. Neurosci.* *29*, 761–767.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J.K., DeLamar, J.F., and Becker-André, M. (1994). RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *8*, 757–770.
- Casper, D.S., and Reif-Lehrer, L. (1983). Effects of alpha-amino adipate isomers on the morphology of the isolated chick embryo retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *24*, 1480–1488.
- Cassone, V.M., Roberts, M.H., and Moore, R.Y. (1987). Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci. Lett.* *81*, 29–34.
- Chen, W., and Baler, R. (2000). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *81*, 43–50.
- Conti, A., and Maestroni, G.J. (1996). HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. *J. Pineal Res.* *20*, 138–144.
- Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., and Maestroni, G.J.M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J. Pineal Res.* *28*, 193–202.

- La Cour, M., and Ehinger, B. (2005). The retina. In *The Biology of the Eye*, (Elsevier), pp. 195–252.
- Cui, J., and Pan, Z.-H. (2008). Two types of cone bipolar cells express voltage-gated Na⁺ channels in the rat retina. *Vis. Neurosci.* *25*, 635–645.
- D**
- Daan, S. (2010). A history of chronobiological concepts. In *The Circadian Clock*, (Albrecht, Urs), pp. 1–35.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., and Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* *14*, 2950–2961.
- Dardente, H. (2008). [Synchronization and genetic redundancy in circadian clocks]. *Médecine Sci. MS* *24*, 270–276.
- Dardente, H., and Cermakian, N. (2005). [How many pieces to build a circadian clock?]. *Médecine Sci. MS* *21*, 66–72.
- Dardente, H., and Cermakian, N. (2007). Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol. Int.* *24*, 195–213.
- Darwin, C., and Darwin, F. (1880). *The Power of Movement in Plants* (London: John Murray).
- Davenport, C.M., Detwiler, P.B., and Dacey, D.M. (2007). Functional polarity of dendrites and axons of primate A1 amacrine cells. *Vis. Neurosci.* *24*, 449–457.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (2007a). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat. Neurosci.* *10*, 543–545.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (2007b). Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr. Biol. CB* *17*, R538–539.
- Dedek, K., Breuninger, T., de Sevilla Müller, L.P., Maxeiner, S., Schultz, K., Janssen-Bienhold, U., Willecke, K., Euler, T., and Weiler, R. (2009). A novel type of interplexiform amacrine cell in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* *30*, 217–228.
- Dey, J., Carr, A.-J.F., Cagampang, F.R.A., Semikhodskii, A.S., Loudon, A.S.I., Hastings, M.H., and Maywood, E.S. (2005). The tau mutation in the Syrian hamster differentially reprograms the circadian clock in the SCN and peripheral tissues. *J. Biol. Rhythms* *20*, 99–110.
- Dibner, C., Sage, D., Unser, M., Bauer, C., d' Eysmond, T., Naef, F., and Schibler, U. (2009). Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO J.* *28*, 123–134.
- Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 517–549.
- Dinet, V., and Korf, H.-W. (2007). Impact of melatonin receptors on pCREB and clock-gene protein levels in the murine retina. *Cell Tissue Res.* *330*, 29–34.
- Dinet, V., Ansari, N., Torres-Farfan, C., and Korf, H.-W. (2007). Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.* *42*, 83–91.
- Dkhissi-Benyahya, O., Rieux, C., Hut, R.A., and Cooper, H.M. (2006). Immunohistochemical evidence of a melanopsin cone in human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *47*, 1636–1641.
- Dkhissi-Benyahya, O., Coutanson, C., Knoblauch, K., Lahouaoui, H., Leviel, V., Rey, C., Bennis, M., and Cooper, H.M. (2013). The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 3435–3447.
- Dmitriev, A.V., and Mangel, S.C. (2001). Circadian clock regulation of pH in the rabbit retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 2897–2902.
- Doi, M., Uji, Y., and Yamamura, H. (1995). Morphological classification of retinal ganglion cells in mice. *J. Comp. Neurol.* *356*, 368–386.
- Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* *125*, 497–508.
- Dollet, A., Albrecht, U., Cooper, H.M., and Dkhissi-Benyahya, O. (2010). Cones are required for normal temporal responses to light of phase shifts and clock gene expression. *Chronobiol. Int.* *27*, 768–781.
- Dorenbos, R., Contini, M., Hirasawa, H., Gustincich, S., and Raviola, E. (2007). Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis. Neurosci.* *24*, 573–580.

- Doyle, S.E., Grace, M.S., Mclvor, W., and Menaker, M. (2002a). Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis. Neurosci.* *19*, 593–601.
- Doyle, S.E., Mclvor, W.E., and Menaker, M. (2002b). Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: role of the photoreceptors. *J. Neurochem.* *83*, 211–219.
- Dräger, U.C., and Olsen, J.F. (1981). Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *20*, 285–293.
- Dubocovich, M.L. (1983). Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* *306*, 782–784.

E

- Ebihara, S., Marks, T., Hudson, D.J., and Menaker, M. (1986). Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* *231*, 491–493.
- Edgar, R.S., Green, E.W., Zhao, Y., van Ooijen, G., Olmedo, M., Qin, X., Xu, Y., Pan, M., Valekunja, U.K., Feeney, K.A., *et al.* (2012). Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* *485*, 459–464.
- Eide, E.J., Woolf, M.F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E.L., Giovanni, A., and Virshup, D.M. (2005). Control of mammalian circadian rhythm by CKepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2795–2807.
- Elowitz, M.B., and Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature* *403*, 335–338.

F

- Feigenspan, A., Gustincich, S., Bean, B.P., and Raviola, E. (1998). Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 6776–6789.
- Feillet, C.A., Mendoza, J., Albrecht, U., Pévet, P., and Challet, E. (2008). Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 209–221.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M., and 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.
- Foley, N.C., Tong, T.Y., Foley, D., LeSauter, J., Welsh, D.K., and Silver, R. (2011). Characterization of orderly spatiotemporal patterns of clock gene activation in mammalian suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* *33*, 1851–1865.
- Fontaine, V., Kinkl, N., Sahel, J., Dreyfus, H., and Hicks, D. (1998). Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 9662–9672.
- Franken, P., Lopez-Molina, L., Marcacci, L., Schibler, U., and Tafti, M. (2000). The transcription factor DBP affects circadian sleep consolidation and rhythmic EEG activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 617–625.
- Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S.N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., and Guck, J. (2007). Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 8287–8292.
- Frazão, R., McMahon, D.G., Schunack, W., Datta, P., Heidelberger, R., and Marshak, D.W. (2011). Histamine elevates free intracellular calcium in mouse retinal dopaminergic cells via H1-receptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 3083–3088.
- Frederick, J.M., Rayborn, M.E., Laties, A.M., Lam, D.M., and Hollyfield, J.G. (1982). Dopaminergic neurons in the human retina. *J. Comp. Neurol.* *210*, 65–79.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., and Foster, R. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* *284*, 502–504.
- Freeman, G.M., Jr, Krock, R.M., Aton, S.J., Thaben, P., and Herzog, E.D. (2013). GABA Networks Destabilize Genetic Oscillations in the Circadian Pacemaker. *Neuron* *78*, 799–806.
- Von Frisch, K. (1950). Die Sonne als Kompaß im Leben der Bienen. *Experientia* *6*, 210–221.
- Fu, Y. (2010). Phototransduction in Rods and Cones. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.

Fukuhara, C., Liu, C., Ivanova, T.N., Chan, G.C.-K., Storm, D.R., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2004). Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 1803–1811.

G

- Gallego, M., Kang, H., and Virshup, D.M. (2006). Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. *Biochem. J.* *399*, 169–175.
- Gastinger, M.J., O'Brien, J.J., Larsen, N.B., and Marshak, D.W. (1999). Histamine immunoreactive axons in the macaque retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *40*, 487–495.
- Gastinger, M.J., Barber, A.J., Vardi, N., and Marshak, D.W. (2006). Histamine receptors in mammalian retinas. *J. Comp. Neurol.* *495*, 658–667.
- Gau, D., Lemberger, T., von Gall, C., Kretz, O., Le Minh, N., Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H.W., and Schütz, G. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* *34*, 245–253.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., and Weitz, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* *280*, 1564–1569.
- Van Gelder, R.N. (2008). Non-visual photoreception: sensing light without sight. *Curr. Biol. CB* *18*, R38–39.
- Gerkema, M.P., Groos, G.A., and Daan, S. (1990). Differential elimination of circadian and ultradian rhythmicity by hypothalamic lesions in the common vole, *Microtus arvalis*. *J. Biol. Rhythms* *5*, 81–95.
- Ginty, D.D., Kornhauser, J.M., Thompson, M.A., Bading, H., Mayo, K.E., Takahashi, J.S., and Greenberg, M.E. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* *260*, 238–241.
- Goldman, A.I., Teirstein, P.S., and O'Brien, P.J. (1980). The role of ambient lighting in circadian disc shedding in the rod outer segment of the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *19*, 1257–1267.
- Golombek, D.A., Agostino, P.V., Plano, S.A., and Ferreyra, G.A. (2004). Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem. Int.* *45*, 929–936.
- Gómez-Corvera, A., Cerrillo, I., Molinero, P., Naranjo, M.C., Lardone, P.J., Sanchez-Hidalgo, M., Carrascosa-Salmoral, M.P., Medrano-Campillo, P., Guerrero, J.M., and Rubio, A. (2009). Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. *J. Pineal Res.* *47*, 15–22.
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E., and Saper, C.B. (2001). Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* *4*, 1165.
- Gooley, J.J., Lu, J., Fischer, D., and Saper, C.B. (2003). A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 7093–7106.
- Goriki, A., Hatanaka, F., Myung, J., Kim, J.K., Yoritaka, T., Tanoue, S., Abe, T., Kiyonari, H., Fujimoto, K., Kato, Y., *et al.* (2014). A novel protein, CHRONO, functions as a core component of the mammalian circadian clock. *PLoS Biol.* *12*, e1001839.
- Goto, M., Oshima, I., Tomita, T., and Ebihara, S. (1989). Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J. Pineal Res.* *7*, 195–204.
- Göz, D., Studholme, K., Lappi, D.A., Rollag, M.D., Provencio, I., and Morin, L.P. (2008). Targeted destruction of photosensitive retinal ganglion cells with a saporin conjugate alters the effects of light on mouse circadian rhythms. *PLoS One* *3*, e3153.
- Grace, M.S., Wang, L.M., Pickard, G.E., Besharse, J.C., and Menaker, M. (1996). The tau mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. *Brain Res.* *735*, 93–100.
- Graham, D. (2008). Melanopsin Ganglion Cells: A Bit of Fly in the Mammalian Eye. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Granados-Fuentes, D., and Herzog, E.D. (2013). The clock shop: coupled circadian oscillators. *Exp. Neurol.* *243*, 21–27.
- Grechez-Cassiau, A., Panda, S., Lacoche, S., Teboul, M., Azmi, S., Laudet, V., Hogenesch, J.B., Taneja, R., and Delaunay, F. (2004). The transcriptional repressor STRA13 regulates a subset of peripheral circadian outputs. *J. Biol. Chem.* *279*, 1141–1150.

- Green, D.J., and Gillette, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245, 198–200.
- Groos, G., and Hendriks, J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34, 283–288.
- Grün, G. (1982). Development dynamics of synapses in the vertebrate retina. *Prog. Neurobiol.* 18, 257–274.
- Guilding, C., and Piggins, H.D. (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J. Neurosci.* 25, 3195–3216.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., and Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* 20, 391–403.
- Güler, A.D., Ecker, J.L., Lall, G.S., Haq, S., Altimus, C.M., Liao, H.-W., Barnard, A.R., Cahill, H., Badea, T.C., Zhao, H., *et al.* (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102–105.
- Günhan, E., van der List, D., and Chalupa, L.M. (2003). Ectopic photoreceptors and cone bipolar cells in the developing and mature retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 1383–1389.
- Gustincich, S., Feigenspan, A., Wu, D.K., Koopman, L.J., and Raviola, E. (1997). Control of dopamine release in the retina: a transgenic approach to neural networks. *Neuron* 18, 723–736.
- Gustincich, S., Contini, M., Gariboldi, M., Puopolo, M., Kadota, K., Bono, H., LeMieux, J., Walsh, P., Carninci, P., Hayashizaki, Y., *et al.* (2004). Gene discovery in genetically labeled single dopaminergic neurons of the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5069–5074.

H

- Halberg, F., Halberg, E., Barnum, C.P., and Bittner, J.J. (1959). Physiologic 24-hour Periodicity in Human Beings and Mice, the Lighting Regimen and Daily Routine. In *Photoperiodism and Related Phenomena in Plants and Animals*, (Washington, D.C.), pp. 803–878.
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J.M., and Silver, R. (2001). Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 7742–7750.
- Hannibal, J., and Fahrenkrug, J. (2004). Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 316, 99–113.
- Hannibal, J., Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2013). Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp. Eye Res.* 106, 55–63.
- Hardin, P.E., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343, 536–540.
- Hastings, J.W., and Sweeney, B.M. (1958). A Persistent Diurnal Rhythm of Luminescence in *Gonyaulax Polyedra*. *Biol. Bull.* 115, 440–458.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., and O’Neill, J.S. (2008). Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Curr. Biol. CB* 18, R805–R815.
- Hatakeyama, J., and Kageyama, R. (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 83–89.
- Hatori, M., Le, H., Vollmers, C., Keding, S.R., Tanaka, N., Buch, T., Waisman, A., Schmedt, C., Jegla, T., and Panda, S. (2008). Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One* 3, e2451.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., and Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R.H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R.G., *et al.* (2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 424, 76–81.
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., and Berson, D.M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349.

- Hazlerigg, D.G., Ebling, F.J.P., and Johnston, J.D. (2005). Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr. Biol.* *15*, R449–R450.
- He, P.-J., Hirata, M., Yamauchi, N., Hashimoto, S., and Hattori, M.-A. (2007). The disruption of circadian clockwork in differentiating cells from rat reproductive tissues as identified by in vitro real-time monitoring system. *J. Endocrinol.* *193*, 413–420.
- Herrmann, R., Heflin, S.J., Hammond, T., Lee, B., Wang, J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Eggers, E.D., Frishman, L.J., McCall, M.A., *et al.* (2011). Rod vision is controlled by dopamine-dependent sensitization of rod bipolar cells by GABA. *Neuron* *72*, 101–110.
- Herzog, E.D., Geusz, M.E., Khalsa, S.B., Straume, M., and Block, G.D. (1997). Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multimicroelectrode plates. *Brain Res.* *757*, 285–290.
- Herzog, E.D., Takahashi, J.S., and Block, G.D. (1998). Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* *1*, 708–713.
- Herzog, E.D., Aton, S.J., Numano, R., Sakaki, Y., and Tei, H. (2004). Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythms* *19*, 35–46.
- Hicks, D., and Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.* *51*, 119–129.
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., and Sassone-Corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* *450*, 1086–1090.
- Hirose, T., Smith, R.J., and Jetten, A.M. (1994). ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *205*, 1976–1983.
- Hoang, N., Schleicher, E., Kacprzak, S., Bouly, J.-P., Picot, M., Wu, W., Berndt, A., Wolf, E., Bittl, R., and Ahmad, M. (2008). Human and *Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS Biol.* *6*, e160.
- Hogenesch, J.B., Gu, Y.Z., Moran, S.M., Shimomura, K., Radcliffe, L.A., Takahashi, J.S., and Bradfield, C.A. (2000). The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, RC83.
- Honma, S., Nakamura, W., Shirakawa, T., and Honma, K. (2004). Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci. Lett.* *358*, 173–176.
- Honrubia, F.M., and Elliott, J.H. (1968). Efferent innervation of the retina. I. Morphologic study of the human retina. *Arch. Ophthalmol.* *80*, 98–103.
- Honrubia, F.M., and Elliott, J.H. (1970). Efferent innervation of the retina. II. Morphologic study of the monkey retina. *Invest. Ophthalmol.* *9*, 971–976.
- Van Hook, M.J., Wong, K.Y., and Berson, D.M. (2012). Dopaminergic modulation of ganglion-cell photoreceptors in rat. *Eur. J. Neurosci.* *35*, 507–518.
- Hughes, A.T.L., and Piggins, H.D. (2012). Feedback actions of locomotor activity to the circadian clock. *Prog. Brain Res.* *199*, 305–336.
- Hughes, S., Hankins, M.W., Foster, R.G., and Peirson, S.N. (2012). Melanopsin phototransduction: slowly emerging from the dark. *Prog. Brain Res.* *199*, 19–40.
- Hwang, C.K., Chaurasia, S.S., Jackson, C.R., Chan, G.C.-K., Storm, D.R., and Iuvone, P.M. (2013). Circadian rhythm of contrast sensitivity is regulated by a dopamine-neuronal PAS-domain protein 2-adenylyl cyclase 1 signaling pathway in retinal ganglion cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 14989–14997.
- I
- Ichinose, T., Shields, C.R., and Lukasiewicz, P.D. (2005). Sodium channels in transient retinal bipolar cells enhance visual responses in ganglion cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 1856–1865.
- De la Iglesia, H.O., Meyer, J., Carpino, A., Jr, and Schwartz, W.J. (2000). Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* *290*, 799–801.
- Inagaki, N., Honma, S., Ono, D., Tanahashi, Y., and Honma, K. (2007). Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 7664–7669.

- Inouye, S.T., and 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.
- Iuvone, P.M., Galli, C.L., Garrison-Gund, C.K., and Neff, N.H. (1978). Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science* 202, 901–902.
- Iuvone, P.M., Tigges, M., Stone, R.A., Lambert, S., and Laties, A.M. (1991). Effects of apomorphine, a dopamine receptor agonist, on ocular refraction and axial elongation in a primate model of myopia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 1674–1677.
- Izumo, M., Johnson, C.H., and Yamazaki, S. (2003). Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting: temperature compensation and damping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 16089–16094.

J

- Jablonski, M.M., and Iannaccone, A. (2000). Targeted disruption of Müller cell metabolism induces photoreceptor dysmorphogenesis. *Glia* 32, 192–204.
- Jackson, C.R., Chaurasia, S.S., Zhou, H., Haque, R., Storm, D.R., and Iuvone, P.M. (2009). Essential roles of dopamine D4 receptors and the type 1 adenylyl cyclase in photic control of cyclic AMP in photoreceptor cells. *J. Neurochem.* 109, 148–157.
- Jackson, C.R., Chaurasia, S.S., Hwang, C.K., and Iuvone, P.M. (2011). Dopamine D₄ receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* 34, 57–64.
- Jackson, C.R., Ruan, G.-X., Aseem, F., Abey, J., Gamble, K., Stanwood, G., Palmiter, R.D., Iuvone, P.M., and McMahon, D.G. (2012). Retinal Dopamine Mediates Multiple Dimensions of Light-Adapted Vision. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 9359–9368.
- Jagota, A., De La Iglesia, H.O., and Schwartz, W.J. (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat. Neurosci.* 3, 372–376.
- Jaliffa, C.O., Saenz, D., Resnik, E., Keller Sarmiento, M.I., and Rosenstein, R.E. (2001). Circadian activity of the GABAergic system in the golden hamster retina. *Brain Res.* 912, 195–202.
- Jeon, C.J., Strettoi, E., and Masland, R.H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 8936–8946.
- Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., de Vries, G.J., and Reppert, S.M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57–68.
- Johansson, K., and Ehinger, B. (2001). Postnatal development of the rat retina and some of its neurotransmitter systems in vitro. *Prog. Brain Res.* 131, 589–598.
- Jones, C.R., Campbell, S.S., Zone, S.E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P.J., Jones, B., Czajkowski, L., and Ptáček, L.J. (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat. Med.* 5, 1062–1065.
- Jun, G., Nicolaou, M., Morrison, M.A., Buros, J., Morgan, D.J., Radeke, M.J., Yonekawa, Y., Tsironi, E.E., Kotoula, M.G., Zacharaki, F., *et al.* (2011). Influence of ROBO1 and RORA on risk of age-related macular degeneration reveals genetically distinct phenotypes in disease pathophysiology. *PLoS One* 6, e25775.

K

- Kamphuis, W., Cailotto, C., Dijk, F., Bergen, A., and Buijs, R.M. (2005). Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 18–26.
- Karlsen, R.L., Pedersen, O.O., Schousboe, A., and Langeland, A. (1982). Toxic effects of DL-alpha-amino adipic acid on müller cells from rats in vivo and cultured cerebral astrocytes. *Exp. Eye Res.* 35, 305–311.
- Kasahara, T., Abe, K., Mekada, K., Yoshiki, A., and Kato, T. (2010). Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6412–6417.
- Kawamoto, T., Noshiro, M., Sato, F., Maemura, K., Takeda, N., Nagai, R., Iwata, T., Fujimoto, K., Furukawa, M., Miyazaki, K., *et al.* (2004). A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 117–124.

- 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., *et al.* (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641–653.
- Koike, N., Yoo, S.-H., Huang, H.-C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T.-K., and Takahashi, J.S. (2012). Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* 338, 349–354.
- Koinuma, S., Asakawa, T., Nagano, M., Furukawa, K., Sujino, M., Masumoto, K.-H., Nakajima, Y., Hashimoto, S., Yagita, K., and Shigeyoshi, Y. (2013). Regional circadian period difference in the suprachiasmatic nucleus of the mammalian circadian center. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2832–2841.
- Kojima, S., Shingle, D.L., and Green, C.B. (2011). Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J. Cell Sci.* 124, 311–320.
- Kojima, S., Sher-Chen, E.L., and Green, C.B. (2012). Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes Dev.* 26, 2724–2736.
- Kolb, H. (2007a). Glial Cells of the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Kolb, H. (2007b). Feedback Loops in the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Kolb, H. (2009a). Circuitry for Rod Signals through the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Kolb, H. (2009b). Neurotransmitters in the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Kolb, H. (2012). Simple Anatomy of the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 2112–2116.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S., and Schibler, U. (2007). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* 5, e34.
- Kramer, G. (1950). Weitere Analyse der Faktoren, welche die Zugaktivität des gekäfigten Vogels orientieren. *Naturwissenschaften* 37, 377–378.
- Krigel, A., Felder-Schmittbuhl, M.-P., and Hicks, D. (2010). Circadian-clock driven cone-like photoreceptor phagocytosis in the neural retina leucine zipper gene knockout mouse. *Mol. Vis.* 16, 2873–2881.
- Kuhlman, S.J., Mackey, S.R., and Duffy, J.F. (2007). Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 1–6.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., and Reppert, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98, 193–205.
- L**
- Lamia, K.A., Storch, K.-F., and Weitz, C.J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15172–15177.
- LaVail, M.M. (1976). Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194, 1071–1074.
- LaVail, M.M. (1980). Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 407–411.
- Lee, E.-J., Mann, L.B., Rickman, D.W., Lim, E.-J., Chun, M.-H., and Grzywacz, N.M. (2006). All amacrine cells in the distal inner nuclear layer of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 494, 651–662.
- Lee, H., Chen, R., Kim, H., Etchegaray, J.-P., Weaver, D.R., and Lee, C. (2011). The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16451–16456.
- Lee, H.S., Nelms, J.L., Nguyen, M., Silver, R., and Lehman, M.N. (2003). The eye is necessary for a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.* 6, 111–112.

- Li, H., Zhang, Z., Blackburn, M.R., Wang, S.W., Ribelayga, C.P., and O'Brien, J. (2013). Adenosine and dopamine receptors coregulate photoreceptor coupling via gap junction phosphorylation in mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 3135–3150.
- Li, R., Yue, J., Zhang, Y., Zhou, L., Hao, W., Yuan, J., Qiang, B., Ding, J.M., Peng, X., and Cao, J.-M. (2008). CLOCK/BMAL1 regulates human nocturnin transcription through binding to the E-box of nocturnin promoter. *Mol. Cell. Biochem.* *317*, 169–177.
- Li, Y., Song, X., Ma, Y., Liu, J., Yang, D., and Yan, B. (2004). DNA binding, but not interaction with Bmal1, is responsible for DEC1-mediated transcription regulation of the circadian gene mPer1. *Biochem. J.* *382*, 895–904.
- Linden, R. (1987). Displaced ganglion cells in the retina of the rat. *J. Comp. Neurol.* *258*, 138–143.
- Liu, Z.H., and Jen, L.S. (1986). Displaced retinal ganglion cells in normal rats and rats with one eye enucleated at birth. *Neurosci. Lett.* *67*, 239–244.
- Liu, C., Fukuhara, C., Wessel, J.H., 3rd, Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2004). Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res.* *315*, 197–201.
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., and Lin, J.D. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* *447*, 477–481.
- Liu, X., Zhang, Z., and Ribelayga, C.P. (2012). Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS One* *7*, e50602.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M., and Schibler, U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *EMBO J.* *16*, 6762–6771.
- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M., and Takahashi, J.S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* *288*, 483–492.
- Lucas, R.J., and Foster, R.G. (1999). Neither functional rod photoreceptors nor rod or cone outer segments are required for the photic inhibition of pineal melatonin. *Endocrinology* *140*, 1520–1524.
- Lucas, R.J., Freedman, M.S., Muñoz, M., Garcia-Fernández, J.M., and Foster, R.G. (1999). Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* *284*, 505–507.
- Lucas, R.J., Douglas, R.H., and Foster, R.G. (2001). Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat. Neurosci.* *4*, 621–626.
- Lukáts, A., Szabó, A., Röhlich, P., Víg, B., and Szél, A. (2005). Photopigment coexpression in mammals: comparative and developmental aspects. *Histol. Histopathol.* *20*, 551–574.
- Lupi, D., Cooper, H.M., Froehlich, A., Standford, L., McCall, M.A., and Foster, R.G. (1999). Transgenic ablation of rod photoreceptors alters the circadian phenotype of mice. *Neuroscience* *89*, 363–374.

M

- Ma, Y.-P., Cui, J., and Pan, Z.-H. (2005). Heterogeneous expression of voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in mammalian retinal bipolar cells. *Vis. Neurosci.* *22*, 119–133.
- Mariani, A.P. (1982). Biplexiform cells: ganglion cells of the primate retina that contact photoreceptors. *Science* *216*, 1134–1136.
- Masland, R.H. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* *4*, 877–886.
- Masland, R.H. (2011). Cell populations of the retina: the Proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 4581–4591.
- Masland, R.H. (2012a). The neuronal organization of the retina. *Neuron* *76*, 266–280.
- Masland, R.H. (2012b). The tasks of amacrine cells. *Vis. Neurosci.* *29*, 3–9.
- Masri, H., Goureau, O., Hecquet, C., Simon, A., and Nguyen-Legros, J. (1996). [Dopamine slows phagocytosis of rods from bovine pigment epithelium in vitro through D1 receptor]. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* *319*, 687–691.
- Maywood, E.S., Drynan, L., Chesham, J.E., Edwards, M.D., Dardente, H., Fustin, J.-M., Hazlerigg, D.G., O'Neill, J.S., Codner, G.F., Smyllie, N.J., *et al.* (2013). Analysis of core circadian feedback loop in suprachiasmatic nucleus of mCry1-luc transgenic reporter mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9547–9552.

- McArthur, A.J., Gillette, M.U., and Prosser, R.A. (1991). Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 565, 158–161.
- McBean, G.J. (1994). Inhibition of the glutamate transporter and glial enzymes in rat striatum by the gliotoxin, alpha aminoadipate. *Br. J. Pharmacol.* 113, 536–540.
- McMahon, D.G., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2014). Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 39, 58–76.
- Menet, J.S., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C., and Rosbash, M. (2012). Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. *eLife* 1, e00011.
- Miller, B.H., McDearmon, E.L., Panda, S., Hayes, K.R., Zhang, J., Andrews, J.L., Antoch, M.P., Walker, J.R., Esser, K.A., Hogenesch, J.B., *et al.* (2007). Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 3342–3347.
- Miyamoto, Y., and Sancar, A. (1998). Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6097–6102.
- Mohawk, J.A., and Takahashi, J.S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends Neurosci.* 34, 349–359.
- Mohawk, J.A., Baer, M.L., and Menaker, M. (2009). The methamphetamine-sensitive circadian oscillator does not employ canonical clock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 3519–3524.
- Mollema, N.J., Yuan, Y., Jelcick, A.S., Sachs, A.J., von Alpen, D., Schorderet, D., Escher, P., and Haider, N.B. (2011). Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina. *PLoS One* 6, e17494.
- Moore, R.Y., and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201–206.
- Morgan, W.W., and Kamp, C.W. (1980). Dopaminergic amacrine neurons of rat retinas with photoreceptor degeneration continue to respond to light. *Life Sci.* 26, 1619–1626.
- Morse, D., and Sassone-Corsi, P. (2002). Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci.* 25, 632–637.
- Mouritsen, H., Derbyshire, R., Stalleicken, J., Mouritsen, O.Ø., Frost, B.J., and Norris, D.R. (2013). An experimental displacement and over 50 years of tag-recoveries show that monarch butterflies are not true navigators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7348–7353.
- Mrosovsky, N., and Salmon, P.A. (1987). A behavioural method for accelerating re-entrainment of rhythms to new light-dark cycles. *Nature* 330, 372–373.
- Mumm, J.S., Godinho, L., Morgan, J.L., Oakley, D.M., Schroeter, E.H., and Wong, R.O.L. (2005). Laminar circuit formation in the vertebrate retina. *Prog. Brain Res.* 147, 155–169.
- Mustafi, D., Kevany, B.M., Genoud, C., Bai, X., and Palczewski, K. (2013). Photoreceptor phagocytosis is mediated by phosphoinositide signaling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4585–4595.

N

- Nader, N., Chrousos, G.P., and Kino, T. (2010). Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 277–286.
- Nagano, M., Adachi, A., Nakahama, K., Nakamura, T., Tamada, M., Meyer-Bernstein, E., Sehgal, A., and Shigeyoshi, Y. (2003). An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 6141–6151.
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., and Schibler, U. (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119, 693–705.
- Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. (2005). Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308, 414–415.
- Nakamura, W., Yamazaki, S., Takasu, N.N., Mishima, K., and Block, G.D. (2005). Differential response of Period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 5481–5487.

- Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Tanahashi, Y., Ikeda, M., and Honma, K. (1999). Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the rat retina. *Neurosci. Lett.* 271, 1–4.
- Namihira, M., Honma, S., Abe, H., Masubuchi, S., Ikeda, M., and Honmaka, K. (2001). Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. *Neuroreport* 12, 471–475.
- Nandrot, E.F., Kim, Y., Brodie, S.E., Huang, X., Sheppard, D., and Finnemann, S.C. (2004). Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J. Exp. Med.* 200, 1539–1545.
- Nguyen-Legros, J., and Hicks, D. (2000). Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 196, 245–313.
- Nguyen-Legros, J., Chanut, E., Versaux-Botteri, C., Simon, A., and Trouvin, J.H. (1996). Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D2-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J. Neurochem.* 67, 2514–2520.
- Ning, K., Li, L., Liao, M., Liu, B., Mielke, J.G., Chen, Y., Duan, Y., El-Hayek, Y.H., and Wan, Q. (2004). Circadian regulation of GABAA receptor function by CKI epsilon-CKI delta in the rat suprachiasmatic nuclei. *Nat. Neurosci.* 7, 489–490.
- Nir, I., Haque, R., and Iuvone, P.M. (2000). Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. *Brain Res.* 870, 118–125.

O

- O’Neill, J.S., and Reddy, A.B. (2011). Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 469, 498–503.
- O’Neill, J.S., and Reddy, A.B. (2012). The essential role of cAMP/Ca²⁺ signalling in mammalian circadian timekeeping. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 44–50.
- O’Neill, J.S., Maywood, E.S., Chesham, J.E., Takahashi, J.S., and Hastings, M.H. (2008). cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science* 320, 949–953.
- O’Neill, J.S., van Ooijen, G., Dixon, L.E., Troein, C., Corellou, F., Bouget, F.-Y., Reddy, A.B., and Millar, A.J. (2011). Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469, 554–558.
- O’Steen, W.K., Anderson, K.V., and Shear, C.R. (1974). Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age. *Invest. Ophthalmol.* 13, 334–339.
- Ogilvie, J.M., and Speck, J.D. (2002). Dopamine has a critical role in photoreceptor degeneration in the rd mouse. *Neurobiol. Dis.* 10, 33–40.
- Ohta, H., Yamazaki, S., and McMahon, D.G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8, 267–269.
- Okano, T., Sasaki, M., and Fukada, Y. (2001). Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication. *Neurosci. Lett.* 300, 111–114.
- Okubo, N., Minami, Y., Fujiwara, H., Umemura, Y., Tsuchiya, Y., Shirai, T., Oda, R., Inokawa, H., Kubo, T., and Yagita, K. (2013). Prolonged bioluminescence monitoring in mouse ex vivo bone culture revealed persistent circadian rhythms in articular cartilages and growth plates. *PLoS One* 8, e78306.
- Olney, J.W. (1968). An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest. Ophthalmol.* 7, 250–268.
- Olney, J.W., Ho, O.L., and Rhee, V. (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 14, 61–76.
- Olney, J.W., de Gubareff, T., and Collins, J.F. (1980). Stereospecificity of the gliotoxic and anti-neurotoxic actions of alpha-amino adipate. *Neurosci. Lett.* 19, 277–282.
- Organisciak, D.T., Darrow, R.M., Barsalou, L., Kutty, R.K., and Wiggert, B. (2000). Circadian-dependent retinal light damage in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3694–3701.
- D’Ortous de Mairan, J.-J. (1729). Observation botanique. In *Histoire de l’Académie Royale des Sciences*, pp. 35–36.
- Oyster, C.W., Takahashi, E.S., Cilluffo, M., and Brecha, N.C. (1985). Morphology and distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the cat retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6335–6339.

P

- Pan, Z.H., and Hu, H.J. (2000). Voltage-dependent Na(+) currents in mammalian retinal cone bipolar cells. *J. Neurophysiol.* *84*, 2564–2571.
- Panda, S., Hogenesch, J.B., and Kay, S.A. (2002a). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* *417*, 329–335.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002b). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* *109*, 307–320.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., and Kay, S.A. (2002c). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* *298*, 2213–2216.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., *et al.* (2003). Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* *301*, 525–527.
- Pang, J.-J., and Wu, S.M. (2011). Morphology and immunoreactivity of retrogradely double-labeled ganglion cells in the mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 4886–4896.
- Pang, J.-J., Gao, F., Lem, J., Bramblett, D.E., Paul, D.L., and Wu, S.M. (2010). Direct rod input to cone BCs and direct cone input to rod BCs challenge the traditional view of mammalian BC circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 395–400.
- Pang, J.-J., Gao, F., Paul, D.L., and Wu, S.M. (2012). Rod, M-cone and M/S-cone inputs to hyperpolarizing bipolar cells in the mouse retina. *J. Physiol.* *590*, 845–854.
- Peirson, S.N., Bovee-Geurts, P.H.M., Lupi, D., Jeffery, G., DeGrip, W.J., and Foster, R.G. (2004). Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *123*, 132–135.
- Peirson, S.N., Butler, J.N., Duffield, G.E., Takher, S., Sharma, P., and Foster, R.G. (2006). Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 800–807.
- Pendergast, J.S., Friday, R.C., and Yamazaki, S. (2010). Distinct functions of Period2 and Period3 in the mouse circadian system revealed by in vitro analysis. *PLoS One* *5*, e8552.
- Pevet, P., and Challet, E. (2011). Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J. Physiol. Paris* *105*, 170–182.
- Piccolino, M. (1988). Cajal and the retina: a 100-year retrospective. *Trends Neurosci.* *11*, 521–525.
- Pittendrigh, C.S. (1958). Perspectives in the study of biological clocks. In *Perspectives in Marine Biology*, (University of California Press), pp. 239–268.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *25*, 159–184.
- Pittler, S.J., Keeler, C.E., Sidman, R.L., and Baehr, W. (1993). PCR analysis of DNA from 70-year-old sections of rodless retina demonstrates identity with the mouse rd defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9616–9619.
- Polyak, S.L. (1941). *The Retina* (Chicago: University of Chicago Press).
- Pourcho, R.G. (1996). Neurotransmitters in the retina. *Curr. Eye Res.* *15*, 797–803.
- Pozdeyev, N.V., and Lavrikova, E.V. (2000). Diurnal changes of tyrosine, dopamine, and dopamine metabolites content in the retina of rats maintained at different lighting conditions. *J. Mol. Neurosci.* *MN 15*, 1–9.
- Pozdeyev, N., Tosini, G., Li, L., Ali, F., Rozov, S., Lee, R.H., and Iuvone, P.M. (2008). Dopamine modulates diurnal and circadian rhythms of protein phosphorylation in photoreceptor cells of mouse retina. *Eur. J. Neurosci.* *27*, 2691–2700.
- Pozdeyev, N.V., Doroshenko, E.M., Lavrikova, E.V., and Etingof, R.N. (2000). The effects of melatonin and L-DOPA on the diurnal rhythms of free amino acids content in the rat retina. *J. Biol. Rhythms* *15*, 112–121.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and 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.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., and Rollag, M.D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 340–345.

- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., and Rollag, M.D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 600–605.
- Puopolo, M., Hochstetler, S.E., Gustincich, S., Wightman, R.M., and Raviola, E. (2001). Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron: activity dependence and transmitter modulation. *Neuron* 30, 211–225.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2011). *Neurosciences* (Bruxelles: De Boeck).

R

- Ralph, M.R., and Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241, 1225–1227.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Ramón y Cajal, S. (1893). La rétine des Vertébrés. In *La Cellule.*, (Lierre, Belgium [etc.]: Van In [etc.]), pp. 119–257.
- Ramón y Cajal, S. (1967). Nobel lecture. The structure and connexions of neurons. In *Nobel Lectures. Physiology or Medicine, 1901–1929.* Published for the Nobel Foundation., (London: Elsevier Publishing Company), pp. 220–253.
- Reddy, A.B., Karp, N.A., Maywood, E.S., Sage, E.A., Deery, M., O’Neill, J.S., Wong, G.K.Y., Chesham, J., Odell, M., Lilley, K.S., *et al.* (2006). Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr. Biol. CB* 16, 1107–1115.
- Reddy, P., Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Pirrotta, V., Hadfield, C., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1984). Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38, 701–710.
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia* 61, 651–678.
- Reick, M., Garcia, J.A., Dudley, C., and McKnight, S.L. (2001). NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293, 506–509.
- Reischl, S., and Kramer, A. (2011). Kinases and phosphatases in the mammalian circadian clock. *FEBS Lett.* 585, 1393–1399.
- Ribelayga, C., and Mangel, S.C. (2003). Absence of circadian clock regulation of horizontal cell gap junctional coupling reveals two dopamine systems in the goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* 467, 243–253.
- Ribelayga, C., and Mangel, S.C. (2005). A circadian clock and light/dark adaptation differentially regulate adenosine in the mammalian retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 215–222.
- Ribelayga, C., and Mangel, S.C. (2010). Identification of a circadian clock-controlled neural pathway in the rabbit retina. *PLoS One* 5, e11020.
- Ribelayga, C., Cao, Y., and Mangel, S.C. (2008). The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 59, 790–801.
- Ripperger, J.A., and Brown, S.A. (2010). Transcriptional regulation of circadian clocks. In *The Circadian Clock*, (Albrecht, Urs), pp. 37–78.
- Ripperger, J.A., and Schibler, U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat. Genet.* 38, 369–374.
- Ripperger, J.A., Shearman, L.P., Reppert, S.M., and Schibler, U. (2000). CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev.* 14, 679–689.
- Rodieck, R.W. (2003). *La vision* (De Boeck Supérieur).
- Roenneberg, T., and Mrosovsky, M. (1998). Molecular circadian oscillators: an alternative hypothesis. *J. Biol. Rhythms* 13, 167–179.
- Roseboom, P.H., Namboodiri, M.A., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Rodriguez, I.R., Gastel, J.A., and Klein, D.C. (1998). Natural melatonin “knockdown” in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 63, 189–197.
- Ruan, G.-X., Zhang, D.-Q., Zhou, T., Yamazaki, S., and McMahon, D.G. (2006). Circadian organization of the mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9703–9708.
- Ruan, G.-X., Allen, G.C., Yamazaki, S., and McMahon, D.G. (2008). An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol.* 6, e249.

- Ruan, G.-X., Gamble, K.L., Risner, M.L., Young, L.A., and McMahon, D.G. (2012). Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One* 7, e38985.
- Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C., and O'Hara, B.F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211–2213.
- Ruggiero, L., Connor, M.P., Chen, J., Langen, R., and Finnemann, S.C. (2012). Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5*^{-/-} or *Mfge8*^{-/-} mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8145–8148.

S

- Sakamoto, K., Oishi, K., Shiraishi, M., Hamano, S., Otsuka, H., Miyake, Y., and Ishida, N. (2000). Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport* 11, 3995–3997.
- Sakamoto, K., Liu, C., and Tosini, G. (2004a). Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 9693–9697.
- Sakamoto, K., Liu, C., and Tosini, G. (2004b). Circadian rhythms in the retina of rats with photoreceptor degeneration. *J. Neurochem.* 90, 1019–1024.
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Pozdeyev, N.V., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2005). Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3129–3136.
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2006). Intracocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Mol. Vis.* 12, 117–124.
- Sandu, C., Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M.-P. (2011). Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur. J. Neurosci.* 34, 507–516.
- Santschi, F. (1913). A propos de l'Orientation virtuelle chez les fourmis. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr Nord* 4, 231–235.
- Saszik, S., and DeVries, S.H. (2012). A mammalian retinal bipolar cell uses both graded changes in membrane voltage and all-or-nothing Na⁺ spikes to encode light. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 297–307.
- Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Honda, K.K., Honma, S., Honma, K., and Kato, Y. (2004). Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur. J. Biochem. FEBS* 271, 4409–4419.
- Savy, C., Moussafi, F., Durand, J., Yelnik, J., Simon, A., and Nguyen-Legros, J. (1995). Distribution and spatial geometry of dopamine interplexiform cells in the retina. II. External arborizations in the adult rat and monkey. *J. Comp. Neurol.* 355, 392–404.
- Schaap, J., Albus, H., Eilers, P.H., D  t  ri, L., and Meijer, J.H. (2001). Phase differences in electrical discharge rhythms between neuronal populations of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* 108, 359–363.
- Schaeren-Wiemers, N., André, E., Kapfhammer, J.P., and Becker-André, M. (1997). The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur. J. Neurosci.* 9, 2687–2701.
- Von Schantz, M., Lucas, R.J., and Foster, R.G. (1999). Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 72, 108–114.
- Schmutz, I., Wendt, S., Schnell, A., Kramer, A., Mansuy, I.M., and Albrecht, U. (2011). Protein phosphatase 1 (PP1) is a post-translational regulator of the mammalian circadian clock. *PLoS One* 6, e21325.
- Schnapf, J.L., Kraft, T.W., and Baylor, D.A. (1987). Spectral sensitivity of human cone photoreceptors. *Nature* 325, 439–441.
- Schneider, K., Tippmann, S., Spiwoke-Becker, I., Holthues, H., Wolloscheck, T., Spatkowski, G., Engel, L., Frederiksen, U., and Spessert, R. (2010). Unique clockwork in photoreceptor of rat. *J. Neurochem.* 115, 585–594.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Jr, and Reppert, S.M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19, 1261–1269.
- Shen, W., and Jiang, Z. (2007). Characterization of glycinergic synapses in vertebrate retinas. *J. Biomed. Sci.* 14, 5–13.
- Shi, S., Hida, A., McGuinness, O.P., Wasserman, D.H., Yamazaki, S., and Johnson, C.H. (2010). Circadian clock gene *Bmal1* is not essential; functional replacement with its paralog, *Bmal2*. *Curr. Biol. CB* 20, 316–321.

- Shibuya, C.A., Melnyk, R.B., and Mrosovsky, N. (1980). Simultaneous splitting of drinking and locomotor activity rhythms in a golden hamster. *Naturwissenschaften* 67, 45–47.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., *et al.* (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91, 1043–1053.
- Siffre, M. (1963). *Hors du temps* (Julliard).
- Silveira, L.C., Yamada, E.S., and Picanço-Diniz, C.W. (1989). Displaced horizontal cells and bplexiform horizontal cells in the mammalian retina. *Vis. Neurosci.* 3, 483–488.
- Slat, E., Freeman, G.M., and Herzog, E.D. (2013). The clock in the brain: neurons, glia, and networks in daily rhythms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 105–123.
- Slominski, A., Pisarchik, A., Semak, I., Sweatman, T., and Wortsman, J. (2003). Characterization of the serotonergic system in the C57BL/6 mouse skin. *Eur. J. Biochem. FEBS* 270, 3335–3344.
- Sokolove, P.G., and Bushell, W.N. (1978). The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 72, 131–160.
- Stafford, D.K., and Dacey, D.M. (1997). Physiology of the A1 amacrine: a spiking, axon-bearing interneuron of the macaque monkey retina. *Vis. Neurosci.* 14, 507–522.
- Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1583–1586.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Menaker, M. (2001). Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* 291, 490–493.
- Stone, R.A., Pardue, M.T., Iuvone, P.M., and Khurana, T.S. (2013). Pharmacology of myopia and potential role for intrinsic retinal circadian rhythms. *Exp. Eye Res.* 114, 35–47.
- Storch, K.-F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H., and Weitz, C.J. (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417, 78–83.
- Storch, K.-F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., and Weitz, C.J. (2007). Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell* 130, 730–741.
- Stratmann, M., and Schibler, U. (2006). Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J. Biol. Rhythms* 21, 494–506.
- Strauss, O. (2011). The Retinal Pigment Epithelium. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center),.
- Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M.R., Mather, W.H., Tsimring, L.S., and Hasty, J. (2008). A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature* 456, 516–519.
- Sugawara, T., Sieving, P.A., Iuvone, P.M., and Bush, R.A. (1998). The melatonin antagonist luzindole protects retinal photoreceptors from light damage in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2458–2465.
- Szamier, R.B., Ripps, H., and Chappell, R.L. (1981). Changes in ERG b-wave and Müller cell structure induced by alpha-amino adipic acid. *Neurosci. Lett.* 21, 307–312.

T

- Takahashi, J.S., Hong, H.-K., Ko, C.H., and McDearmon, E.L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775.
- Takano, A., Isojima, Y., and Nagai, K. (2004a). Identification of mPer1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. *J. Biol. Chem.* 279, 32578–32585.
- Takano, A., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Inoue, Y., Kamei, Y., Kitajima, T., Shibui, K., Katoh, M., Watanabe, T., *et al.* (2004b). A missense variation in human casein kinase I epsilon gene that induces functional alteration and shows an inverse association with circadian rhythm sleep disorders. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 29, 1901–1909.
- Teirstein, P.S., Goldman, A.I., and O'Brien, P.J. (1980). Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disc shedding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19, 1268–1273.

- Terman, J.S., Remé, C.E., and Terman, M. (1993). Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* *605*, 256–264.
- Thoreson, W.B., and Mangel, S.C. (2012). Lateral interactions in the outer retina. *Prog. Retin. Eye Res.* *31*, 407–441.
- Tian, N. (2004). Visual experience and maturation of retinal synaptic pathways. *Vision Res.* *44*, 3307–3316.
- Tigges, M., Marquez-Lago, T.T., Stelling, J., and Fussenegger, M. (2009). A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature* *457*, 309–312.
- Tischkau, S.A., Gallman, E.A., Buchanan, G.F., and Gillette, M.U. (2000). Differential cAMP gating of glutamatergic signaling regulates long-term state changes in the suprachiasmatic circadian clock. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 7830–7837.
- Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptáček, L.J., and Fu, Y.H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* *291*, 1040–1043.
- Tomita, J., Nakajima, M., Kondo, T., and Iwasaki, H. (2005). No transcription-translation feedback in circadian rhythm of KaiC phosphorylation. *Science* *307*, 251–254.
- Torra, I.P., Tsubulsky, V., Delaunay, F., Saladin, R., Laudet, V., Fruchart, J.C., Kosykh, V., and Staels, B. (2000). Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb α expression in liver. *Endocrinology* *141*, 3799–3806.
- Tosini, G., and Dirden, J.C. (2000). Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci. Lett.* *286*, 119–122.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* *272*, 419–421.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1998a). The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* *789*, 221–228.
- Tosini, G., and Menaker, M. (1998b). The tau mutation affects temperature compensation of hamster retinal circadian oscillators. *Neuroreport* *9*, 1001–1005.
- Tosini, G., Chaurasia, S.S., and Michael Iuvone, P. (2006). Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in the retina. *Chronobiol. Int.* *23*, 381–391.
- Tosini, G., Kasamatsu, M., and Sakamoto, K. (2007a). Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* *1159*, 134–140.
- Tosini, G., Davidson, A.J., Fukuhara, C., Kasamatsu, M., and Castanon-Cervantes, O. (2007b). Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 3866–3871.
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7728–7733.
- Trümppler, J., Dedek, K., Schubert, T., de Sevilla Müller, L.P., Seeliger, M., Humphries, P., Biel, M., and Weiler, R. (2008). Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 6818–6825.
- Tsuji, T., Hirota, T., Takemori, N., Komori, N., Yoshitane, H., Fukuda, M., Matsumoto, H., and Fukada, Y. (2007). Circadian proteomics of the mouse retina. *Proteomics* *7*, 3500–3508.

V

- La Vail, M.M., and Hild, W. (1971). Histotypic organization of the rat retina in vitro. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *114*, 557–579.
- Vanselow, J.T., and Kramer, A. (2010). Posttranslational regulation of circadian clocks. In *The Circadian Clock*, (Albrecht, Urs), pp. 79–104.
- Vanselow, K., Vanselow, J.T., Westermarck, P.O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzog, H., Schlosser, A., and Kramer, A. (2006). Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev.* *20*, 2660–2672.
- Vecino, E., Hernández, M., and García, M. (2004). Cell death in the developing vertebrate retina. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 965–974.
- Van der Veen, D.R., Shao, J., Xi, Y., Li, L., and Duffield, G.E. (2012). Cardiac atrial circadian rhythms in PERIOD2::LUCIFERASE and per1:luc mice: amplitude and phase responses to glucocorticoid signaling and medium treatment. *PLoS One* *7*, e47692.

- Vielma, A.H., Retamal, M.A., and Schmachtenberg, O. (2012). Nitric oxide signaling in the retina: what have we learned in two decades? *Brain Res.* 1430, 112–125.
- Viney, T.J., Balint, K., Hillier, D., Siegert, S., Boldogkoi, Z., Enquist, L.W., Meister, M., Cepko, C.L., and Roska, B. (2007). Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing. *Curr. Biol. CB* 17, 981–988.
- Virey, J.J. (1814). *Ephémérides de la vie humaine, ou recherches sur la révolution journalière, et la périodicité de ses phénomènes dans la santé et les maladies.* (Cand. J.-J. Virey). Faculté de Médecine de Paris.
- 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., and Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719–725.
- Vivien-Roels, B., Malan, A., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Jeannot, J.P., and Pévet, P. (1998). Daily variations in pineal melatonin concentrations in inbred and outbred mice. *J. Biol. Rhythms* 13, 403–409.
- Völgyi, B., Chheda, S., and Bloomfield, S.A. (2009). Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 512, 664–687.
- Völgyi, B., Kovács-Oller, T., Atlasz, T., Wilhelm, M., and Gábel, R. (2013). Gap junctional coupling in the vertebrate retina: variations on one theme? *Prog. Retin. Eye Res.* 34, 1–18.
- Vugler, A.A., Redgrave, P., Semo, M., Lawrence, J., Greenwood, J., and Coffey, P.J. (2007). Dopamine neurons form a discrete plexus with melanopsin cells in normal and degenerating retina. *Exp. Neurol.* 205, 26–35.

W

- Wade, N.J. (2008). Cajal's retina. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* 44, 227–228.
- Wakakura, M., and Yamamoto, N. (1992). Rapid increase of intracellular Ca²⁺ concentration caused by amino adipic acid enantiomers in retinal Müller cells and neurons in vitro. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* 80, 385–395.
- Wang, J., and Zhou, T. (2010). cAMP-regulated dynamics of the mammalian circadian clock. *Biosystems* 101, 136–143.
- Wang, J.-S., and Kefalov, V.J. (2009). An alternative pathway mediates the mouse and human cone visual cycle. *Curr. Biol. CB* 19, 1665–1669.
- Wang, Y., Osterbur, D.L., Megaw, P.L., Tosini, G., Fukuhara, C., Green, C.B., and Besharse, J.C. (2001). Rhythmic expression of *Nocturnin* mRNA in multiple tissues of the mouse. *BMC Dev. Biol.* 1, 9.
- Wässle, H., Puller, C., Müller, F., and Haverkamp, S. (2009). Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 106–117.
- Webb, A.B., Angelo, N., Huettner, J.E., and Herzog, E.D. (2009). Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16493–16498.
- Weber, E.T., Gannon, R.L., and Rea, M.A. (1995). cGMP-dependent protein kinase inhibitor blocks light-induced phase advances of circadian rhythms in vivo. *Neurosci. Lett.* 197, 227–230.
- Weidman, T.A., and Kuwabara, T. (1968). Postnatal development of the rat retina. An electron microscopic study. *Arch. Ophthalmol.* 79, 470–484.
- Weidman, T.A., and Kuwabara, T. (1969). Development of the rat retina. *Invest. Ophthalmol.* 8, 60–69.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M., and Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing patterns. *Neuron* 14, 697–706.
- Welsh, D.K., Yoo, S.-H., Liu, A.C., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol. CB* 14, 2289–2295.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577.
- Weng, S., Wong, K.Y., and Berson, D.M. (2009). Circadian modulation of melanopsin-driven light response in rat ganglion-cell photoreceptors. *J. Biol. Rhythms* 24, 391–402.
- Wiechmann, A.F., and O'Steen, W.K. (1992). Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33, 1894–1902.

- Wilsbacher, L.D., Yamazaki, S., Herzog, E.D., Song, E.-J., Radcliffe, L.A., Abe, M., Block, G., Spitznagel, E., Menaker, M., and Takahashi, J.S. (2002). Photic and circadian expression of luciferase in mPeriod1-luc transgenic mice *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 489–494.
- Witkovsky, P. (2004). Dopamine and retinal function. *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* *108*, 17–40.
- Witkovsky, P., Veisenberger, E., LeSauter, J., Yan, L., Johnson, M., Zhang, D.-Q., McMahon, D., and Silver, R. (2003). Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene *Period 1* in the mouse retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 7670–7676.
- Witkovsky, P., Gábríel, R., and Krizaj, D. (2008). Anatomical and neurochemical characterization of dopaminergic interplexiform processes in mouse and rat retinas. *J. Comp. Neurol.* *510*, 158–174.
- Wuarin, J., and Schibler, U. (1990). Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell* *63*, 1257–1266.

X

- Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L.J., and Fu, Y.-H. (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* *434*, 640–644.

Y

- Yagita, K., and Okamura, H. (2000). Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* *465*, 79–82.
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G.T., and Okamura, H. (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* *292*, 278–281.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S., and Okamura, H. (2000). Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4773–4781.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2003). Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* *302*, 1408–1412.
- Yamajuku, D., Shibata, Y., Kitazawa, M., Katakura, T., Urata, H., Kojima, T., Takayasu, S., Nakata, O., and Hashimoto, S. (2011). Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Lett.* *585*, 2217–2222.
- Yamazaki, S., Goto, M., and Menaker, M. (1999). No evidence for extraocular photoreceptors in the circadian system of the Syrian hamster. *J. Biol. Rhythms* *14*, 197–201.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* *288*, 682–685.
- Yamazaki, S., Alones, V., and Menaker, M. (2002). Interaction of the retina with suprachiasmatic pacemakers in the control of circadian behavior. *J. Biol. Rhythms* *17*, 315–329.
- Yan, L., and Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of *Per1* and *Per2* genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 1153–1162.
- Yan, L., and Silver, R. (2002). Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur. J. Neurosci.* *16*, 1531–1540.
- Yan, L., and Silver, R. (2004). Resetting the brain clock: time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 1105–1109.
- Yan, L., Takekida, S., Shigeyoshi, Y., and Okamura, H. (1999). *Per1* and *Per2* gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* *94*, 141–150.
- Yan, L., Foley, N.C., Bobula, J.M., Kriegsfeld, L.J., and Silver, R. (2005). Two antiphase oscillations occur in each suprachiasmatic nucleus of behaviorally split hamsters. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 9017–9026.
- Yang, X.-L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog. Neurobiol.* *73*, 127–150.
- Yazulla, S. (2008). Endocannabinoids in the retina: from marijuana to neuroprotection. *Prog. Retin. Eye Res.* *27*, 501–526.

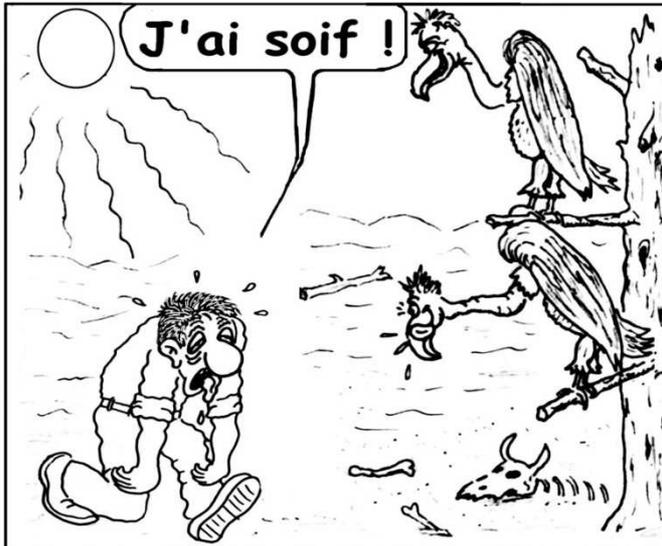
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepka, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., *et al.* (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 5339–5346.
- Yoo, S.-H., Ko, C.H., Lowrey, P.L., Buhr, E.D., Song, E., Chang, S., Yoo, O.J., Yamazaki, S., Lee, C., and Takahashi, J.S. (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse *Period2* circadian oscillations in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2608–2613.
- Young, R.W. (1971). The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *J. Cell Biol.* *49*, 303–318.
- Young, R.W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* *212*, 199–205.
- Ujnovsky, I., Hirayama, J., Doi, M., Borrelli, E., and Sassone-Corsi, P. (2006). Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6386–6391.

Z

- Zhang, H.R. (1994). Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Prog. Retin. Eye Res.* *13*, 243–270.
- Zhang, L., and Aguilar-Roblero, R. (1995). Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Neuroreport* *6*, 537–540.
- Zhang, D.-Q., Stone, J.F., Zhou, T., Ohta, H., and McMahon, D.G. (2004). Characterization of genetically labeled catecholamine neurons in the mouse retina. *Neuroreport* *15*, 1761–1765.
- Zhang, D.-Q., Zhou, T.-R., and McMahon, D.G. (2007). Functional heterogeneity of retinal dopaminergic neurons underlying their multiple roles in vision. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 692–699.
- Zhang, D.-Q., Wong, K.Y., Sollars, P.J., Berson, D.M., Pickard, G.E., and McMahon, D.G. (2008). Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14181–14186.
- Zhang, D.-Q., Belenky, M.A., Sollars, P.J., Pickard, G.E., and McMahon, D.G. (2012). Melanopsin mediates retrograde visual signaling in the retina. *PLoS One* *7*, e42647.
- Zhao, H., Doyle, T.C., Coquoz, O., Kalish, F., Rice, B.W., and Contag, C.H. (2005). Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. *J. Biomed. Opt.* *10*, 41210.
- Zrenner, E., Nelson, R., and Mariani, A. (1983). Intracellular recordings from a biphaxiform ganglion cell in macaque retina, stained with horseradish peroxidase. *Brain Res.* *262*, 181–185.

LA SCIENCE TROUVE PLUS FACILEMENT DES REMÈDES QUE
DES RÉPONSES.

Pr. J. ROSTAND



Organisation tissulaire de l'horloge circadienne dans la rétine de rongeur

Résumé

La rétine a une physiologie rythmique contrôlée par une horloge circadienne dont la localisation et l'organisation sont peu connues chez les mammifères. Nous avons étudié *in vitro* l'horloge rétinienne du rat et de la souris grâce au suivi par bioluminescence des rythmes d'expression d'éléments de son mécanisme moléculaire, le gène *Period1* et la protéine PERIOD2 respectivement. Nous avons montré que chacune des trois couches rétinienne contient un oscillateur circadien fonctionnel, mais que la période de leurs oscillations est très rallongée par rapport à celle du tissu entier et dépend d'un couplage asymétrique entre les couches. Nous avons montré par pharmacologie que le glutamate, le GABA, la glycine et la dopamine ne sont pas indispensables à ce couplage, et que les caséines kinases 1δ et 1ε modulent largement la période de l'horloge rétinienne. Finalement, nous avons observé un couplage au niveau cellulaire également, qui met en jeu, au moins en partie, les jonctions communicantes.

Mots clés

Horloge, rythme circadien, oscillation, rétine, rat, souris, bioluminescence, culture cellulaire

Summary

The retina exhibits physiological rhythms that are under the control of a circadian clock whose location and organization are poorly understood in mammals. We studied the retina clock in rat and mouse through *in vitro* bioluminescence monitoring of the rhythmic expression of molecular elements of the clockwork: the *Period1* gene and the PERIOD2 protein respectively. We showed that each of the three retinal layers harbors a functional circadian oscillator, which period is strikingly longer than in the whole retina and depends on asymmetric coupling between layers. We pharmacologically investigated the nature of the coupling signals and showed that glutamate, GABA, glycine and dopamine are dispensable. We nevertheless highlighted that casein kinases 1δ and 1ε strongly modulate the period of the retina clock. Finally, we observed that the retina clock also entails cell-to-cell coupling that involves at least partially gap-junctions.

Keywords

Clock, circadian rhythm, oscillation, retina, rat, mouse, bioluminescence, cell culture