



HAL
open science

Implication de l'horloge circadienne dans le contrôle des pulsatilités endocrines

Isabelle Bur

► **To cite this version:**

Isabelle Bur. Implication de l'horloge circadienne dans le contrôle des pulsatilités endocrines. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2009. Français. NNT: . tel-00439750

HAL Id: tel-00439750

<https://theses.hal.science/tel-00439750>

Submitted on 8 Dec 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Endocrinologie

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Isabelle BUR

Le 26 Juin 2009

Titre :

**Implication de l'horloge circadienne dans le contrôle des
pulsatilités endocrines**

JURY

M. Guy IXART	Professeur, Univ. Montpellier II	Président
Mme Maria MALAGON	Professeur, Univ. Cordoue (Espagne)	Rapporteur
M. François ROUYER	Directeur de Recherches CNRS	Rapporteur
M. Paul PEVET	Directeur de Recherches CNRS	Examineur
M. Patrice MOLLARD	Directeur de Recherches CNRS	Directeur de thèse
M. Xavier BONNEFONT	Chargé de Recherches CNRS	Co-directeur de thèse



Je souhaite remercier tous les membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger ce travail :

Mr Guy Ixart pour me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Mme Maria Malagon d'avoir accepté de juger de l'intérêt de ce travail.

Mr François Rouyer pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Mr Paul Pévet pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie Patrice Mollard, tout d'abord pour m'avoir accueillie dans son département, mais aussi pour avoir bien voulu encadrer ma thèse en codirection. Merci aussi de m'avoir permis de participer à différents congrès nationaux ou internationaux qui ont apporté de nombreuses discussions nécessaires à la maturation de ce travail.

Je voudrais également exprimer toute ma reconnaissance à Xavier Bonnefont pour avoir su m'amener jusqu'ici en encadrant cette thèse. C'était pour nous deux une grande première, toi dans ton rôle de « chef » (sans l'être) et moi dans mon rôle de thésarde, et je trouve qu'on ne s'en est pas mal sortis ! Je te dois beaucoup dans ce travail, autant pour m'avoir immergée dans ton intérêt pour les rythmes et dans la science, que pour le séjour au Japon que tu m'as permis de réaliser et la rencontre avec Kazu, mais aussi pour avoir cru en moi depuis le début de notre coopération. Merci pour ta patience, ton humanisme, ton ouverture d'esprit et tes conseils toujours judicieux sur le plan professionnel comme personnel.

Je remercie également Iain Robinson, pour ses conseils, son expertise GH et nos discussions qui m'ont beaucoup appris.

Un grand merci aussi à Brigitte Boizet ainsi qu'à Francis Poulat pour le temps et l'intérêt que vous m'avez accordés.

Je souhaite remercier les personnes du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à l'avancement de ma thèse :

Michel, pour m'avoir initiée à la recherche.

Nathalie, pour m'avoir initiée à la q-PCR aux surrenalectomies et pour avoir eu de nombreuses discussions chaleureuses sur la vie, l'avenir, la famille....

Norbert, pour ses conseils d'immunologiste et de maître de conf.

Agnès, pour son esprit critique, son dynamisme et sa volonté pour démarrer « l'histoire repro », qui, j'espère, pourra avoir un jour un bel avenir !

Anne et Evelyne, pour vos conseils techniques sur les manips comme sur les recettes de cuisine.

Anne Cohen-Solal pour m'avoir désinhibée avec les souris et pour t'être aussi bien occupée des souris Cry, même pendant les périodes de crises à la roulotte !

Dom, pour ta gentillesse face à mes « squattages » de l'animalerie... «té que des fois c'était un peu abusé», pour sa bonne humeur et son « accent » qui m'ont fait passer de bons moments au labo.

Tao...dois-je vraiment te remercier ?? Pendant cette thèse, tu m'auras fait vivre les moments les pires comme les meilleurs ! Alors oui, je te remercie pour la grande leçon de vie que tu me donnes tous les jours par ta présence et par tes innombrables proverbes Berbères ! Les mots ne traduiront jamais la force de l'amitié qui nous unit....alors je rajouterais juste...que ça dure !

Laurie-Anne et Claude..., pour nos discussions sur l'avenir... « On pourrait se donner rendez-vous dans 10 ans ! », pour votre aide, votre gentillesse... Ce n'est qu'à la fin de nos thèses respectives que nous nous sommes vraiment rapprochés, mais j'espère bien qu'on continuera à rester en contact....d'ailleurs préparez l'appart....j'arrive bientôt !

Anne-C, « la petite » avec qui j'ai souvent bien ri, toujours motivée pour les festivals et les concerts...de la bonne humeur quoi !

Crystel, pour ta bonne humeur, ta joie, pour nos discussions sympathiques...et d'avoir été « Madame Apotome »

Merci aussi à Marie, pour nos pauses repas à thème « avenir et boulimie », merci à David pour sa joie et ses conseils « Prolactine, Kisspeptine... », ainsi qu'à Nikolas, Claudia....et tout ceux qui ont été de passage au labo.

Je tiens aussi à remercier tous mes amis hors « Labo Mollard » pour tous les bons moments passés ensemble et qui ont contribué à rendre agréable ce travail.

Merci à Fred, tes organisations d'apéros, tes conseils en Salsa, à Nadia pour nos pauses papotages et les dosages Elisa, à Banjo, à Mélanie, à Cyril, à Mathieu, à David, à Nadine...

Merci à Béné, l'ex-binomette, pour ta motivation, ta joie, nos moments « Thés à la menthe et Msemens avec Tao », j'espère bien qu'on continuera nos papotages, même si un jour tu décides de finir ta thèse et de partir à NewYork !!! Merci à « Ju », tout d'abord pour ton aide lors de mes semaines « injections » à l'animalerie, mais aussi pour nos séances de rire à la Jack.... ! « Tè que franchement on aura bien ri grâce à cette histoire...et j'espère bien qu'on en rira encore longtemps hé ! », pour nos moments « sportifs » avec Hugues, ou au bois de Montmaur....

Un petit mot pour tous mes amis, hors du labo, qui ont contribué à me faire passer de bons moments de détente pendant ma thèse Elsa, Bastien, Cec, Hélène, Laure, Audrey, Thierry, Pauline...mais aussi à ma « belle-famille » : Mimi, Lo et Jo.

Une pensée pour tous mes proches, et particulièrement pour mes parents sans qui tout ceci n'aurait pas été possible. Je les remercie pour leur soutien et leur confiance.

Enfin, un grand merci à Hervé qui m'a entouré de son amour, sa sérénité, son calme, son attention et sa confiance, de la Martinique et à Montpellier. Merci d'être là pour moi.

A mes parents

A « Bon-Père »

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I) <u>Généralités</u>	2
1) <u>Découverte de l'horloge circadienne</u>	2
2) <u>Valeur adaptative de l'horloge</u>	4
II) <u>Un système circadien complexe.</u>	6
<u>Le système circadien repose sur un mécanisme moléculaire complexe.</u>	6
<u>1.1) Identification des gènes horloges.</u>	6
<u>1.2) Mécanisme de base de l'horloge moléculaire des Mammifères.</u>	6
<u>1.3) Complexité du mécanisme moléculaire des Mammifères.</u>	7
1.3.1) <u>Boucles secondaires et régulations de l'horloge moléculaire</u>	7
1.3.2) <u>Redondance génétique</u>	9
<u>Une organisation complexe : une multitude d'oscillateurs.</u>	10
<u>2.1) Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) : une horloge centrale.</u>	10
2.1.1) <u>NSC : Histoire et fonctionnement circadien endogène.</u>	11
2.1.2) <u>NSC : une structure et un fonctionnement complexe.</u>	12
2.1.2.1) <u>Structure complexe.</u>	12
2.1.2.2) <u>Fonctionnement complexe.</u>	13
2.1.2.2.1) <u>Différences entre les parties ventrales et dorsales</u>	13
2.1.2.2.1) <u>Oscillateurs du soir et du matin</u>	14
<u>2.2) Organes périphériques : une multitude d'oscillateurs périphériques.</u>	16
2.2.1) <u>Découverte des horloges périphériques</u>	16
2.2.2) <u>Mécanisme moléculaire des horloges périphériques</u>	16
2.2.3) <u>Propriétés des oscillateurs périphériques</u>	16

<u>2.3) Autres oscillateurs du système circadien</u>	19
<u>2.3.1) L'horloge liée à l'alimentation</u>	19
<u>2.3.1.1) Activité locomotrice anticipatoire (FAA)</u>	19
<u>2.3.1.2) Support anatomique</u>	20
<u>2.3.2.3) Support moléculaire : indépendance des gènes horloges ?</u>	21
<u>2.3.2) L'horloge liée aux méthamphétamines (MASCO)</u>	22
<u>Entraînement du système circadien.</u>	23
<u>3.1) Entraînement par la lumière.</u>	23
<u>3.1.1) Exposition à la lumière et décalages de phase.</u>	23
<u>3.1.2) Intégration et transfert du message lumineux.</u>	24
<u>3.2) Entraînement par la nourriture.</u>	27
III) <u>Les pulsatilités endocrines</u>	30
<u>Différents types de pulsatilités contrôlées par l'hypothalamus.</u>	31
<u>Mécanismes intrinsèques à l'hypophyse.</u>	38
<u>2.1) Un fonctionnement pulsatile autonome.</u>	38
<u>2.2) Mécanismes intracellulaires participant aux pulsatilités hypophysaires.</u>	39
<u>2.2.1) Au niveau cellulaire.</u>	39
<u>2.2.2) Au niveau tissulaire</u>	40
<u>2.3) Mécanismes intercellulaires participant aux sécrétions hypophysaires</u>	41
<u>2.3.1) Communications intercellulaires paracrines.</u>	42
<u>2.3.2) Communication intercellulaire par un couplage électrique.</u>	44
<u>2.3.3) Communications intercellulaires organisées en réseau.</u>	45
<u>2.3.3.1) Réseau excitable de cellules folliculostélaires</u>	45
<u>2.3.3.2) Réseau fonctionnel de cellules endocrines</u>	46
IV) <u>Problématique</u>	48

MATERIELS ET METHODES

<u>1. Expériences de RT-PCR-quantitative</u>	51
<u>2. Expériences d'immunofluorescences.</u>	55
<u>3. Surrénalectomie</u>	56
<u>4. Dosages d'hormones et phéromones</u>	56
<u>5. Caractérisation de la fonction de reproduction et de lactation</u>	57
<u>6. Frottis vaginaux.</u>	57

RESULTATS

PARTIE I : 60

PULSATILITES NON-CIRCADIENNES CONTRÔLEES PAR L'HORLOGE CIRCADIENNE

1) L'horloge circadienne contrôle la pulsativité ultradienne de GH. 60

Publication :

The Circadian Clock Components CRY1 and CRY2 Are Necessary to Sustain Sex Dimorphism in Mouse Liver Metabolism.

2) Cycles infradiens liés à la fonction de reproduction. 67

PARTIE II : 76

CARACTERISATION DE L'HORLOGE HYPOPHYSAIRE.

1) Expression des gènes et protéines horloges dans l'hypophyse. 77

2) L'hypophyse une horloge complexe au cœur du système circadien. 85

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 93

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 101

LISTE DES PUBLICATIONS 126

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Les figures numérotées de 1 à 33 représentent les illustrations du texte.

Figure 1 :	Rythme journalier du positionnement des feuilles d'un plant de haricot.	2
Figure 2:	Enregistrement de l'activité locomotrice d'une souris nocturne.	3
Figure 3 :	Pourcentage de survie des drosophiles en fonction de leur environnement lumineux.	5
Figure 4 :	Mécanisme de l'horloge.	8
Figure 5 :	Exemple de redondance génétique observée dans les gènes Cry1 et Cry2.	9
Figure 6 :	Localisation des noyaux suprachiasmtiques chez un hamster.	11
Figure 7 :	Structure des noyaux suprachiasmatiques.	13
Figure 8 :	vNSC et dmNSC 2 sous parties des NSC et 2 oscillateurs indépendants.	14
Figure 9 :	Représentation schématique du contrôle des activités du matin et du soir chez la drosophile.	15
Figure 10 :	Désynchronisation des fibroblastes en cultures.	17
Figure 11:	Oscillations persistantes d'explants de tissus périphériques.	18
Figure 12 :	La FAA est indépendante des NSC : Un accès limité à la nourriture restaure le rythme journalier d'activité locomotrice d'animaux arythmiques.	20
Figure 13 :	Schéma représentatif de la courbe de phase réponse récapitulant les différents décalages de phases observés pour chaque stimulus lumineux.	24
Figure 14 :	Intégration de l'information photique.	26
Figure 15 :	Entraînement de l'horloge hépatique par la nourriture.	28
Figure 16 :	Anatomie de l'hypophyse et du système porte hypothalamo-hypophysaire.	31
Figure 17 :	Représentation des différents axes hypothalamo-hypophysaires et périphériques.	32

Figure 18 :	Sécrétion circadienne de l'ACTH par l'antéhypophyse, chez un rat.	33
Figure 19 :	Régulation de la pulsativité ultradienne de la GH par les rythmes hypothalamiques.	35
Figure 20 :	Evolution de la sécrétion de GH avec l'âge, chez le rat.	36
Figure 21 :	Sécrétion infradienne de la LH par l'antéhypophyse, chez une ratte.	37
Figure 22 :	Pulsativité hypophysaire autonome de la sécrétion d'hormone de croissance.	39
Figure 23 :	Enregistrement de l'activité calcique spontanée de différents types cellulaires endocrines, réalisés sur tranches aigues d'hypophyse.	41
Figure 24 :	Facteurs paracrines de l'antéhypophyse.	43
Figure 25 :	Exemple d'un enregistrement de l'activité calcique spontanée de plusieurs cellules maintenues dans leur environnement tissulaire.	44
Figure 26 :	Illustration de la propagation de signaux calciques, à longue distance, au sein de l'antéhypophyse.	46
Figure 27 :	Organisation tridimensionnelle du réseau de cellules somatotropes (GH) au sein de l'antéhypophyse.	47
Figure 28 :	L'antéhypophyse : un oscillateur circadien autonome.	48
Figure 29 :	Expression de PER1 dans les Noyaux Suprachiasmatiques (NSC).	55
Figure 30 :	Cytologie vaginale.	58
Figure 31 :	Dimorphisme sexuel de la sécrétion ultradienne de GH chez les rats.	61
Figure 32:	La fonction de reproduction repose sur différents cycles infradiens.	67
Figure 33 :	Représentation schématique des voies de contrôle de l'ovulation par l'horloge circadienne interne.	100

Les figures numérotées de R1 à R13 sont les figures de résultats.

Figure R1 : Altération du dimorphisme sexuel dans l'expression des gènes dépendants de la pulsativité GH, chez les souris <i>Bmal1</i> ^{-/-} .	65
Figure R2 : Altération de l'horloge circadienne et irrégularité des cycles oestriens de la reproduction.	72
Figure R3 : Altération de la maturation folliculaire.	73
Figure R4 : Etude de paramètres reflétant indirectement la fonctionnalité de l'axe lactotrope, lors de la gestation.	74
Figure R5 : Altération de la lactation chez les femelles <i>Cry1</i> ^{-/-} <i>Cry2</i> ^{-/-} .	75
Figure R6 : Expression des principaux gènes horloges, in-vivo, dans l'hypophyse.	81
Figure R7 : Le rythme d'expression des gènes horloges a la même phase dans le foie et l'hypophyse.	82
Figure R8 : Expression de PER1 dans les cellules endocrines de l'hypophyse.	83
Figure R9 : Expression de PER1 au cours du cycle circadien dans les cellules ACTH.	84
Figure R10 : Etude de la durée des jours sur les rythmes des horloges hépatique et hypophysaire.	89
Figure R11 : Effets d'une inversion de la prise alimentaire sur l'expression de <i>Per2</i> et <i>Bmal1</i> .	90
Figure R12 : Comportement de l'horloge des cellules ACTH et GH, lors d'une inversion de la prise alimentaire.	91
Figure R13 : Les glucocorticoïdes ne sont pas responsables de l'entraînement de l'horloge hypophysaire.	92

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACTH: Adreno-CorticoTropin Hormone	Kp : Kisspeptin
AVP: Aginine Vasopressine	LD : Light/Dark Alternance jour/nuit
AVPV : région périvericulaire antérieure	LH: Luteinizing Hormone
bHLH : basic-Helix-Loop-Helix	M: Morning Oscillator
Bmal1/BMAL1: Brain and Muscle ARN-t like protein 1	MASCO: Méthamphétamine Sensitive Circadian Oscillator
Clock/CLOCK: Circadian Locomotor Output Kaput	NSC: Noyaux Suprachiasmatiques
CRH : Corticotropin-Releasing Hormone	Npas2/NPAS2 : Neuronal PAS
Cry/CRY : Cryptochrome	NRF: Nighttime Restricted Feeding
CYP P450 : Cytochromes P450	PAS : Period-Arnt-Sim
DD : Dark-Dark (Obscurité constante)	Per/PER : Period
DMH : Hypothalamus Dorsomedian	PRL : Prolactine
dmNSC : Noyaux Suprachiasmatiques Dorsomédial	PVN: Noyaux Paraventriculaires
DRF: Daytime Restricted Feeding	Reverb α/REVERBα : Resersal Viral Erythroblastis Oncogen Product
E : Evening oscillator	Rora/RORα: Retinoic acid-related Orphan Receptor
FAA: Food Anticipatory Activity	RHT: Tractus Rétinohypothalamique
FS: Cellule Folliculostellaire	SIRH: Somatotropin Release Inhibiting Hormone ou somatostatine
FSH: Follicule-Stimulating Hormone	vNSC: Noyaux Suprachiasmatiques Ventrolatéral
GH: Growth Hormone	VMH: Noyaux Hypothalamique Ventromedian
GHRH: Growth Hormone Releasing Hormone	ZT: Zeitgeber Time
GnRH: Gonadotrophin Releasing Hormone	

INTRODUCTION

I) Généralités.

1) Découverte de l'horloge circadienne

Depuis longtemps, l'étude des phénomènes rythmiques a conduit à de multiples observations. En effet, notre vie est rythmée par les battements du cœur, par le cycle veille/sommeil, et par les variations journalières de nombreux paramètres internes tels que les sécrétions hormonales ou la température corporelle. Ces variations journalières sont reliées aux variations de l'environnement, comme les alternances régulières et prévisibles du jour et de la nuit, dues au fait que la Terre tourne sur elle-même en 24 heures. Ainsi, la notion de rythme du vivant a été décrite dès 325 avant J-C par Androsthène Thasius. Il observait que les feuilles de certaines plantes (notamment *Tamarindus Indicus*) n'occupaient pas la même position le jour et la nuit (Figure1).

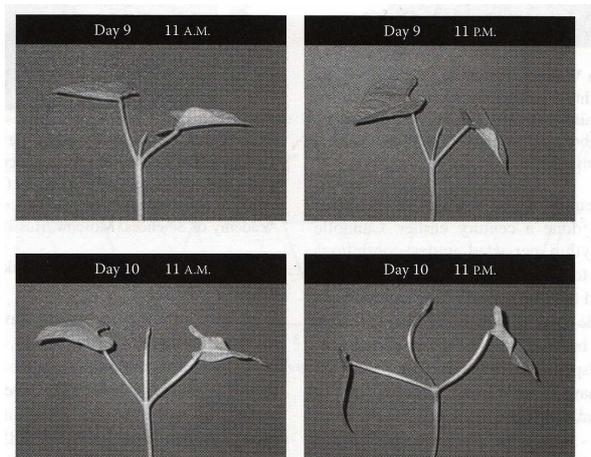


Figure 1 : Rythme journalier du positionnement des feuilles d'un plant de haricot.

Les feuilles de ce plant sont redressées pendant la journée (à gauche) et retombent la nuit (à droite).

(Circadian Physiology, de R. Refinetti, seconde édition)

En 1729, Jean-Jacques Dortous de Mairan publie des observations cruciales pour l'étude des rythmes. Il démontre que le mouvement des feuilles d'un végétal (la Sensitive : *Mimosa pudica*) suit un rythme dont la période est d'environ 24 heures, lorsque la plante est placée dans un environnement lumineux cyclique (LD), c'est-à-dire avec une alternance de phase de jour et de nuit. Mais, de façon surprenante, ce rythme journalier persiste aussi

lorsque la plante est placée en obscurité constante (DD), montrant ainsi le **caractère endogène** des rythmes journaliers alors appelés **rythmes circadiens** (circa= autour, diem = jour, soit d'environ 24 heures) du vivant.

Plus tard, au début du 20^{ème} siècle, d'autres travaux mettent aussi en évidence la présence d'un fonctionnement rythmique circadien endogène, chez les animaux. Lorsque ceux-ci sont placés dans un environnement lumineux constant (LL ou DD), ils conservent leur rythme d'activité. Ainsi, chez les drosophiles qui ont une activité diurne, lorsqu'elles sont placées en obscurité constante (DD), l'éclosion des drosophiles adultes à partir des pupes n'a lieu que pendant les cinq premières heures du jour subjectif, c'est-à-dire pendant la phase qui correspondait précédemment à la phase de jour (Pittendrigh, 1954). Chez les Mammifères, l'étude des rythmes de l'activité locomotrice des souris, en condition de lumière constante (LL), montre qu'il existe aussi un rythme circadien endogène (Johnson, 1939). L'enregistrement de l'activité locomotrice de ces animaux nocturnes montre que, dans un environnement lumineux rythmique (12L:12D), l'activité locomotrice suit une période d'exactly 24 heures, en phase avec la période de nuit (Figure 2). Lorsque les souris sont ensuite placées en obscurité constante (DD), elles ne disposent plus des repères temporels de leur environnement. Cependant, dans ces conditions de « libre cours », l'activité locomotrice demeure rythmique et persiste pendant la nuit subjective.

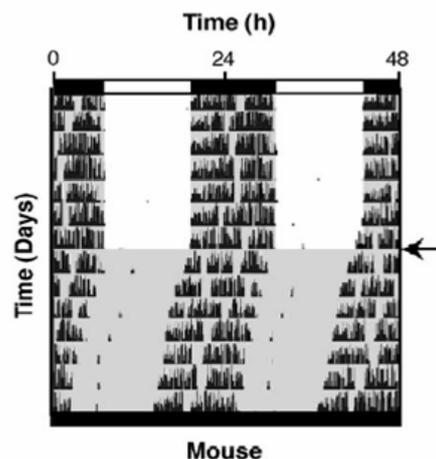


Figure 2: Enregistrement de l'activité locomotrice d'une souris nocturne.

Enregistrements représentatifs de l'activité locomotrice de roue en double représentation. Les animaux sont maintenus en conditions LD12:12 (barres horizontales blanches et noires en haut), avant d'être placés en obscurité constante (barre horizontale noire en bas) au moment indiqué par la flèche. Les zones grisées symbolisent l'obscurité. La souris, nocturne, présente un rythme circadien d'activité locomotrice nettement marqué pendant la nuit. En libre cours (obscurité constante = DD), le décalage de l'activité vers la gauche illustre le fait que le rythme locomoteur devient légèrement inférieur à 24h.

(d'après Dardente H, et al., 2004)

Comme nous pouvons le voir sur la figure 2, l'enregistrement de l'activité locomotrice des souris placées en DD dérive vers la gauche. Cette dérive démontre que l'animal possède un **système endogène de mesure du temps** dont la période n'est pas rigoureusement de 24 heures mais s'en approche. Ce système est le **système circadien endogène ou horloge circadienne interne**. Ainsi, en condition LD, l'horloge interne est remise à l'heure chaque jour par les variations de l'environnement, afin d'assurer une synchronisation exacte de l'activité locomotrice avec les cycles extérieurs de 24 heures.

Chez les Humains, J. Aschoff montre, par des mesures de température corporelle et des mesures sur les urines, que, lorsqu'ils sont placés en conditions 12 heures de jour et 12 heures de nuit (12L/12D), les deux paramètres mesurés ont des rythmicités journalières (Aschoff, 1965). Il montre aussi que des Hommes qui vivent isolés de toutes variations environnementales, continuent à avoir un fonctionnement rythmique dont la période est supérieure à 24 heures (25,9h). Il en conclut ainsi qu'ils possèdent **une horloge interne**.

L'ensemble de ces travaux, depuis l'Antiquité jusqu'au 20ème siècle, a fait émerger la notion **d'horloge circadienne interne** présente dans la grande majorité des espèces étudiées, des Cyanobactéries aux Mammifères, en passant par les champignons, les plantes, les insectes, les poissons, les reptiles et les oiseaux.

2) Valeur adaptative de l'horloge

L'acquisition d'une horloge interne circadienne permet aux organismes de pouvoir **anticiper** les variations environnementales et ainsi **d'adapter** leurs comportements. **L'horloge circadienne aurait donc une valeur adaptative** (Johnson, 2005). Lorsque des drosophiles sont maintenues dans différentes conditions environnementales (en LL ou en LD avec des rythmes ayant différentes périodes 21, 24 et 27 heures), celles qui ont la meilleure probabilité de survie sont celles qui sont placées en LD avec une période de 24 heures (Pittendrigh and Minis, 1972) (Figure 3). De même, chez des animaux qui présentent une altération de l'horloge circadienne, la durée de vie est affectée, suggérant que l'horloge circadienne permet une meilleure adéquation de l'organisme avec son environnement (Hurd and Ralph, 1998; Klarsfeld and Rouyer, 1998; Woelfle et al., 2004).

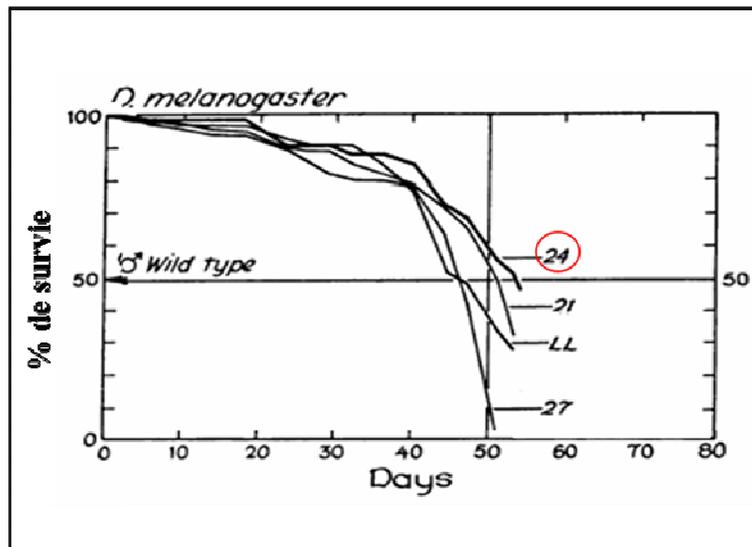


Figure 3 : Pourcentage de survie des drosophiles en fonction de leur environnement lumineux.

Les drosophiles maintenues dans un environnement rythmique d'une période de 24 heures (en rouge) avec 12 heures de jour et 12 heures de nuit vivent le plus longtemps, suggérant une meilleure adéquation avec leur environnement.

(d'après Pittendrigh CS, 1972)

L'intérêt adaptatif de l'horloge circadienne est également visible chez les Hommes. En effet, des personnes atteintes par le FASP (Familial Advanced Sleep Phase Syndrome) ont une horloge interne dont la période est diminuée, provoquant une avance de quelques heures des phases de sommeil (Toh et al., 2001; Xu et al., 2005). Ces personnes présentent beaucoup de difficultés à s'adapter aux rythmes de vie de la société, basés sur 24 heures.

En résumé, la majorité des organismes vivants possède la notion intrinsèque du temps. Ils présentent ainsi un système circadien, fonctionnant sur environ 24 heures, et dont l'intérêt adaptatif serait de permettre une adéquation harmonieuse entre l'organisme et son environnement.

II) Un système circadien complexe.

1) Le système circadien repose sur un mécanisme moléculaire complexe.

Suite à la découverte de l'horloge circadienne interne, chez une grande partie des organismes vivants, différentes études ont mis en évidence **le caractère génétique de l'endogénicité des rythmes circadiens**. Ces études permettent aujourd'hui de dire que le système circadien endogène repose sur un mécanisme moléculaire complexe, impliquant l'expression de différents gènes horloges.

1.1) Identification des gènes horloges.

C'est d'abord chez les Drosophiles que plusieurs mutants ayant une période endogène altérée, ont été décrits (Konopka and Benzer, 1971) et les gènes porteurs de ces mutations identifiés (Bargiello et al., 1984; Dunlap, 1999). Chez les Mammifères, la première évidence d'un support génétique a été observée à partir de la découverte de la mutation spontanée *Tau* qui diminue la période endogène de l'activité locomotrice chez le hamster (Ralph and Menaker, 1988). L'ensemble de ces travaux a alors suscité un grand intérêt pour la recherche des gènes, qualifiés de **gènes horloges**, responsables du fonctionnement circadien des organismes. Des expériences de mutagenèse et de clonage ont ainsi fait émerger un ensemble de gènes contrôlant des rythmicités circadiennes. Chez les Mammifères, le premier gène horloge découvert est le gène *Clock* pour « Circadian Locomotor Output Kaput » (Vitaterna et al., 1994). Par la suite une dizaine d'autres gènes ont été identifiés : *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Reverb- α* , *Ror- α*

1.2) Mécanisme de base de l'horloge moléculaire des Mammifères.

Les découvertes des différents gènes horloges ont permis de proposer **un modèle d'horloge moléculaire basé sur une boucle de rétrocontrôle fonctionnant sur 24 heures** (Panda et al., 2002b) (Figure 4, rectangle bleu). Cette boucle moléculaire contrôle l'expression de gènes : les "**gènes contrôlés par l'horloge**" (CCG, clock controlled genes), qui sont les voies de sortie des messages rythmiques. Le mécanisme moléculaire est le

suivant : Les facteurs de transcriptions CLOCK et BMAL1 s'hétérodimérisent (via leur domaine PAS : Period-Arnt-Sim) et activent la transcription des gènes *Period (1-3)* et *Cryptochrome (1-2)*, en se liant à l'ADN (via leur domaine bHLH-PAS : basic-Helix-Loop-Helix) au niveau d'une E-box (Gekakis et al., 1998; Hogenesch et al., 1998), une séquence régulatrice de la transcription génique (Figure 4, rectangle bleu). En retour, les protéines PER (1-3) et CRY (1-2) s'hétérodimérisent (via leur domaine PAS) et migrent alors dans le noyau (Lee et al., 2001), où elles inhibent l'activité transcriptionnelle du dimère CLOCK / BMAL1, ainsi que leur propre transcription (Kume et al., 1999; Shearman et al., 2000) (Figure 4, rectangle bleu).

Ainsi, le mécanisme moléculaire de l'horloge est formé principalement d'une boucle de rétrocontrôle comprenant une composante positive (CLOCK / BMAL1) et une composante négative (avec l'hétérodimère PER1-2/CRY1-2). Un cycle complet de cette boucle dure environ 24 heures.

L'ensemble des espèces, allant d'organismes simples comme la bactérie, et les champignons, à des organismes plus complexes comme les mouches et les Mammifères qui ont un fonctionnement circadien, exprime aussi des gènes horloges. Et, chez ces espèces, le mécanisme de base de l'horloge moléculaire reposant, en partie, sur une boucle de rétrocontrôle est conservé (Bell-Pedersen et al., 2005). Cependant, chez les Mammifères, le mécanisme moléculaire de l'horloge présente une complexité supplémentaire.

1.3) Complexité du mécanisme moléculaire des Mammifères

1.3.1) Boucles secondaires et régulations de l'horloge moléculaire

En plus de la boucle moléculaire d'autocontrôle que nous venons de décrire, l'horloge moléculaire des Mammifères est composée de boucles secondaires qui permettent la régulation des acteurs de la boucle principale d'autocontrôle (Figure 4, rectangle bleu).

Les boucles secondaires permettent **les régulations transcriptionnelles** des gènes de la boucle principale. Ainsi le gène *Reverba* dont la transcription est activée par le dimère CLOCK/BMAL1, produit une protéine qui inhibe la transcription de *Bmal1* (Preitner et al., 2002; Triqueneaux et al., 2004) (Figure 4, rectangle vert).

A l'inverse, le gène *Rora*, exprimé de façon cyclique, agit sur la boucle moléculaire principale en activant la transcription de *Bmal1* (Guillaumond et al., 2005) (Figure 4, rectangle vert).

Il existe aussi de nombreuses **régulations post-traductionnelles** des protéines horloges de la boucle moléculaire principale (phosphorylations, SUMOylations, ubiquitinations ...) (Figure 4, rectangle orange). Elles permettent d'assurer le trafic intracellulaire, la fonctionnalité et la dégradation des protéines horloges qui sont cruciales pour le fonctionnement de la boucle moléculaire sur 24 heures (Takahashi et al., 2008).

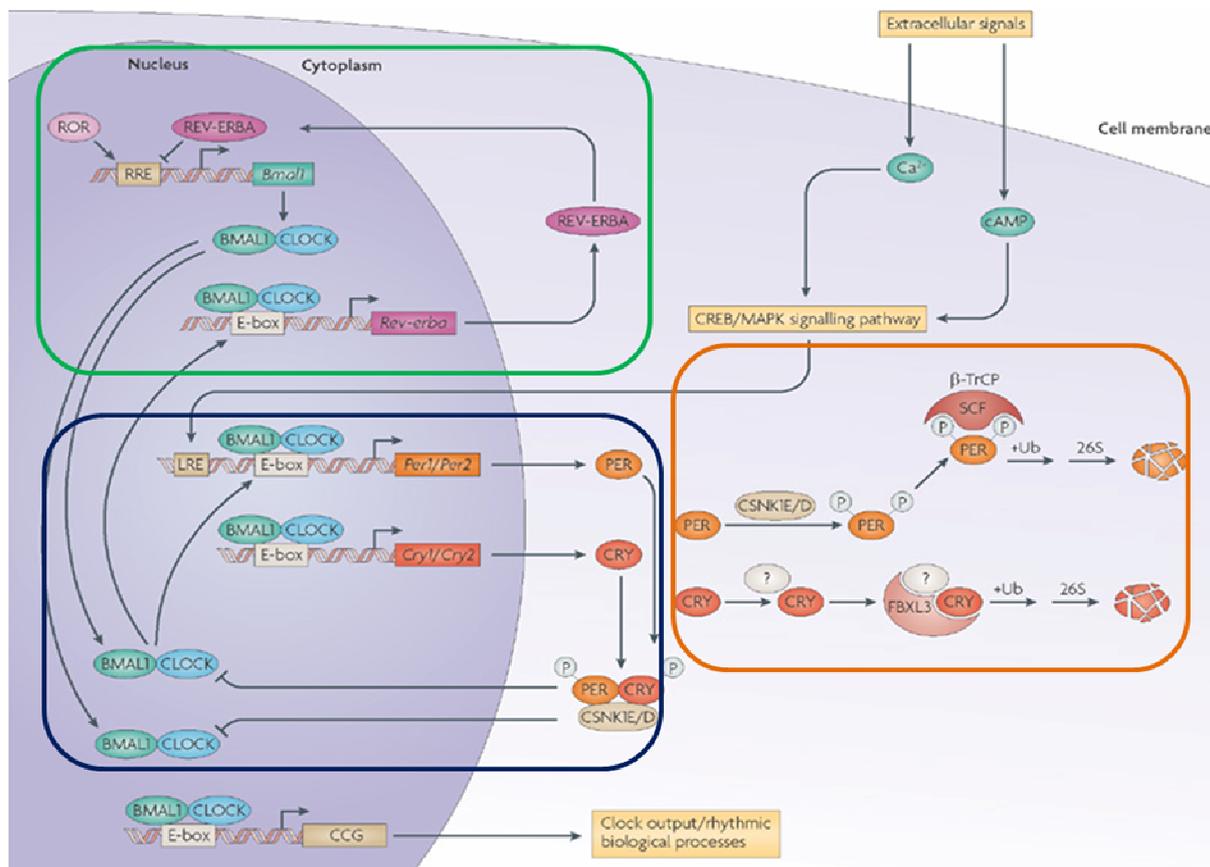


Figure 4 : Mécanisme de l'horloge moléculaire : Une boucle de rétrocontrôle moléculaire et des boucles secondaires qui permettent les régulations transcriptionnelles et traductionnelles.

Représentation des événements moléculaires dans une cellule. La boucle d'autocontrôle est représentée dans le rectangle bleu, les boucles secondaires à la base des mécanismes de régulations transcriptionnelles sont dans le rectangle vert, et des régulations post-traductionnelles sont dans le rectangle orange.

(d'après Ko et Takahashi J.S. 2006)

1.3.2) Redondance génétique

Chez les Mammifères, il existe aussi de nombreuses **redondances génétiques** dans les gènes du mécanisme moléculaire de l'horloge. La plupart des gènes horloges sont dupliqués et sont redondants (ex : *Cry1* et *Cry2* etc.), ainsi l'inactivation d'un seul des deux gènes n'a souvent que peu d'effet sur le fonctionnement circadien. Par exemple, l'analyse de l'activité locomotrice indique que les souris invalidées pour les deux gènes *Cry1* et *Cry2* (double knock-out) sont arythmiques en DD, alors que les souris *knock-out* uniquement pour *Cry1* ou *Cry2* ne le sont pas malgré le changement de période en DD (van der Horst et al., 1999) (Figure 5). La perte de rythmicité en DD n'étant observée que chez les animaux présentant une inactivation des deux gènes *Cry*, la présence d'un des deux gènes est donc suffisante pour maintenir un fonctionnement rythmique, suggérant la redondance partielle entre *Cry1* et *Cry2* (van der Horst et al., 1999). De la même manière, les différentes souris *knock-out* des gènes *Period(1-3)* montrent qu'il existe des redondances entre les gènes *Per1*, *Per2*, et *Per3* (Bae et al., 2001; Takahashi, 2004). A l'inverse, il existe un analogue, de la protéine BMAL1, BMAL2, qui ne semble pas être suffisant pour entrainer le mécanisme moléculaire de l'horloge (Bunger et al., 2000; Kondratov et al., 2006).

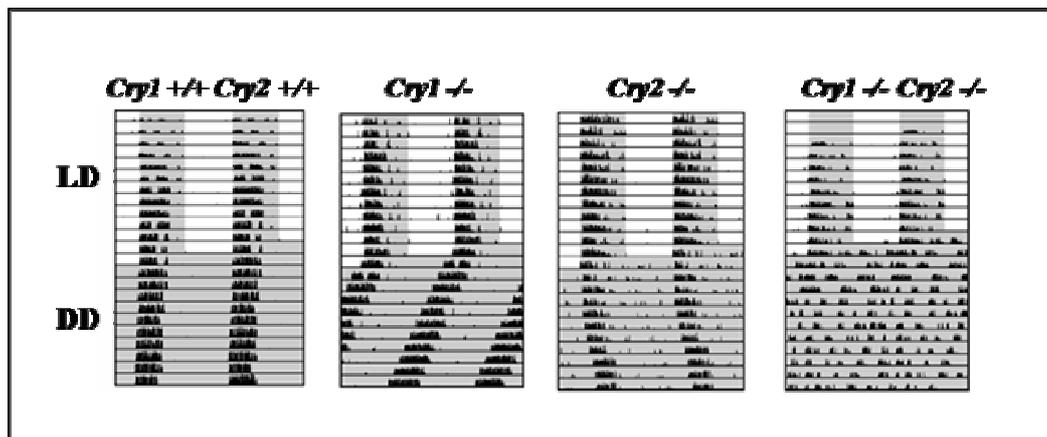


Figure 5 : Exemple de redondance génétique observée dans les gènes *Cry1* et *Cry2*.

Les souris sauvages (*Cry1*^{+/+}*Cry2*^{+/+}) ont une activité locomotrice circadienne en LD et en DD. Les souris *knock-out* pour *Cry1* ou *Cry2* ne sont pas arythmiques, mais leur période change en DD. Elle diminue chez les souris *Cry1*^{-/-} et augmente chez les souris *Cry2*^{-/-}. Lorsque les 2 gènes sont inactivés, (souris *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-}) les souris n'ont plus d'activité circadienne en DD.

(d'après van der Horst GT, 1999)

Pourquoi une telle redondance est-elle présente dans le système moléculaire de l'horloge ? Un élément de réponse est apporté par la découverte du gène *Npas2*, un analogue de *Clock* (Reick et al., 2001). La protéine NPAS2 peut se dimériser avec BMAL1 en absence de CLOCK, et activer ensuite la transcription des gènes *Per* et *Cry*, la composante négative de l'horloge. Ainsi, les souris ayant une invalidation du gène *Clock* (DeBruyne et al., 2006) ou de *Npas2* (Dudley et al., 2003) conservent leur fonctionnement rythmique en DD, puisqu'un phénomène de compensation du gène invalidé se met en place grâce à son homologue. Par contre, les souris invalidées pour les deux gènes à la fois *Clock* et *Npas2*, sont très rapidement arythmiques en DD (DeBruyne et al., 2007a), puisqu'aucune compensation n'est possible. Cette compensation entre les deux gènes *Clock* et *Npas2* est, cependant, particulière. Des études montrent que ces deux gènes pourraient avoir un rôle différentiel selon le tissu dans lequel ils sont exprimés (DeBruyne et al., 2007a; DeBruyne et al., 2007b).

En résumé, chez les Mammifères, le système circadien repose sur un support génétique. L'expression des gènes horloges et leurs interactions forment une boucle moléculaire d'autocontrôle qui fonctionne sur 24 heures. La présence de boucles secondaires et de redondances dans les gènes horloges rend ce mécanisme plus complexe.

2) Une organisation complexe : une multitude d'oscillateurs.

Chez les Mammifères, l'horloge moléculaire est exprimée dans une multitude de cellules, tissus et organes, responsables de l'existence de plusieurs oscillateurs, engendrant une organisation complexe du système circadien.

2.1) Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) : une horloge centrale.

Chez les Mammifères, l'horloge moléculaire est exprimée dans les Noyaux Suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus, considérés comme le site de l'horloge centrale du système circadien.

2.1.1) NSC : Histoire et fonctionnement circadien endogène.

Depuis les années 1970, des expériences de lésions, chez les Mammifères, ont permis de mettre en évidence un **centre rythmique** considéré comme le site de l'horloge circadienne situé dans les **noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC)** (Moore and Eichler, 1972; Rusak and Zucker, 1979) (Figure 6). La destruction des NSC conduit à la perte de différents rythmes physiologiques circadiens tels que l'activité locomotrice (Rusak and Zucker, 1979). A l'inverse, la greffe de neurones de NSC fœtaux permet, après la lésion des NSC, de restaurer le rythme locomoteur (Ralph and Lehman, 1991). En 1990, Ralph et collaborateurs apportent la preuve de l'implication des NSC dans les rythmes physiologiques en démontrant que la période des rythmes en libre cours est imposée par les NSC. Pour cela, ils ont utilisé des hamsters homozygotes pour la mutation du gène *Tau* responsable de la diminution de la période endogène de l'activité locomotrice (20,2h). Les résultats démontrent que la destruction de leurs NSC, suivi de la greffe de NSC issus de fœtus sauvages permet de restaurer la période observée chez les animaux sauvages (24,1h) (Ralph et al., 1990; Ralph and Menaker, 1988).

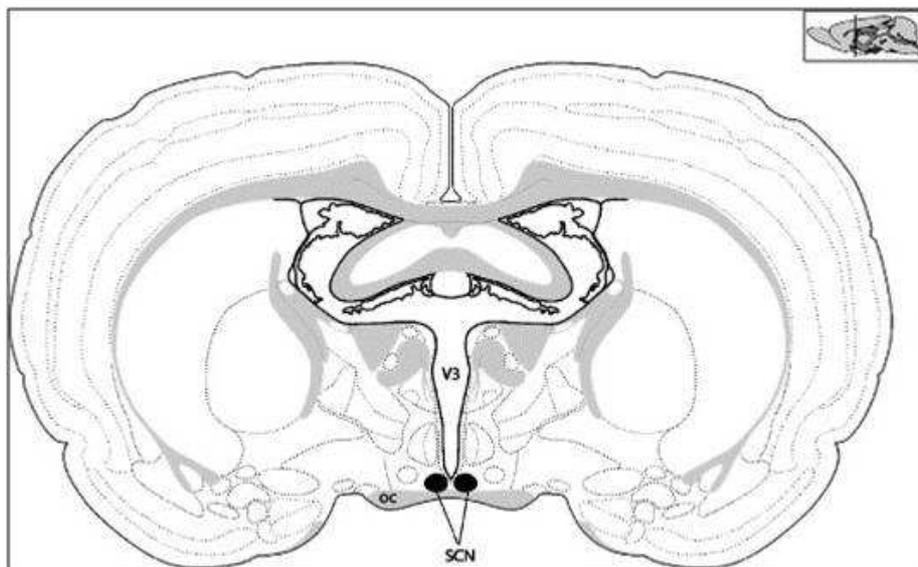


Figure 6 : Localisation des noyaux suprachiasmatiques chez un hamster.

V3 : 3^{ème} ventricule, OC : chiasma optique ; NSC : noyaux suprachiasmatiques.

(d'après Kriegsfeld and Silver, 2006)

Depuis ces études pionnières, il est bien établi que chez de nombreuses espèces de Mammifères, les NSC contrôlent et coordonnent de nombreuses fonctions physiologiques et comportementales circadiennes (Hastings and Herzog, 2004; Kriegsfeld and Silver, 2006).

D'autre part, les NSC ont un fonctionnement circadien intrinsèque. En effet, cette structure présente, *in-vivo*, des activités cycliques **métabolique** (Schwartz et al., 1980; Schwartz and Gainer, 1977), **électrique** (Inouye and Kawamura, 1979; Meijer et al., 1997) et **sécrétoire** (Reppert et al., 1983; Schwartz et al., 1983). De plus, l'activité électrique circadienne persiste, *ex-vivo*, sur tranches (Green and Gillette, 1982; Shibata et al., 1982) ainsi que dans des neurones isolés issus des NSC (Liu et al., 1997; Welsh et al., 1995). Cependant, tous les neurones des NSC ne présentent pas une activité cyclique (Honma et al., 1998; Jobst and Allen, 2002).

Plusieurs travaux montrent **une corrélation entre l'expression des gènes horloges et l'activité électrique des neurones des NSC** (Kuhlman and McMahon, 2004; Quintero et al., 2003). Par exemple, les souris double *knock-out* pour les gènes *Cry1* et *Cry2* (*Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*), qui sont arythmiques en DD (cf figure 12), ont perdu la rythmicité circadienne de leur fréquence de décharge (Albus et al., 2002).

2.1.2) NSC : une structure et un fonctionnement complexe.

2.1.2.1) Structure complexe.

Les NSC possèdent une structure extrêmement complexe. Chez les Hamsters, l'étude des neuropeptides exprimés par les neurones des NSC a permis de subdiviser ceux-ci en deux sous-parties anatomo-fonctionnelles (Figure 7) :

- une partie **ventromédiane (vlNSC)** (ou « **core** ») constituée de neurones exprimant deux types de neuropeptides : VIP (Vasoactive intestinale peptide) et GRP (Gastrin releasing peptide). Cette partie est impliquée dans l'intégration de **signaux afférents**.
- une partie **dorsomédiane (dmNSC)** (ou « **shell** ») constituée de neurones exprimant l'AVP (Vasopressine) qui est à l'origine de la plus part des signaux **efférents** des NSC.

Il semble que ces subdivisions, décrites chez les Hamsters, sont présentes chez la majorité des Mammifères, mais elles ne sont pas forcément toujours rigoureusement les mêmes selon l'espèce considérée.

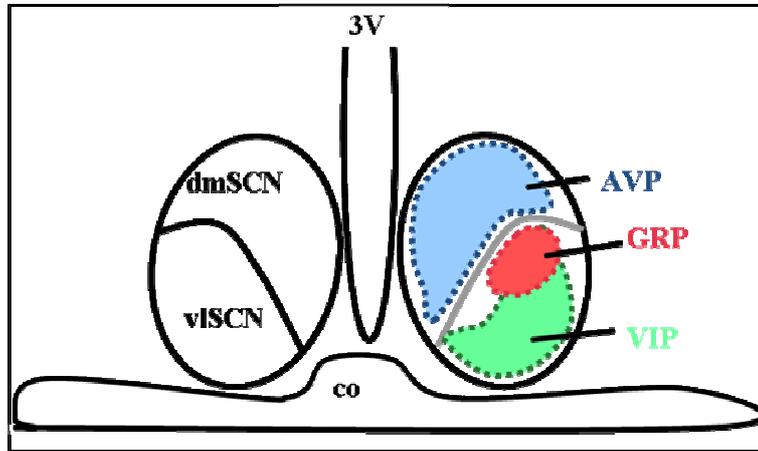


Figure 7 : Structure des noyaux supra-chiasmatiques.

Les NSC sont subdivisés en deux parties : la partie dorsomédiane (dmNSC) et la partie ventromédiane (vNSC). A droite sont représentés les différents types de neurones selon le peptide qu'ils contiennent : AVP = Arginine Vasopressine, GRP= gastrin releasing peptide, VIP= vasoactive intestinale peptide.

2.1.2.2) Fonctionnement complexe.

2.1.2.2.1) Différences entre les parties ventrales et dorsales

Chez les Hamsters, les deux parties, dorsales et ventrales des NSC, sont constituées de deux populations de neurones possédant une activité synchrone soutenue par un réseau de neurones gabaergiques (Albus et al., 2005) (Figure 8A). Cependant, l'activité électrique de ces deux populations neuronales peut être découplée, montrant que ces deux populations fonctionnent aussi de façon indépendante (Albus et al., 2005) (Figure 8 A). En effet, un décalage de phase est observé entre les deux populations de neurones lorsque les parties ventrales et dorsales des NSC sont séparées (Albus et al., 2005) (Figure 8B).

Ainsi, les parties ventrales et dorsales des NSC sont deux structures anatomiquement différentes. Ce sont également des oscillateurs indépendants dont l'activité peut être synchronisée. Ceci confère aux NSC une structure complexe qui présente une réalité fonctionnelle.

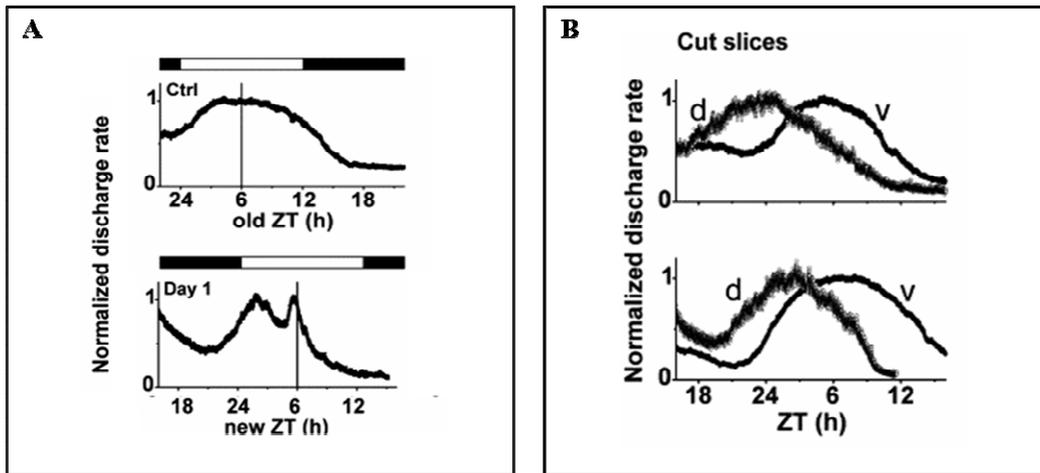


Figure 8 : *v*lNSC et *dm*NSC 2 sous parties des NSC et 2 oscillateurs indépendants.

(A) Le graphe du haut montre qu'en condition standard les 2 populations de neurones sont synchrones. Le graphe du bas indique qu'un décalage de 6 heures dans le cycle LD entraîne un découplage des neurones, identifiant 2 populations distinctes. (B) Les 2 parties *v*lNSC (*v*) et *dm*NSC (*d*) des NSC sont séparées et reflètent clairement un fonctionnement indépendant.

(d'après Albus H, et al., 2005)

Bien que les parties ventrales et dorsales soient responsables d'une certaine complexité anatomique et fonctionnelle dans les NSC, la présence d'autres oscillateurs au sein des NSC ajoute un degré de complexité.

2.1.2.2.1) Oscillateurs du soir et du matin

Un modèle proposé par Pittendrigh en 1976 suppose l'existence de deux oscillateurs circadiens: **un oscillateur du matin (M, "morning") entraîné par les transitions nuit/jour et un oscillateur du soir (E, "evening") entraîné par les transitions jour/nuit** (Pittendrigh, 1976). Cette hypothèse provient, notamment, de l'observation du dédoublement de l'activité locomotrice, appelé phénomène de "splitting", lorsque des animaux sont placés en LL depuis un certain temps. En réalité, le dédoublement observé est principalement dû à un découplage de l'activité entre la partie droite et gauche des NSC (de la Iglesia et al., 2000).

Cependant, l'hypothèse de l'existence de deux oscillateurs E et M, chez les Mammifères, reste d'actualité et est renforcée par la découverte de leur existence chez les Drosophiles. En effet, deux études récentes ont montré que l'**activité locomotrice bimodale** des Drosophiles, c'est-à-dire ayant un pic d'activité à l'aube et au crépuscule, est dépendante de différents groupes neuronaux qui forment les oscillateurs E et M (Grima et al., 2004; Stoleru et al.,

2005) (Figure 9). D'un point de vue fonctionnel, ces deux oscillateurs sont couplés et sont sensibles à la lumière (Picot et al., 2007) (Figure 9). Ces travaux montrent, chez les Drosophiles, que le système circadien est complexe, car il repose sur l'interaction de différents groupes neuronaux.

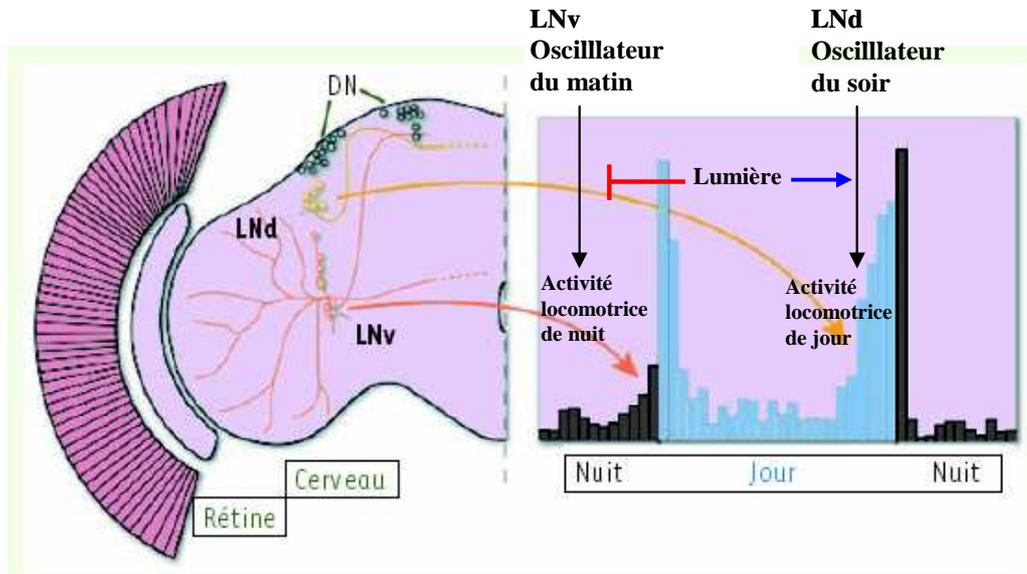


Figure 9 : Représentation schématique du contrôle des activités du matin et du soir chez la drosophile.

Chez la drosophile, les neurones latéraux-ventraux (LNv) contrôlent l'activité du matin, alors que les neurones latéraux-dorsaux (LNd) contrôlent l'activité circadienne sur soir. La lumière présente un effet antagoniste sur les oscillateurs permettant une activité locomotrice bimodale.

(adapté de Rouyer F, Med Sci 2005)

Chez les rongeurs, des oscillations de l'activité électrophysiologique des NSC comportant une composante du matin et une composante du soir, indiquant la présence des deux oscillateurs E et M, ont été enregistrées in-vitro (Jagota et al., 2000), mais restent controversées (Rohling et al., 2006).

En résumé, nous venons de voir que les NSC sont considérés comme le siège de l'horloge circadienne des Mammifères. Le nombre et l'organisation des différents groupes neuronaux ou oscillateurs indépendants au sein des NSC en font une structure complexe, aussi bien d'un point de vue anatomique que fonctionnelle.

Bien que les NSC soient considérés comme l'horloge centrale des Mammifères, ils ne sont pas l'unique oscillateur circadien de l'organisme.

2.2) Organes périphériques : une multitude d'oscillateurs périphériques.

2.2.1) Découverte des horloges périphériques

Depuis la fin des années 1990, plusieurs équipes ont montré chez les Mammifères que, dans la plupart des structures cérébrales, hors NSC, les tissus périphériques et même les cellules isolées expriment l'horloge moléculaire. Des oscillations journalières des gènes horloges ont été observées, *in-vitro*, dans des cultures de fibroblastes de rat, (Balsalobre et al., 1998), mais aussi, *in-vivo*, dans des tissus périphériques tels que le foie, le muscle, les reins, les poumons (Abe et al., 2002; Yamazaki et al., 2000; Zylka et al., 1998). Ces travaux suggèrent que la plupart des cellules somatiques sont dotées d'horloges circadiennes moléculaires. L'ensemble de ces oscillateurs qui présentent des oscillations journalières des gènes horloges, en dehors des NSC, a été nommé **horloges périphériques**, en opposition à l'horloge centrale des NSC.

2.2.2) Mécanisme moléculaire des horloges périphériques

Le mécanisme moléculaire des horloges périphériques a été étudié, et indique que le fonctionnement cyclique des oscillateurs périphériques repose sur le **même mécanisme moléculaire** que celui des neurones des NSC (Yagita et al., 2001).

Il existe cependant des différences subtiles entre les deux types d'oscillateurs, centraux et périphériques. En effet, le gène *Clock* et son homologue *Npas2* n'ont pas la même importance dans le mécanisme moléculaire de l'horloge centrale et des horloges périphériques (DeBruyne et al., 2007a; DeBruyne et al., 2007b). *Clock* semble être indispensable dans le mécanisme moléculaire du foie mais pas pour celui des NSC.

2.2.3) Propriétés des oscillateurs périphériques

Les études portant sur les oscillations d'expression des gènes horloges dans les cellules périphériques ont largement utilisé le modèle de fibroblaste en culture (Balsalobre et

al., 1998; Welsh et al., 2004). Elles confirment que chaque cellule est dotée de sa propre horloge circadienne moléculaire. A l'échelle d'une culture, chaque fibroblaste oscille indépendamment des autres, avec sa période propre. Ceci entraîne un aplatissement du rythme à l'échelle de la culture entière (Welsh et al., 2004) (Figure 10). Toutefois, les fibroblastes peuvent être resynchronisés par différents facteurs tels que le changement de milieu de culture, l'ajout de sérum à ce milieu (Balsalobre et al., 1998) ou encore une application de glucocorticoïdes (Balsalobre et al., 2000).

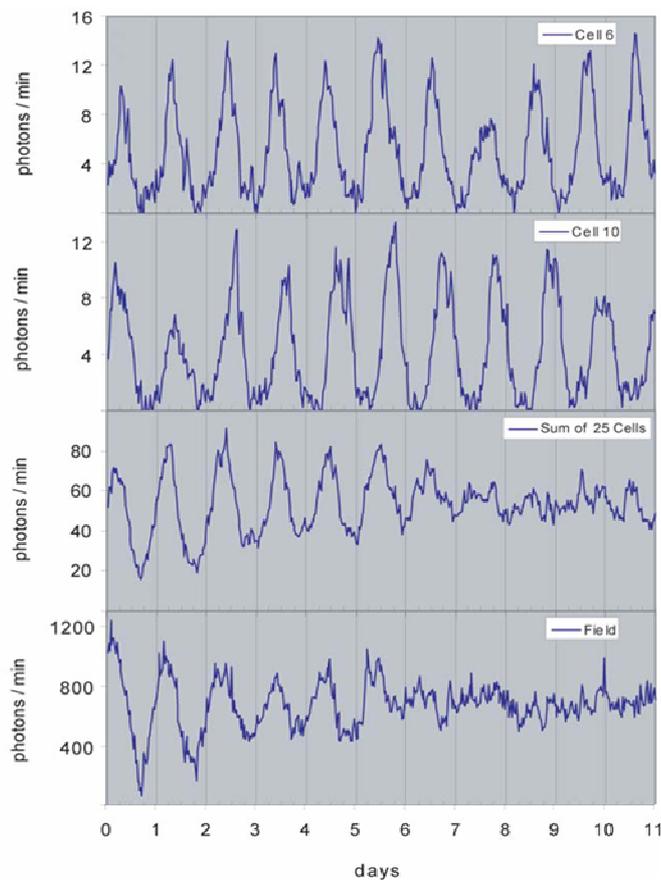


Figure 10 : Désynchronisation des fibroblastes en cultures.

La luciférase est exprimée sous le contrôle du promoteur de *Per2* et permet de suivre les oscillations de ce gène. Une caméra photosensible permet l'enregistrement d'une seule cellule ou d'un ensemble de cellules. Dans les deux panneaux du haut, chaque cellule oscille de façon autonome pendant 11 jours. L'enregistrement de 25 cellules ou d'un champ entier (les 2 panneaux du bas) en même temps, montre que les oscillations sont amorties au bout de 6 jours.

(d'après Welsh DK, et al., Curr Biol 2004)

Outre les cellules isolées, un bon nombre de tissus périphériques, tels que le foie, le rein, ou les poumons, présente aussi des oscillations auto-entretenues (Abe et al., 2002;

Yamazaki et al., 2000; Zylka et al., 1998) (Figure 11). Une récente étude a montré, *ex-vivo*, que les oscillations d'un certain nombre d'explants de tissus périphériques persistent aussi longtemps que celles des NSC (Yoo et al., 2004). Comme à l'échelle cellulaire, à l'échelle tissulaire, les horloges périphériques nécessitent un système d'entraînement et de synchronisation des horloges. Ainsi, il a été montré que **les NSC ont un rôle de chef d'orchestre, synchronisant les différentes horloges périphériques** (Yoo et al., 2004).

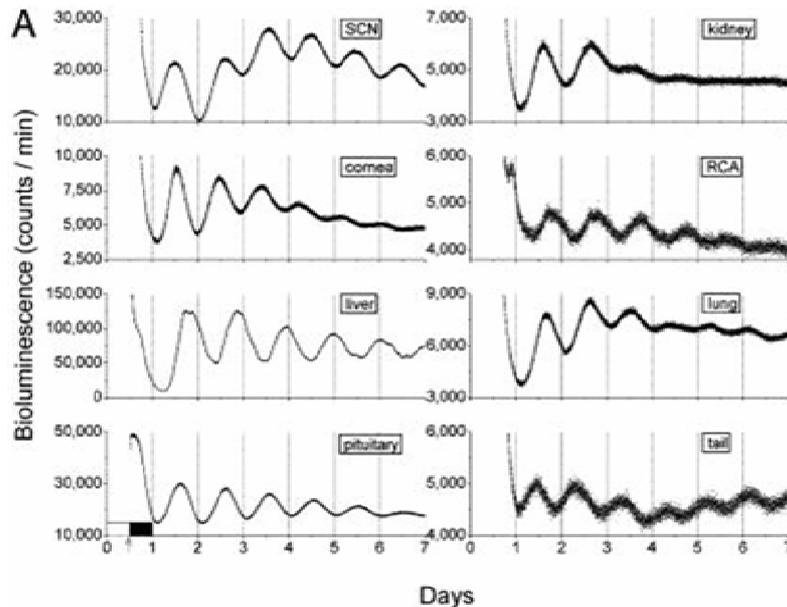


Figure 11: Oscillations d'explants de tissus périphériques.

Les tissus sont prélevés au moment de l'extinction de la lumière. Ils sont ensuite mis en culture et la bioluminescence émise par le système Per1-luciférase est enregistrée par un système d'acquisition. L'ensemble des tissus enregistrés a un fonctionnement rythmique autonome qui persiste plusieurs jours.

(d'après Yoo S.H. et al., PNAS 2004)

En résumé, il existe des oscillateurs périphériques, cellulaires ou tissulaires qui présentent des oscillations auto-entretenues. La capacité de couplage des cellules oscillantes observées dans les NSC (Liu et al., 2007), responsable de la robustesse de l'horloge des NSC, n'existe pas dans les oscillateurs périphériques. Ceux-ci sont entraînés et synchronisés par différents facteurs dont les NSC, qui jouent un rôle important.

Les découvertes des horloges périphériques ont permis de montrer que le système circadien est complexe. Il repose sur la présence d'une multitude d'oscillateurs synchronisés par les NSC.

2.3) Autres oscillateurs du système circadien

Il semble que le système circadien est encore plus complexe que ce que nous venons de décrire. En effet, d'autres oscillateurs apparemment indépendants des NSC et des gènes horloges existeraient et seraient responsables d'un comportement circadien.

2.3.1) L'horloge liée à l'alimentation

2.3.1.1) Activité locomotrice anticipatoire (FAA)

Chez de nombreuses espèces animales, lorsque l'accès à la nourriture est limité à quelques heures par jour, pendant plusieurs jours, l'organisme acquiert la faculté d'anticiper l'heure du repas. Ceci se manifeste par une forte **augmentation de l'activité locomotrice** juste avant l'heure du repas ; il s'agit de l'**activité locomotrice anticipatoire de la nourriture** (FAA : Food Anticipatory Activity) (Mistlberger, 1994). **Chez les rongeurs, cette FAA est indépendante de l'horloge centrale des NSC** (Clarke and Coleman, 1986). La FAA ne dépend pas non plus du cycle lumineux (Yoshihara et al., 1997). En effet, chez des rats et souris arythmiques présentant une lésion bilatérale des NSC, le **rythme journalier d'activité locomotrice (FAA) peut être restauré** si les animaux sont soumis à un accès contrôlé à la nourriture (Marchant and Mistlberger, 1997; Stephan et al., 1979) (Figure 12). Cette FAA est une activité basée sur un **processus rythmique robuste**. Des animaux soumis successivement à une phase de restriction alimentaire, puis à un accès permanent à la nourriture (*ad-libitum*), et enfin à une période de jeûne, vont développer une FAA lors de la première phase, qui disparaît progressivement pendant la deuxième phase, mais qui est restaurée à la même heure que précédemment lors du jeûne (Clarke and Coleman, 1986; Coleman et al., 1982; Ruis et al., 1989). Ce processus robuste montre qu'il existe dans le système circadien une **horloge liée à l'alimentation**.

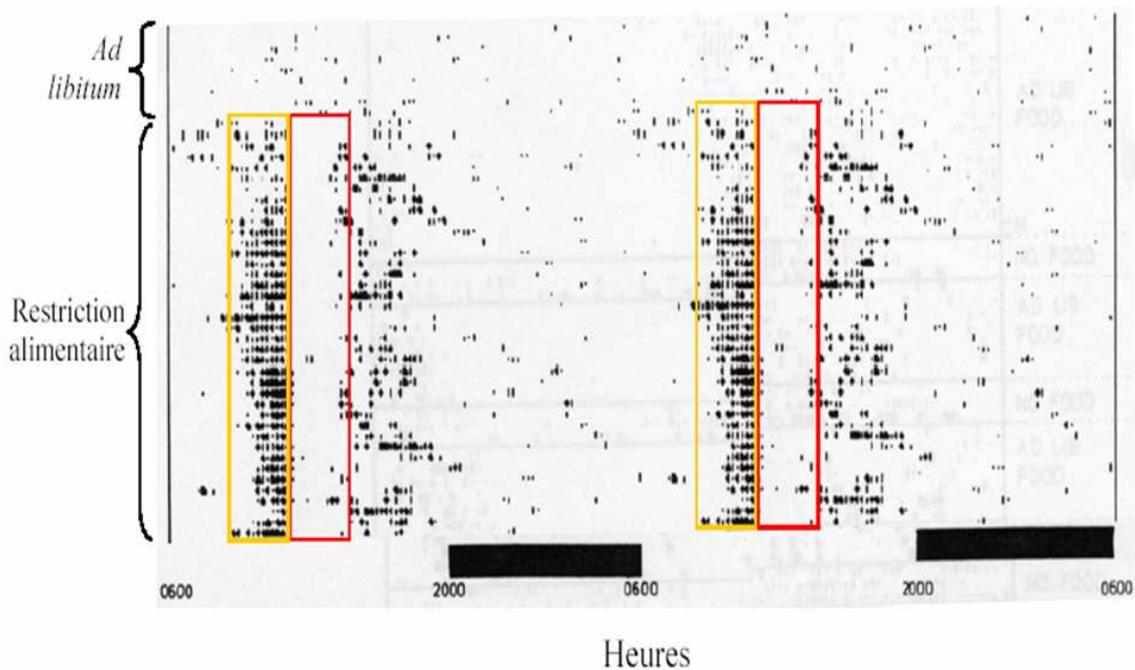


Figure 12 : La FAA est indépendante des NSC : Un accès limité à la nourriture restaure le rythme journalier d'activité locomotrice d'animaux arythmiques.

Actogramme d'un rat ayant subi des lésions des NSC. Il est arythmique en condition d'accès permanent à la nourriture (*ad-libitum*). Après quelques jours de restriction alimentaire (représenté par le rectangle rouge), les animaux deviennent actifs dans les heures qui précèdent l'arrivée de la nourriture (représentée par le rectangle jaune).

(d'après Clarke JD et Coleman GJ, 1986)

2.3.1.2) Support anatomique

Depuis plus de 30 ans, de nombreuses études ont été réalisées pour identifier la localisation anatomique de l'horloge liée à l'alimentation. Malgré les avancées, de nombreuses controverses ne permettent pas de mettre en évidence sa localisation exacte. Plusieurs hypothèses ont été émises : Est-ce une structure unique ? Est-ce un système multi-oscillateur ?

Tout d'abord différentes études ont montré que ni le système gastro-intestinal (Davidson et al., 2003) ni l'hypophyse endocrine (Davidson and Stephan, 1999), ne peuvent être le siège de l'horloge liée à l'alimentation.

Par la suite, des lésions d'une multitude de structures du système nerveux central ont été réalisées au cours de ces 30 dernières années. Ainsi, l'Hypothalamus Ventro-Médian (VMH) a d'abord été identifié comme pouvant être la structure responsable de l'activité

anticipatoire, chez les rongeurs (Inouye, 1982; Krieger, 1980). Mais, des travaux plus récents montrent que 5 à 9 semaines après la lésion électrolytique des VMH, les rats retrouvent la possibilité d'exprimer une FAA (Mistlberger and Rechtschaffen, 1984). Par la suite, ces résultats ont été confirmés par une étude effectuant à la fois des lésions électrolytiques chimiques (Challet et al., 1997) excluant un rôle essentiel des VMH dans l'horloge alimentaire.

Plus récemment, des lésions chimiques des noyaux Hypothalamiques Dorso Median (DMH) ont révélé une diminution de la FAA, suggérant que ceux-ci peuvent être le siège de l'horloge alimentaire (Gooley et al., 2006). A l'inverse, une autre étude basée sur des lésions des DMH par radiofréquence, montre qu'il n'y a pas de perte complète de la FAA, mais seulement une diminution (Landry et al., 2006). Les résultats contradictoires issus de ces deux études laissent en suspens le rôle éventuel des DMH dans l'activité anticipatoire.

A ce jour, aucune étude de lésion d'une structure unique n'a clairement provoqué la perte de l'activité anticipatoire, suggérant que cette activité pourrait être contrôlée par l'action combinée de plusieurs oscillateurs, dont les fonctions seraient redondantes. Malgré des données contradictoires, plusieurs travaux montrent que lors de la mise en place de l'activité anticipatoire, différentes structures centrales sont activées (Angeles-Castellanos et al., 2004; Angeles-Castellanos et al., 2007; Inzunza et al., 2000).

2.3.1.3) Support moléculaire : indépendance des gènes horloges ?.

Dans l'horloge centrale et les horloges périphériques, les mécanismes moléculaires responsables des oscillations circadiennes sont bien connus, par contre ceux impliqués dans l'horloge liée à l'alimentation font l'objet de nombreux débats. En effet, trois études différentes montrent que les gènes *Clock*, *Npas2* et *Cry(1-2)* ne feraient pas partie du mécanisme moléculaire de l'horloge alimentaire. Ces trois études montrent que les souris inactivées pour chacun des gènes, conservent leur FAA lorsqu'elles sont soumises à une restriction alimentaire (Dudley et al., 2003; Iijima et al., 2005; Pitts et al., 2003). A l'inverse, les animaux mutés pour *Per2* ou *knock-out* pour *Bmal1* perdent leur FAA en condition de restriction alimentaire (Feillet et al., 2006; Fuller et al., 2008). Ceci suggère que ces gènes sont impliqués dans le mécanisme moléculaire soutenant la FAA, mais sans dire s'ils sont essentiels. Cependant, ces deux études ne concordent pas avec une étude récemment publiée montrant que d'autres animaux inactivés pour les mêmes gènes ont la capacité de conserver

leur FAA (Pendergast et al., 2009; Storch and Weitz, 2009). A ce jour, l'ensemble des études réalisées ne permet pas de dire si le support moléculaire de l'horloge liée à l'alimentation dépend ou non des gènes horloges.

2.3.2) L'horloge liée aux méthamphétamines (MASCO)

La méthamphétamine est un agoniste catécholaminergique. Une injection quotidienne induit un comportement rappelant la FAA, l'activité augmentant dans les 2 heures suivant l'injection et ayant lieu pendant plusieurs jours (Shibata et al., 1994). L'activité locomotrice induite par la méthamphétamine est également observée chez les animaux présentant des lésions des NSC (Honma et al., 1987; Iijima et al., 2002). De plus, ce type de protocole provoque une modification de l'expression des gènes horloges (*Per(1-2)*; *Bmal1* et *Npas2*) dans le striatum, et pas dans les NSC (Iijima et al., 2002). L'ensemble de ces travaux montre l'existence d'un oscillateur circadien entraîné par les méthamphétamines (MASCO : Méthamphétamine Sensitive Circadian Oscillator), en dehors des NSC.

Peu de choses sont connues sur cet oscillateur, notamment concernant sa localisation, et son support moléculaire. Des études récentes réalisées chez des souris portant différentes mutations des gènes de l'horloge ou étant invalidées pour l'un de ce ceux-ci, montrent que l'activité locomotrice induite par le MASCO n'est pas affectée (Honma et al., 2008; Mohawk et al., 2009). Ceci suggère que les gènes horloges ne sont pas impliqués dans le mécanisme moléculaire qui supporte le MASCO.

La découverte d'une l'horloge liée à l'alimentation et d'une horloge liée aux méthamphétamines, en dehors des NSC, capables de générer un fonctionnement rythmique, montre que le système circadien ne repose pas que sur les NSC et les horloges périphériques. L'existence de ces deux horloges, bien que mal caractérisées, ajoute un degré de complexité à l'organisation du système circadien. Le fait que différentes souris portant des mutations des gènes de l'horloge ou étant invalidées pour l'un de ce ceux-ci, conserve leur FAA ou l'activité induite par le MASCO, soulève la question de l'existence d'autres gènes horloges.

3) Entraînement du système circadien.

En condition de « libre cours », les animaux ont un fonctionnement rythmique dont la période n'est pas rigoureusement de 24 heures. Lors d'une exposition à un cycle lumineux de 24 heures, l'horloge circadienne endogène est remise à l'heure quotidiennement par différents donneurs de temps ou *Zeitgeber* (de l'allemand *Zeit* : Temps ; *Geben* : Donner). Ainsi, le système circadien est entraîné par différents facteurs lui permettant de fonctionner avec une période de 24 heures et d'être en parfaite adéquation avec les variations de son environnement. Les deux principaux facteurs capables d'entraîner le système sont la lumière et la nourriture.

3.1) Entraînement par la lumière.

3.1.1) Exposition à la lumière et décalages de phase.

Parmi les facteurs capables d'entraîner le système circadien, **la lumière est le *Zeitgeber* le plus puissant**. Dans les conditions de vie naturelle, l'entraînement par la lumière permet aux organismes de synchroniser leur fonctionnement avec les variations de luminosité externes, pour permettre une adéquation totale avec l'environnement. Le mécanisme d'induction du système circadien par la lumière intervient lors d'une exposition à la lumière pendant la phase d'obscurité et se traduit par des modifications comportementales, adaptant l'organisme à son nouvel environnement lumineux. L'adaptation du comportement mesuré par l'activité locomotrice, dépend du moment auquel le rongeur a été exposé à la lumière. Une exposition qui a lieu en fin de nuit subjective, va entraîner **un retard de phase**, c'est-à-dire que les jours suivants, l'activité locomotrice commencera plus tard (Figure 13B). Si à l'inverse, en fin de nuit subjective, le stimulus lumineux entraîne une **avance de phase**, cela signifie que pendant les jours suivants, l'activité commencera plus tôt (Figure 13 C). Enfin, si le stimulus lumineux a lieu pendant le jour subjectif, cela n'a aucun effet sur le comportement locomoteur (Figure 13 A). On peut ainsi tracer **une courbe de réponse de phase** qui récapitule les déphasages observés pour les différents stimuli lumineux (Figure 13) et témoigne d'une remise à l'heure de l'horloge biologique, en réponse à la lumière en fonction du moment où celui-ci est appliqué.

Le décalage de phase, obtenus en réponse à une exposition à la lumière, témoignent de la possibilité d'une remise à l'heure de l'horloge biologique en réponse à un changement de l'environnement.

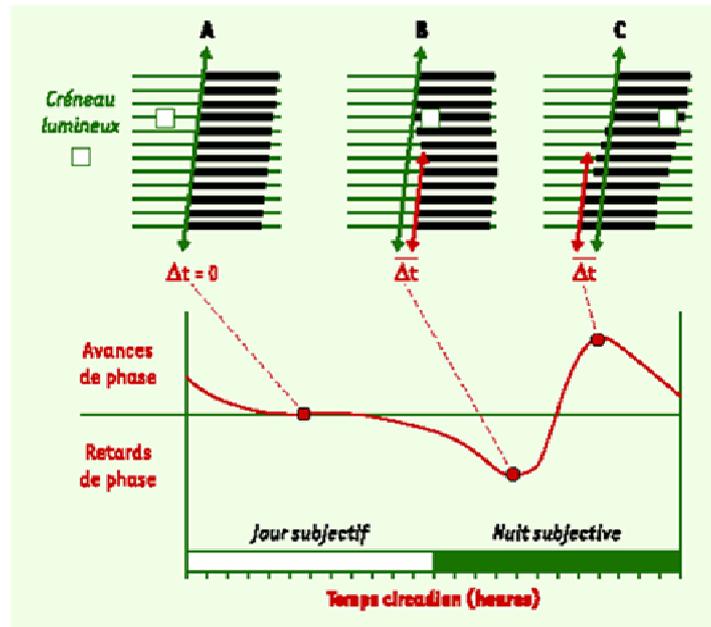


Figure 13 : Schéma représentatif de la courbe de phase réponse récapitulant les différents décalages de phases observés pour chaque stimulus lumineux.

(A).Lorsque le stimulus lumineux (créneau lumineux) a lieu pendant le jour subjectif, aucun décalage de phase n'est observé. (B). Quand le stimulus est appliqué pendant le début de la nuit subjective, on observe une modification de la phase du rythme locomoteur au cours des jours suivants, puisque l'activité commence plus tard, ceci correspond à un retard de phase. (C). Une exposition à la lumière, lors de la fin de la nuit subjective entraîne les jours suivants l'avancement du début de l'activité, témoignant d'une avance de phase.

(d'après Dardente H, et Cermakain N, Med Sci 2005)

3.1.2) Intégration et transfert du message lumineux.

L'entraînement du système circadien par la lumière (entraînement photique) nécessite **le système visuel** de détection de la lumière par **les photorécepteurs** (cônes et bâtonnets) ainsi que **le système non-visuel** impliquant les cellules ganglionnaires qui contiennent la **mélanopsine**, un photopigment différent des opsines du système visuel (Hattar et al., 2003; Panda et al., 2002c) (Figure 14A). D'un point de vue anatomique, certaines cellules

ganglionnaires se projettent sur les NSC, participant à la formation du **tractus rétinohypothalamique RHT** (Figure 14A) (Gooley et al., 2001; Hannibal et al., 2002; Hattar et al., 2002). D'un point de vue fonctionnel, le RHT est la voie principale d'entrée de l'entraînement photique. Sa destruction bloque l'entraînement de l'activité locomotrice par la lumière, chez le hamster (Johnson et al., 1988). Les fibres du RHT projettent sur les neurones de la partie ventro-latérale des NSC (van den Pol and Tsujimoto, 1985). Ainsi, lors d'une stimulation lumineuse, les fibres du RHT libèrent principalement deux neurotransmetteurs : **le glutamate et le PACAP** (Hannibal, 2002) qui activent les neurones du vLNSC. D'une part, le glutamate **augmente l'activité électrique des neurones des NSC** (Meijer et al., 1993). D'autre part, la libération des deux neurotransmetteurs **module l'expression de certains gènes horloges** (Figure 14B). En effet, l'expression de *Per1* (Shigeyoshi et al., 1997) et de *Per2* (Shearman et al., 1997) est inductible par la lumière durant la nuit subjective. *Per1* est induit indifféremment durant toute la nuit subjective, alors que *Per2* n'est induit fortement que si le créneau lumineux est présenté en début de nuit subjective (Albrecht et al., 1997). Ces gènes horloges seraient donc acteurs des décalages de phases observés en réponse aux diverses stimulations lumineuses. Ceci est étayé par le fait que les avances de phases induites par la lumière sont perturbées chez des souris *knock-out* pour *Per1*. De même, les retards de phases induits par la lumière sont perturbés chez des souris mutantes pour *Per2* (Albrecht et al., 2001).

En conclusion, les gènes *Per (1-2)* semblent être impliqués dans les mécanismes d'activation et de synchronisation des NSC par la lumière.

Il existe aussi une **voie indirecte** qui conduit l'information photique de la rétine aux SCN. Cette voie amène l'information photique de la rétine aux feuillets intergénéculés latéraux (IGL) (Hickey & Spear, 1976), qui projettent ensuite sur les SCN *via* **le tractus géniculo-hypothalamique (GHT)**.

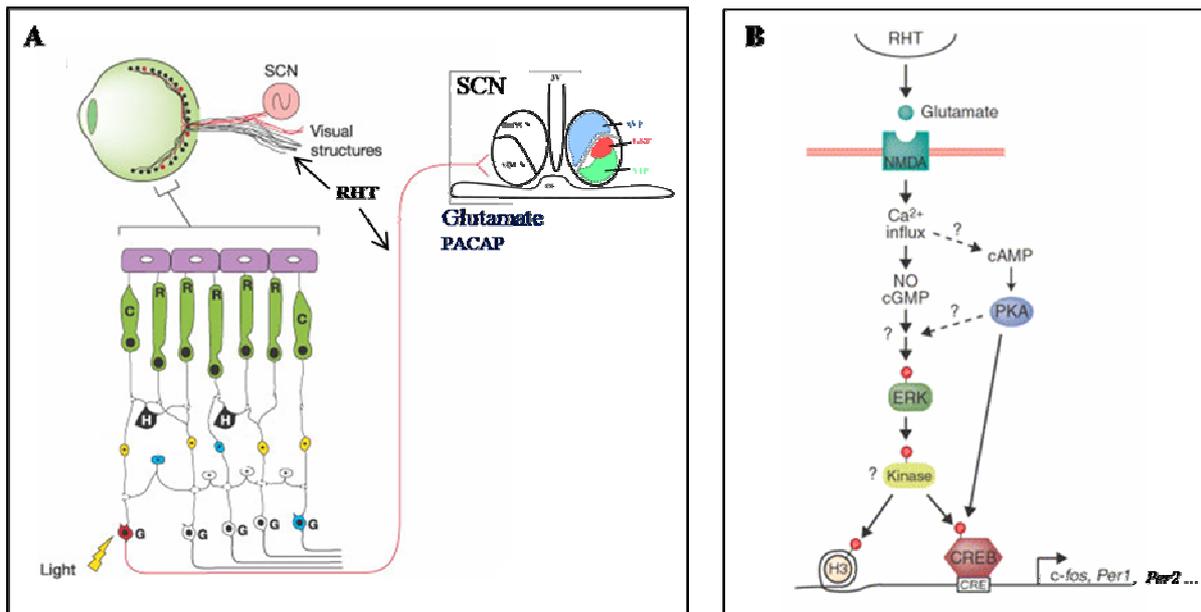


Figure 14 : Intégration de l'information photique.

(A) Le système visuel de détection de la lumière par les cônes (C) et les bâtonnets (R), et le système non visuel, impliquant la mélanopsine des cellules ganglionnaires (G), sont donc complémentaires pour l'entraînement des Mammifères à l'alternance du jour et de la nuit. Les axones de ces cellules ganglionnaires se projettent sur les NSC, en formant le tractus rétino-hypothalamique (RHT) qui libère du glutamate et du PACAP. (B). Ces deux neurotransmetteurs agissent sur les neurones des NSC en déclenchant les voies de signalisations intracellulaires, contrôlant la transcription des gènes horloges *Per1* et *Per2*.

(d'après Reppert SM et Weaver DR, 2002 et Cerlakian N et Sassonne-Corsi P 2002)

Les différentes voies d'intégration de la lumière décrites ci-dessus montrent que la lumière est intégrée par les NSC, qui envoient par la suite différents signaux pour réguler et synchroniser l'ensemble des rythmes physiologiques aux variations lumineuses de l'environnement. Un certain nombre d'études montrent qu'une partie des signaux envoyés par les NSC est d'origine **nerveuse**. En effet, une grande majorité des fibres efférentes des NSC projettent dans la région médiane de l'hypothalamus. **Le système nerveux autonome** (sympathique ou parasympathique) est l'une des cibles des NSC (Bartness et al., 2001; Buijs and Kalsbeek, 2001; Kalsbeek et al., 2000). Il contrôle, par exemple, la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale. Cette sécrétion n'a lieu que pendant la nuit, ce qui confère à la mélatonine un rôle important dans le codage de l'information temporelle et environnementale. Ainsi, plus la durée de la nuit est longue (photopériode courte, hiver), plus la synthèse de mélatonine est importante. Ce mécanisme est essentiel chez les espèces saisonnières puisqu'il renseigne sur la durée des jours.

Les **neurones neuroendocrines** sont aussi une cible des NSC capables d'activer le système endocrine (Kalsbeek et al., 2000; Van der Beek et al., 1997; Vrang et al., 1995). Leur activation par les NSC suggère qu'une partie des signaux émis par les NSC peuvent transiter *via* le **système endocrine**. Le VIP (Vasoactine Instinal polypeptide) et l'AVP (Arginine Vasopressin), sécrétés par les deux subdivisions des NSC, semblent être le support moléculaire du signal temporel émis par les NSC pour activer les neurones neuroendocrines (Kalsbeek and Buijs, 2002; Van der Beek et al., 1997).

Enfin, des facteurs diffusibles sont également libérés à partir des NSC. Les libérations de **TGF- α** (Kramer et al., 2001) et de **PK2 (Prokineticine 2) (Prosser et al., 2007)** ont notamment été identifiées comme ayant un rôle dans le contrôle de l'activité locomotrice au cours du cycle lumineux.

3.2) Entraînement par la nourriture.

Bien qu'elle soit le *Zietgeber* le plus puissant, la lumière n'est pas le seul synchroniseur de l'horloge circadienne, la nourriture est aussi capable d'entraîner les rythmes du système circadien. En effet, il a été montré que la restriction temporelle de l'accès à la nourriture (RF) entraîne les oscillations de certaines horloges périphériques (Figure 15). Dans de telles conditions, **un découplage est observé entre l'horloge principale des NSC et certaines horloges périphériques** (Damiola et al., 2000; Hara et al., 2001; Stokkan et al., 2001) (Figure 15). Ainsi, les horloges périphériques étudiées suivent le rythme imposé par la disponibilité alimentaire, alors que les NSC suivent le rythme imposé par la lumière. Dans le cas de l'horloge foie, il a été montré qu'il existe une certaine inertie avant son entraînement par la nourriture (Le Minh et al., 2001). Cette inertie est imposée par l'horloge des NSC, *via* les glucocorticoïdes (Le Minh et al., 2001). Les NSC ont donc un rôle important de synchronisation des horloges périphériques avec le cycle lumineux. Néanmoins, dans le cas du RF, la nourriture est le synchroniseur majeur des horloges périphériques. En résumé, ces études montrant un découplage entre les horloges centrales et périphériques indiquent que les deux synchroniseurs : **lumière et nourriture, peuvent coexister indépendamment l'un de l'autre.**

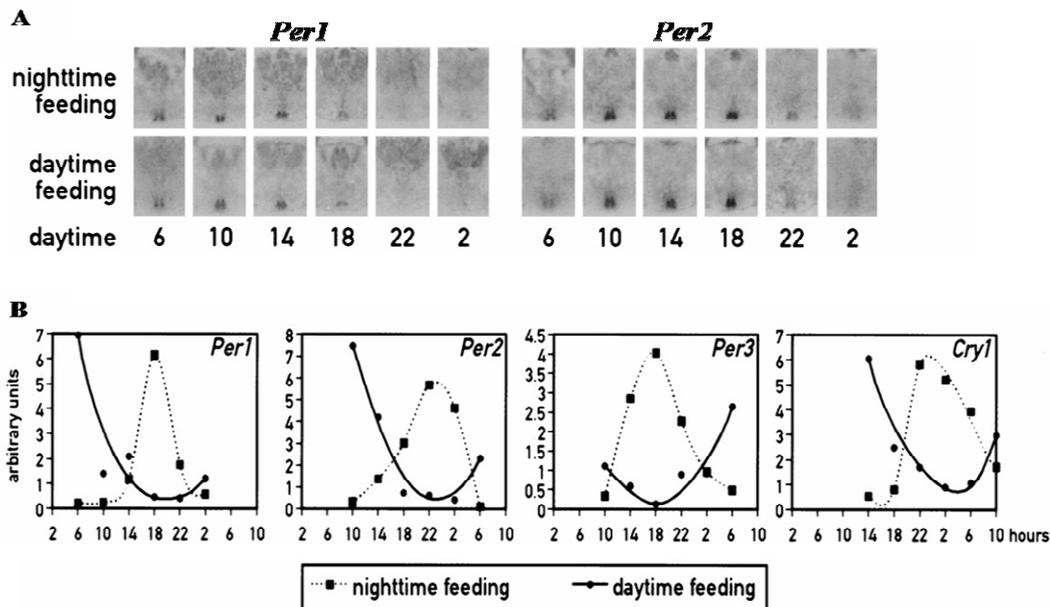


Figure 15 : Entrainement de l'horloge hépatique par la nourriture

(A). Lors d'une restriction de la prise alimentaire pendant la phase de jour (daytime feeding), l'expression des gènes horloges *Per1* et *Per2* dans les NSC est inchangée au cours du cycle circadien. (B) Dans le foie, lorsque l'alimentation est restreinte à la phase lumineuse (daytime feeding), l'expression des gènes horloges (*Per1*, *Per2*, *Per3* et *Cry1*) est inversée.

(d'après Damiola F et al., 2000)

Comme nous venons de le voir, il est bien établi que la nourriture entraîne certaines horloges périphériques. Néanmoins, les signaux de sortie de l'horloge alimentaire, capables de synchroniser les horloges périphériques, restent encore à définir. Il est possible qu'un certain nombre d'hormones, liées au métabolisme alimentaire, tel que l'insuline, le glucagon (Diaz-Munoz et al., 2000) ou encore la leptine (Martinez-Merlos et al., 2004), soient impliquées dans la transmission de ces signaux. Egalement, les métabolites eux-mêmes pourraient être des signaux synchronisateurs. Ainsi, le glucose, le cholestérol, les acides gras sont autant de métabolites qui pourraient participer à l'entraînement des horloges du système circadien (Diaz-Munoz et al., 2000; Escobar et al., 1998).

En résumé, l'entraînement du système circadien résulte d'un fonctionnement complexe dans lequel coexistent plusieurs signaux. Le signal lumineux qui permet l'adaptation de l'organisme aux variations lumineuses de l'environnement, ainsi que nourriture qui permet l'adaptation de l'organisme aux disponibilités alimentaires, sont les deux synchronisateurs ou Zeitgeber majeurs du système circadien.

En conclusion, le système circadien des Mammifères est un système complexe contrôlant un ensemble de rythmes biologiques variés. Il est constitué d'une multitude d'oscillateurs autonomes dont le fonctionnement cyclique repose, en partie, sur l'expression d'une horloge moléculaire complexe. De plus, l'harmonisation de ces oscillations implique l'intégration de différents signaux synchroniseurs.

L'activité locomotrice est la sortie de l'horloge qui a été la plus étudiée. Cependant, il existe aussi à l'échelle de l'organisme un grand nombre d'autres fonctions rythmiques moins bien caractérisées. Ainsi, je focaliserai, la deuxième partie de cette introduction, sur les pulsatilités du système endocrine.

III) Les pulsatilités endocrines

Le système endocrine est l'un des deux principaux systèmes de communication de l'organisme, avec le système nerveux. Il contrôle un grand nombre de fonctions physiologiques via des libérations d'hormones. La plupart des hormones sont sécrétées de façon **pulsatile**, c'est-à-dire avec une alternance de phase de sécrétion et d'absence de sécrétion et **rythmique** puisque certaines de ces alternances ont un rythme régulier. Les rythmes sécrétoires sont présents sur différentes échelles de temps. Il existe des **rythmes journaliers** de sécrétion d'hormones qui ont une période d'environ 24 heures. Il existe également des **rythmicités ultradiennes** qui ont une période inférieure à 24 heures (souvent de l'ordre de l'heure), et enfin **des rythmicités infradiennes** avec une période supérieure à 24 heures. **Les caractéristiques de pulsatilité et de rythmicité sécrétoires sont déterminantes pour le rôle et l'efficacité d'action des hormones.** Par exemple, la pulsatilité ultradienne de sécrétion de l'hormone de croissance (GH : Growth hormone) par l'hypophyse est essentielle pour la croissance et le métabolisme. Lorsque des jeunes rats hypophysectomisés sont soumis à des infusions continues de GH, la prise de poids et la croissance osseuse de ces animaux est beaucoup moins efficace que s'ils avaient reçu des injections pulsatiles (Clark et al., 1985). De même, dans la fonction de reproduction, la pulsatilité infradienne de la LH est responsable du déclenchement de l'ovulation. La fonctionnalité de cette pulsatilité a suscité un fort intérêt en thérapeutique, puisque le développement de la pilule contraceptive repose sur le maintien artificiel d'un taux constant de LH pour supprimer le déclenchement de l'ovulation.

Les rythmes sécrétoires sont cruciaux pour le rôle et l'efficacité d'action des hormones. Il est donc nécessaire de connaître les mécanismes mis en œuvre dans la régulation des rythmes hormonaux.

Dans cette introduction, nous nous intéresserons à **l'hypophyse antérieure (antéhypophyse)** une glande majeure du système endocrine. Cette glande constitue un relais entre le système nerveux central et les tissus périphériques (Figure 16). Elle libère plusieurs hormones de façon **hautement pulsatile et rythmique** dans la circulation générale et elle contrôle des fonctions physiologiques diverses telles que le **métabolisme** (GH, ACTH, TSH) ou la **reproduction** (PRL, LH, FSH). Ses sécrétions pulsatiles ont l'originalité d'être présentes sur différentes échelles de temps : ultradienne, circadienne, et/ou infradienne.

Quels sont les mécanismes qui participent au fonctionnement pulsatile de l'hypophyse?

1) Différents types de pulsatilités contrôlées par l'hypothalamus.

Quelles que soient leurs échelles de temps, les pulsatilités hypophysaires sont fortement gouvernées par la libération rythmique de neuro-hormones hypothalamiques dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Guillemin, 2005) (Figure 16). Différentes **neuro-hormones hypophysiotropes** sont sécrétées, par les neurones hypothalamiques, dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, et régulent les sécrétions antéhypophysaires.

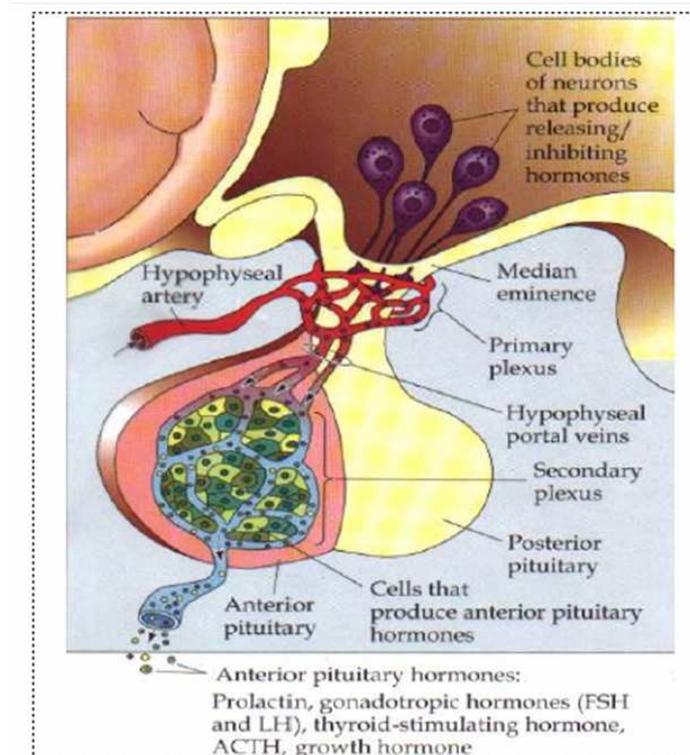


Figure 16 : Anatomie de l'hypophyse et du système porte hypothalamo-hypophysaire.

Les neurohormones hypothalamiques régulant les sécrétions des hormones antéhypophysaires (ou hypophyse antérieure) sont libérées au niveau de l'émence médiane du système porte hypothalamo-hypophysaire. Ce réseau sanguin irrigue l'antéhypophyse où il collecte les hormones (ACTH, GH, PRL, TSH, FSH LH) et les draine ensuite dans la circulation générale.

(Physiologie Humaine, Vander, 4ième édition)

Dans le complexe hypothalamo-hypophysaire, il existe plusieurs axes endocrines qui dépendent des neuro-hormones hypothalamiques et des hormones antéhypophysaires mises en jeu ainsi que des fonctions contrôlées (Figure 17).

Les neuro-hormones hypothalamiques ont la capacité d'activer ou d'inhiber les sécrétions hypophysaires, et de contrôler ainsi les rythmes des pulsatilités sécrétoires, sur différentes échelles de temps ; circadiennes (autour de 24 heures), ultradiennes (inférieur à 24 heures), indradiennes (supérieur à 24 heures).

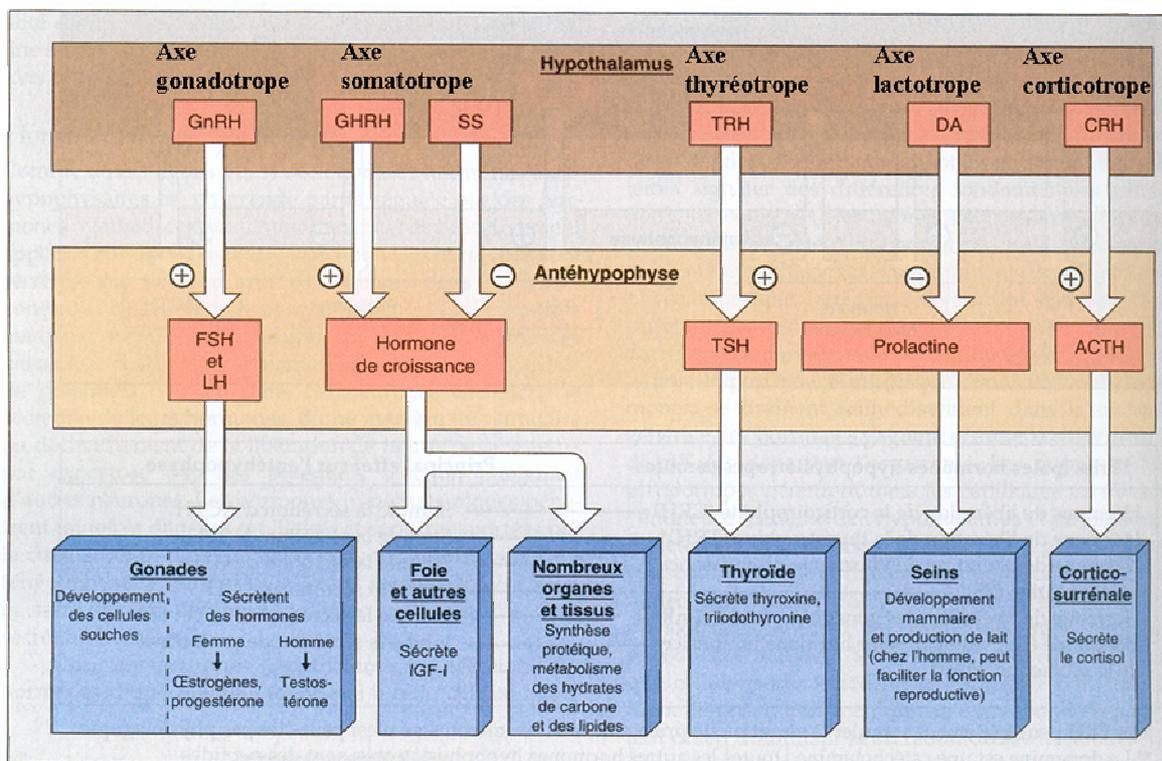


Figure 17 : Représentation des différents axes hypothalamo-hypophysaires et périphériques.

Les neuro-hormones hypothalamiques contrôlent les sécrétions des hormones hypophysaires. Celles-ci agissent en périphérie sur un grand nombre d'organes et contrôlent de nombreuses fonctions. Plusieurs axes hypothalamo-hypophysaires sont définis suivant les fonctions qu'ils contrôlent et les hormones impliquées. L'axe gonadotrope contrôle la reproduction, l'axe somatotrope contrôle la croissance et le métabolisme, l'axe thyroïdote et l'axe corticotrope interviennent dans le métabolisme, enfin l'axe lactotrope contrôle la lactation.

(Physiologie Humaine, Vander, 4ième édition)

Par exemple, la sécrétion d'ACTH (Adreno-CorticoTropin Hormone) par l'antéhypophyse **suit un rythme journalier** (Figure 18). Cette sécrétion est régulée par la CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), une neuro-hormone synthétisée dans des noyaux paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus, et libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, avec un rythme journalier. L'ACTH contrôle ensuite la libération journalière de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien (Figure 17) (Ixart et al., 1977). Cette rythmicité journalière de l'axe corticotrope a un rôle essentiel. En effet, ces sécrétions se caractérisent par un pic majeur de libération au moment de la transition jour/nuit. Cette rythmicité constitue une réponse anticipatoire sur la période d'activité à venir. Le fort taux de corticostérone sécrétée, à ce moment de la journée, permet une mobilisation accrue des réserves énergétiques pour faire face à l'éveil (Challet et al., 1995; Hamelink et al., 1994).

Le rythme journalier de l'ACTH est également conservé en obscurité constante (DD) (Szafarczyk et al., 1979). Ceci suggère que la sécrétion d'ACTH pourrait être **contrôlée par l'horloge circadienne des NSC**. En effet, la lésion des NSC fait perdre sa rythmicité à la sécrétion d'ACTH (Szafarczyk et al., 1979) mais aussi de corticostérone (Szafarczyk et al., 1981). Ceci s'explique par l'existence de connexions entre les neurones des NSC et les neurones à CRH des PVN de l'hypothalamus (Buijs et al., 1993). La libération d'AVP par les terminaisons des NSC à proximité des neurones à CRH pourrait avoir un rôle dans le contrôle des sécrétions circadiennes de l'axe corticotrope (Kalsbeek et al., 1992).

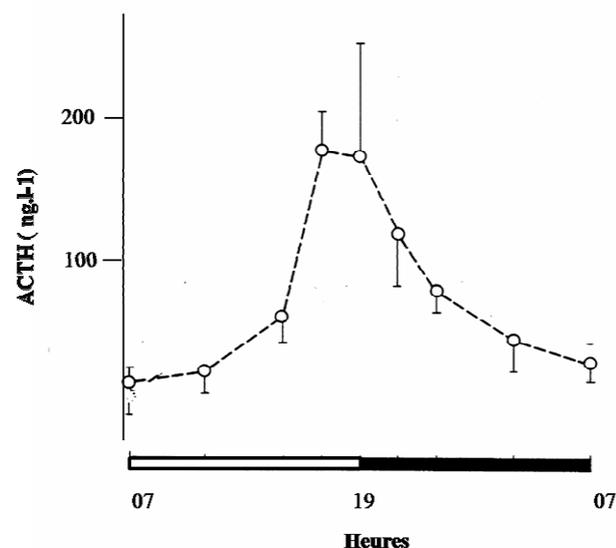


Figure 18 : Sécrétion circadienne de l'ACTH par l'antéhypophyse, chez un rat.
Chez un rat nocturne, la libération d'ACTH est massive au moment de la transition jour / nuit.

(d'après Szafarczyk A., 1974)

Un autre exemple est celui de la sécrétion d'hormone de croissance (GH). Cette hormone est sécrétée par l'antéhypophyse avec **un profil ultradien**, caractérisé par des pics de libération toutes les 2 à 3 heures (Tannenbaum and Martin, 1976). Ce rythme ultradien est essentiel pour l'efficacité d'action de la GH (Clark et al., 1985). Le rythme ultradien de la GH fait aussi intervenir deux neurohormones hypothalamiques. L'interaction de ces deux neurohormones fait partie des moteurs de la pulsativité de la GH. Le GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) active la sécrétion de GH, et le SRIH (Somatotropin Release Inhibiting Hormone ou somatostatine) l'inhibe. Ces deux neurohormones sont libérées de façon pulsatile et antiparallèle dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Plotsky and Vale, 1985; Tannenbaum and Ling, 1984) (Figure 19B). Des modèles cellulaires montrent que ces libérations, en opposition de phase, pourraient être dues à un réseau de communications nerveuses dans l'hypothalamus, dans lequel les neurones SRIH inhiberaient l'activité des neurones GHRH (Bertherat et al., 1995; Lanneau et al., 2000). Ainsi, au départ, la sécrétion de GH pourrait être activée par l'arrivée massive de GHRH, dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Lorsque la GH plasmatique atteint un certain seuil, elle agirait par un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de somatostatine qui inhiberait alors l'activité des neurones GHRH et donc la sécrétion de GH, pendant environ 3 heures. La levée de ce frein permettrait à nouveau une libération massive de GH (Wagner et al., 1998) (Figure 19A).

La sécrétion de GH, en plus de sa plusatilité ultradienne, possède également une composante journalière. La fréquence des pulses est augmentée pendant la nuit (Clark et al., 1987; Davies et al., 2004). Cette augmentation est directement liée au sommeil. En effet, la GH est sécrétée majoritairement lors du sommeil profond, caractérisé par une activité électrique cérébrale constituée d'ondes lentes (Gronfier and Brandenberger, 1998; Gronfier et al., 1996).

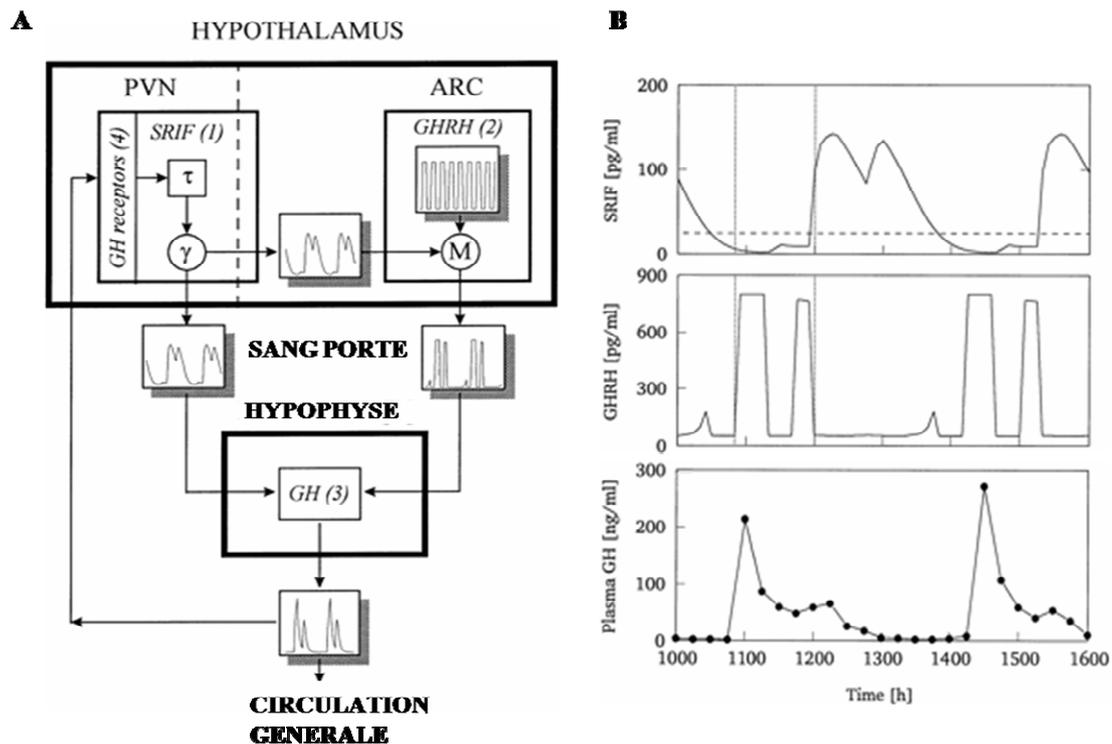


Figure 19 : Régulation de la pulsativité ultradienne de la GH par les rythmes hypothalamiques.

A Représentation schématique des voies de signalisation de l'axe somatotrope permettant la sécrétion ultradienne de l'hormone de croissance.

B. La pulsativité ultradienne imposée par les libérations antiparallèles de SRIH et GHRH dans les systèmes porte hypothalamo-hypophysaires chez un rat mâle. Le GHRH et SRIH sont mesurés dans le sang porte, et la GH dans la circulation générale.

(D'après Wagner C et al., Am J Physiol 1998)

Une des caractéristiques de la pulsativité de la GH est son évolution au cours de la vie. Chez les rongeurs, rats et souris, les nouveaux-nés présentent un fort taux de GH qui décline pendant les premières semaines. Ces changements s'accompagnent d'une diminution de la sensibilité des cellules GH à la GHRH et d'une augmentation de la sensibilité à la somatostatine. Pendant la période pubertaire, la sécrétion de la GH est maximale (Gabriel et al., 1992), puis elle diminue progressivement avec l'âge et perd son fort caractère pulsatile (Kuwahara et al., 2004) (Figure 20). D'une part, cette baisse de sécrétion de la GH est liée à l'altération des terminaisons nerveuses des neurones GHRH (Alonso et al., 2007), et d'autre part, elle est aussi liée à la perte de pulsativité et à la diminution de la durée des interpics présents dans la sécrétions de GH (Dhir and Shapiro, 2003).

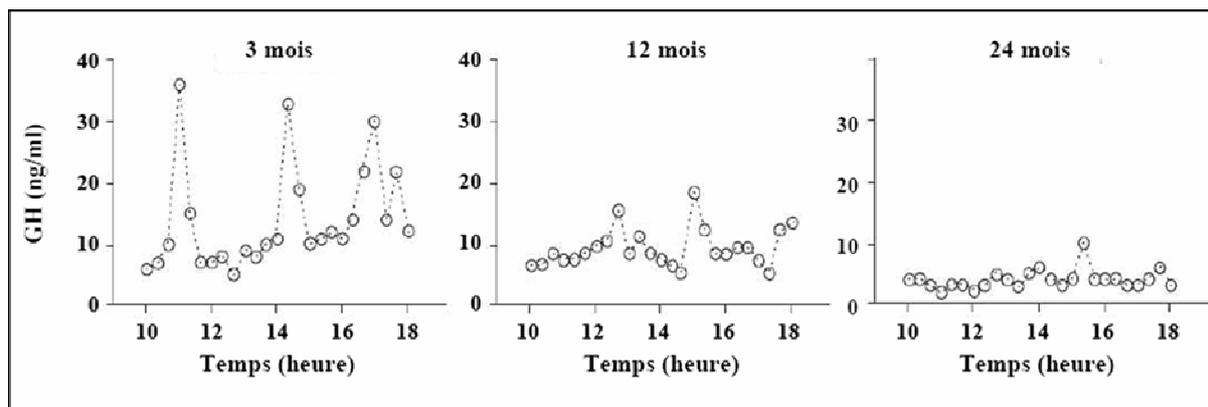


Figure 20 : Evolution de la sécrétion de GH avec l'âge, chez le rat.

La pulsativité est forte lors de l'âge adulte (3 mois), puis elle diminue progressivement avec l'âge.

(d'après Kappeler L et al., 2004)

Enfin, le dernier exemple est celui de la sécrétion de LH. L'antéhypophyse sécrète la LH (Luteinizing Hormone) avec un **rythme infradien** (Figure 21). La sécrétion de LH possède aussi une composante journalière corrélée au cycle lumineux (Christian et al., 2005), mais qui n'est pas la composante majeure pour l'efficacité d'action de la LH. **C'est la rythmicité infradienne qui est cruciale pour la fonction de reproduction**, puisqu'elle contrôle la phase d'ovulation chez les femelles. Cette sécrétion infradienne est contrôlée par la GnRH (gonadolibérine), une neurohormone hypothalamique, libérée de façon rythmique dans le système porte hypothalamo-hypophysaire au cours du cycle ovarien (Clarke et al., 1989; Moenter et al., 1991). Jusque très récemment, la sécrétion rythmique de la GnRH était connue pour être régulée par le taux d'œstrogène circulant, produit par les ovaires. Lorsque les follicules ovariens sont matures, le taux d'œstrogènes qu'ils produisent est élevé ce qui enclenche la phase d'ovulation. Le fort taux d'œstrogène déclenche la sécrétion de GnRH qui stimule la sécrétion de LH (Petersen et al., 2003). Cependant, en 2003, une avancée des plus importantes depuis 30 ans a été réalisée dans le domaine de la reproduction, avec la découverte d'un nouveau neuropeptide le **Kisspeptine (Kp)** (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Le Kp est un **stimulateur puissant de l'axe gonadotrope**. Il agit en amont des neurones à GnRH et stimule la libération de GnRH et par conséquent de LH (Smith et al., 2006b). Le Kp peut aussi agir directement sur l'antéhypophyse pour stimuler la sécrétion de LH (Gutierrez-Pascual et al., 2007). De plus, il semble qu'il existe un lien anatomique entre

les neurones à Kp de l'AVPV et les NSC (Smith et al., 2006c), suggérant que la libération rythmique de LH par l'antéhypophyse pourrait aussi être régulée par l'horloge circadienne. Ceci est d'autant plus probable que des expériences de lésion des Noyaux Suprachiasmatiques révèlent une altération de la sécrétion infradienne de LH (Brown-Grant and Raisman, 1977; Ronnekleiv and Kelly, 1988; Wiegand et al., 1980).

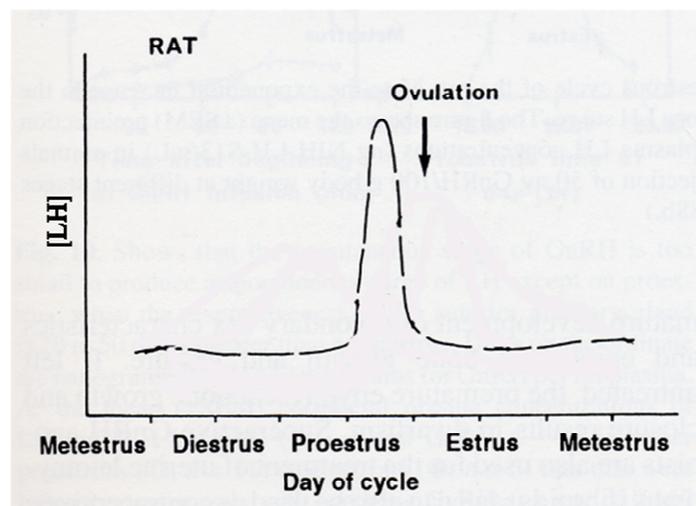


Figure 21 : Sécrétion infradienne de la LH par l'antéhypophyse, chez une ratte.

La sécrétion de LH par l'antéhypophyse présente un rythme infradien qui permet le déclenchement de la phase d'ovulation au cours du cycle ovarien.

(d'après Fink G, 1988)

En résumé, l'hypophyse a un fonctionnement pulsatile et rythmique. Elle sécrète ses hormones sur différentes échelles de temps, même si chacune d'entre elles possède une composante circadienne. Les différentes rythmicités sécrétoires sont principalement gouvernées par l'hypothalamus, qui libère différentes neurohormones dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Cependant, il existe d'autres mécanismes qui participent au fonctionnement rythmique de l'antéhypophyse.

2) Mécanismes intrinsèques à l'hypophyse.

2.1) Un fonctionnement pulsatile autonome.

Plusieurs séries d'expériences, *in-vivo* et *in-vitro* ont montré qu'il existe un fonctionnement rythmique propre à l'hypophyse.

En effet, la persistance de sécrétions hypophysaires alors que l'hypothalamus ne peut plus assurer de contrôle sur la glande, a pu être mise en évidence par des expériences de greffes ectopiques. Plusieurs équipes ont ainsi montré qu'une greffe d'antéhypophyse sous la capsule rénale d'animaux hypophysectomisés restaure la présence des hormones circulantes (Bridges and Millard, 1988; Krieg et al., 1989; Peng et al., 1969). Cette greffe semble même être bénéfique pour la croissance, lorsqu'elle est réalisée sur des souris mutantes naines ayant une déficience antéhypophysaire (Bouchon and Ropartz, 1984). Dans le cas de la prolactine (PRL), la sécrétion du greffon isolé du système vasculaire hypothalamo-hypophysaire, est variable au cours du temps (Shin and Reifel, 1981). Le taux plasmatique de prolactine chez ces animaux montre clairement un profil pulsatile présentant des phases de sécrétions environ toutes les 20 minutes (Shin and Reifel, 1981). Ces observations, *in-vivo*, font de l'hypophyse un oscillateur autonome, et suggèrent la présence d'un système rythmique inhérent à l'antéhypophyse, permettant des phases régulières de sécrétion, indépendamment de l'hypothalamus.

La capacité intrinsèque de l'antéhypophyse à libérer ses hormones de façon rythmique a été également observée *in-vitro*. Des hémihypophyses de singes, périefusées en absence de tout facteur hypothalamique, sécrètent de la prolactine (PRL) et de l'hormone de croissance (GH) de façon variable au cours du temps (Stewart et al., 1985). La sécrétion de GH semble être relativement organisée puisque qu'elle présente une rythmicité ayant une période égale à 20-30 min (Stewart et al., 1985) (Figure 22). L'incubation dans des conditions similaires de fragments d'antéhypophyse de rats permet aussi la mise en évidence de la libération pulsatile d'hormone de croissance (Perez and Hymer, 1990). Les auteurs observent cependant des différences de sécrétion en fonction des régions puisque seuls les fragments dorsaux-caudaux semblent capables de sécréter l'hormone de façon rythmique (Perez and Hymer, 1990), suggérant ainsi qu'il y ait un centre rythmique localisé dans cette partie de la glande. Enfin, d'autres rythmicités antéhypophysaires plus lentes, comme celle de la LH (Lutéinisante

Hormone) ou de l'ACTH (AdrenoCorticoTropin Hormone) ont également été observés *in-vitro*, sur des hypophyses de souris et d'humains (Gambacciani et al., 1987a; Gambacciani et al., 1987b; Lewy et al., 1996).

L'ensemble de ces travaux montre que l'hypophyse possède des mécanismes intrinsèques responsables des pulsatilités endocrines.

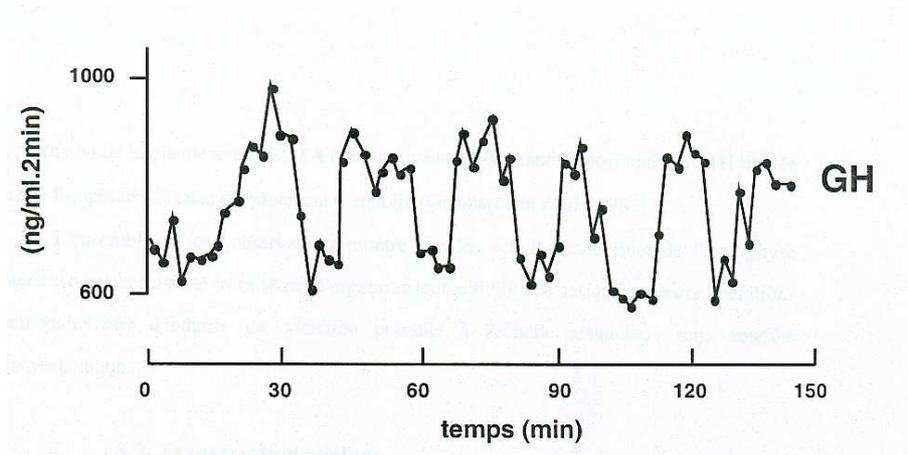


Figure 22 : Pulsativité hypophysaire autonome de la sécrétion d'hormone de croissance. Libération pulsatile de la GH par des hémihypophyses de singes incubées *in-vitro*. L'antéhypophyse sécrète l'hormone de croissance de façon rythmique et autonome en absence de toute stimulation hypothalamique.

(d'après Stewart JK et al, 1985)

2.2) Mécanismes intracellulaires participant aux pulsatilités hypophysaires.

2.2.1) Au niveau cellulaire.

Depuis de nombreuses années, les variations de concentration de calcium intracellulaire sont connues pour être à la base du concept de **couplage stimulation-sécrétion** dans les cellules nerveuses et neuroendocrines (Douglas, 1968). Une stimulation électrique des cellules entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants, générant une augmentation massive de la concentration calcique intra-cellulaire ($[Ca^{++}]_i$) responsable du processus d'exocytose. Ce mécanisme est également mis en jeu dans des cellules endocrines depuis qu'un certain nombre de travaux ont montré **la nature excitable des cellules**

endocrines (Poulsen and Williams, 1976; York et al., 1971), parmi lesquelles les cellules antéhypophysaires (Schlegel et al., 1987; Stojilkovic and Catt, 1992). Les études concernant les mécanismes de l'activité électrique et des signaux calciques des cellules hypophysaires montrent que ces cellules présentent des variations spontanées de la $[Ca^{++}]_i$, dues à l'activité électrique (Kwiecien and Hammond, 1998; Schlegel et al., 1987). Ainsi, les **cellules endocrines antéhypophysaires libèrent leur contenu hormonal par un processus d'exocytose dépendant d'une augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ due à l'activité électrique** (Schlegel et al., 1987; Tse et al., 1993). Ces oscillations spontanées de la $[Ca^{++}]_i$ peuvent être régulées par différents signaux, dont les facteurs hypothalamiques, qui agissent sur la fréquence et l'amplitude des signaux calciques (Cuttler et al., 1992; Guerineau et al., 1991; Stojilkovic and Catt, 1992). Ainsi, l'activité sécrétoire des cellules isolées de l'antéhypophyse antérieure est activée ou inhibée par une augmentation ou une diminution de la fréquence de l'activité calcique.

2.2.2) Au niveau tissulaire

Des enregistrements sur tranches aiguës d'hypophyse, permettant d'enregistrer les variations de $[Ca^{2+}]_i$ associées à l'activité électrique, tout en préservant l'architecture générale de la glande ont aussi été réalisés. Ils mettent en évidence une **organisation temporelle** des signaux calciques au sein du tissu antéhypophysaire (Bonfont et al., 2000). L'enregistrement de plusieurs dizaines de minutes permet d'observer que l'activité calcique spontanée s'organise en **bouffées rythmiques**, dans au moins trois types de cellules endocrines (PRL, GH, ACTH) (Figure 23), et ce, en réponse à une organisation similaire des signaux électriques (Bonfont et al., 2003; Bonfont et al., 2000). De plus, **des sécrétagogues hypothalamiques** peuvent moduler les durées relatives des phases d'activité et de repos des cellules (Bonfont et al., 2000).

Ainsi, au sein du tissu hypophysaire, l'activité calcique spontanée est définie par un profil temporel en bouffées finement régulé par les sécrétagogues hypothalamiques indépendamment d'une modulation de la fréquence du signal.

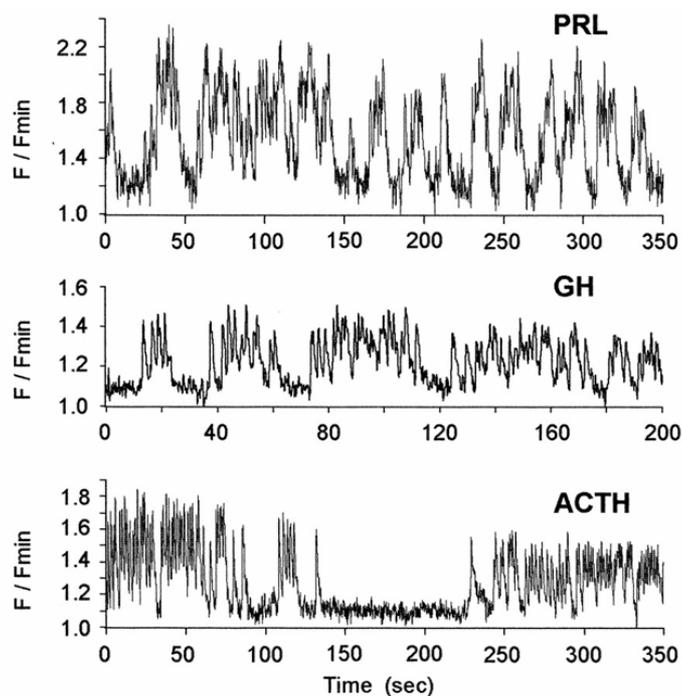


Figure 23 : Enregistrement de l'activité calcique spontanée de différents types cellulaires endocrines, réalisés sur tranches aiguës d'hypophyse.

Les cellules lactotropes (PRL), somatotropes (GH) et corticotropes (ACTH) présentent une activité calcique spontanée rythmique au cours du temps sous forme de bouffées.

(d'après Bonnefont X et al ; Endoc 2000)

2.3) Mécanismes intercellulaires participant aux sécrétions hypophysaires

L'antéhypophyse est un tissu présentant une architecture hétérogène. Elle est formée d'un assemblage de « cordons cellulaires » entre lesquels passent les capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. Les cellules endocrines se répartissent à l'intérieur des cordons, et sont intercalées avec des cellules non-endocrines : les cellules folliculostellaires (FS) qui présentent de longs prolongements cytoplasmiques (Baker et al., 1974). Bien que le parenchyme hypophysaire semble hétérogène, l'antéhypophyse présente une activité sécrétoire pulsatile autonome (voir 2.1). Ceci suggère, qu'en plus des mécanismes calciques intracellulaires (voir 2.2), il y ait des **mécanismes intercellulaires**, qui contribuent à organiser l'activité des cellules endocrines et à harmoniser les libérations hormonales afin d'induire des sécrétions pulsatiles à l'échelle de la glande entière.

2.3.1) Communications intercellulaires paracrines.

Des communications paracrines ont été mises en évidence et semblent participer au fonctionnement pulsatile de l'hypophyse (pour revue (Denef, 2008)). Ces communications sont des communications locales : des facteurs sécrétés par une cellule agissent sur les cellules avoisinantes.

En effet, le groupe de Carl Denef a montré l'importance des facteurs paracrines dans les réponses cellulaires, à partir d'une approche expérimentale d'agrégats reconstitués de cellules hypophysaires. Ils montrent que des agrégats reconstitués de cellules gonadotropes (FSH et LH) répondent moins bien à une stimulation par la GnRH hypothalamique, que des agrégats reconstitués à partir de cellules gonadotropes et d'autres types cellulaires endocrines ou non (cellules FS) (Denef et al., 1980). Ces travaux suggèrent que des signaux provenant des cellules non-gonadotropes participent directement ou indirectement à la réponse des cellules gonadotropes, mettant en jeu des **communications paracrines** dans lesquelles les cellules FS ont un rôle important (Baes et al., 1987). Par la suite, une centaine de **facteurs paracrines** pouvant agir sur l'activité des cellules endocrines antéhypophysaires ont été mis en évidence (Denef, 2008) (Figure 24). On trouve des facteurs tels que les facteurs peptidiques (Houben and Denef, 1994), les cytokines, et les facteurs de croissance (Ray and Melmed, 1997), les facteurs autocrines (activin, follistatin) (Knight, 1996), hormonaux (α MSH) (Zheng et al., 1997) ou encore l'ATP (Nunez and Frawley, 1998), et le monoxyde d'azote (NO) (Kato, 1992)...etc. Ces signaux, libérés en majeure partie par les cellules FS agissent localement sur les cellules voisines et contribuent à synchroniser le fonctionnement pulsatile des cellules endocrines (Schwartz and Cherny, 1992).

Signalling molecules

Neurotransmitters	Orexin B
Acetylcholine	Neuropeptide B
GABA	Neuropeptide W
Purines	Apelin
ATP, ADP	26Rfa
Arginine derivatives	Hormones and derivatives
Nitric oxide	Growth hormone
Agmatine	Prolactin
Fatty acid derivatives	Cleaved prolactin
Prostanoids	Glycoprotein hormone α -subunit
Anandamide	Growth factors
2-arachidonoylglycerol	Fibroblast growth factor (FGF)-2, FGF-4, FGF-8
Retinoic acid	Epidermal growth factor, transforming growth factor- α , neuregulins,
Neuropeptides	Insulin growth factor (IGF)-I, IGFII
Vasoactive intestinal peptide	Nerve growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor
Galanin	Transforming growth factor (TGF)- β 1, TGF- β 3, Activins, Inhibin,
Gastrin-releasing peptide	Bone morphogenetic protein (BMP)-2, BMP-4
Neuromedin B	Pancreatitis-associated protein
α -melanocyte-stimulating hormone	DII1, DII3, DIk1
γ -melanocyte-stimulating hormone	Cytokines
β -endorphin	Interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-11, IL-12
N-pro-opiomelanocortin	Leukaemia-inhibitory factor, interferon- γ , tumour necrosis factor- α , vascular endothelial growth factor,
Enkephalins	Angiopoietins
Dynorphin	Migration inhibitory protein, ciliary neurotropic factor, oncostatin M,
Neuropeptide Y	Leptin
Substance P	Tissue factors
Neurokinin B	Insulin growth factor-binding proteins
Neuromedin U	Follistatin, Noggin,
Neurotensin	Interleukin-1 antagonist
Vasopressin	Annexin 1
Oxytocin	Adiponectin
Delta-sleep-inducing peptide	Adiponutrin
Vascular growth factor peptides	Resistin
Calcitonin	
Calcitonin-R-stimulating peptide	
Calcitonin gene-related peptide	
Intermedin	
Adrenomedullin, adrenomedullin N-terminal 20 peptide	
Atrial natriuretic peptide	
B-type natriuretic peptide	
C-type natriuretic peptide	
Angiotensin II	
Gastrin	
Endothelins	
Thyroid-releasing hormone	
Gonadotrophin-releasing hormone	
Growth hormone-releasing hormone	
Somatostatin	
Corticotrophin-releasing hormone	
Urocortin	
Urocortin II	
Prolactin-releasing peptide	
Ghrelin	
Cocaine and amphetamine-regulated transcript	
Orexin A	

Figure 24 : Tableau répertoriant l'ensemble des facteurs paracrines de l'antéhypophyse.

(d'après Deneff C, J Neuro 2008)

2.3.2) Communication intercellulaire par un couplage électrique.

Des études, basées sur des cultures de cellules endocrines antéhypophysaires, ont démontré la présence de **jonctions communicantes** entre les cellules endocrines d'une part et d'autre part entre ces cellules endocrines et les cellules FS (Guerineau et al., 1997; Morand et al., 1996). Au sein de l'antéhypophyse, des études réalisées sur des tranches révèlent l'existence des jonctions communicantes impliquées dans la synchronisation de l'activité spontanée de petits groupes de cellules endocrines. Ce phénomène existe notamment entre cellules somatotropes voisines (Guerineau et al., 1998) (figure 25).

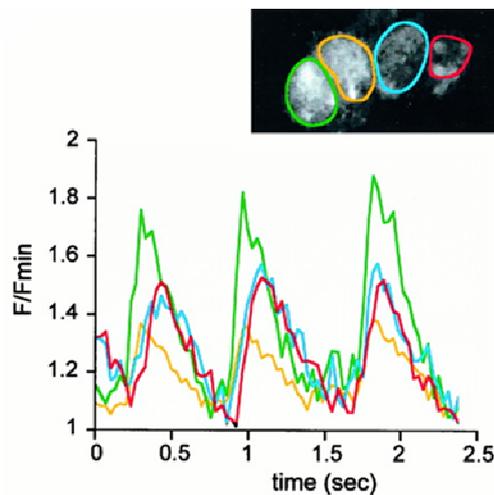


Figure 25 : Exemple d'un enregistrement de l'activité calcique spontanée de plusieurs cellules maintenues dans leur environnement tissulaire.

Les cellules 4 enregistrées forment un groupe de cellules juxtaposées (photo du haut) qui présentent des variations synchrones de la $[Ca^{++}]_i$. La présence de jonctions communicantes sur ces cellules participe au couplage entre ces cellules.

(d'après Guélineau N et al., JBC 1998).

De telles jonctions communicantes impliquées dans la synchronisation de cellules endocrines pourraient être présentes dans l'ensemble des glandes du système endocrine. Il a notamment été montré dans le pancréas que des jonctions communicantes permettent une sécrétion concertée des cellules endocrines. En effet, le pancréas libère de l'insuline en réponse aux variations du taux de glucose plasmatique. Ainsi, lors d'une augmentation de la

glycémie, le pancréas libère massivement et efficacement l'insuline. Les cellules β pancréatiques, contenues dans les îlots de Langerhans se synchronisent et permettent ainsi une sécrétion concertée (Gylfe et al., 1991; Tengholm and Gylfe, 2009). Cette coordination entre les cellules est rendue possible par **un couplage de l'activité électrique (couplage électrique)** dû à la présence de jonctions communicantes entre les cellules β faisant intervenir notamment la connexine 36 (Serre-Beinier et al., 2000).

Dans l'hypophyse, le couplage des cellules *via* des jonctions communicantes pourrait aussi participer à l'élaboration d'une réponse sécrétoire coordonnée. Cependant, ce mécanisme n'est peut-être pas le plus important au sein de l'hypophyse, puisqu'il reste très localisé.

2.3.3) Communications intercellulaires organisées en réseau.

2.3.3.1) Réseau excitable de cellules folliculostellaires

Nous avons vu précédemment que le parenchyme antéhypophysaire contient des cellules non-endocrines : les cellules FS qui participent notamment aux communications paracrines. Au sein du parenchyme hypophysaire, les cellules FS s'organisent formant **un réseau tridimensionnel** dans les mailles duquel sont situées les cellules endocrines (Vila-Porcile, 1972). Les cellules FS communiquent entre elles et avec les cellules endocrines via des jonctions communicantes (Morand et al., 1996; Soji et al., 1997). Comme pour les cellules endocrines, les cellules FS sont des cellules excitables, douées d'une **activité électrique et calcique spontanée** (Fauquier et al., 2001). Ainsi, la configuration en réseau et le caractère excitable de ces cellules FS leur permet de propager des **vagues de signaux calciques à longue distance** qui traversent la glande de part et d'autre (Fauquier et al., 2001) (Figure 26). Ce réseau de communication à longue distance pourrait participer à la synchronisation de l'activité des cellules endocrines, nécessaire à l'élaboration des pulsatilités hormonales, et ce, même lorsque la glande est isolée.

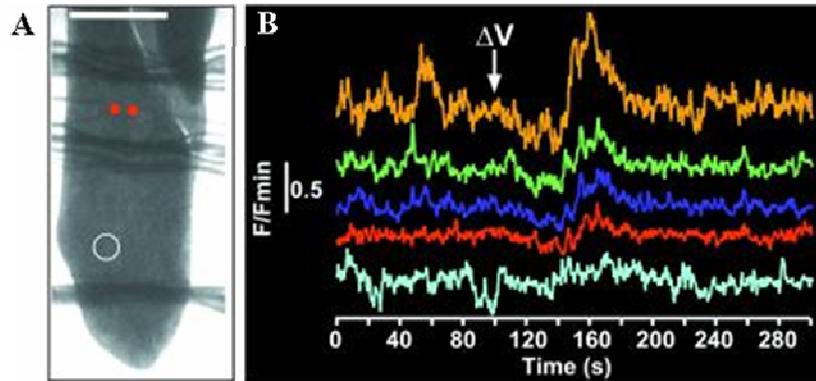


Figure 26 : Illustration de la propagation de signaux calciques, à longue distance, au sein de l'antéhypophyse.

A. Une tranche coronale d'hypophyse est maintenue par des fils de nylons (traits noirs). Les 2 points rouges permettent d'identifier la position des électrodes de stimulation. B. Les variations de $[Ca^{++}]_i$ ont été enregistrées dans 5 cellules différentes de la zone identifiée par un cercle en A. Une stimulation électrique réalisée à la 75^{ème} seconde de l'enregistrement entraîne de façon synchrone une augmentation de la $[Ca^{++}]_i$ dans les 5 cellules en même temps.

(d'après Fauquier T et al, PNAS 2001)

2.3.3.2) Réseau fonctionnel de cellules endocrines

De la même façon qu'il existe une organisation spatiale fonctionnelle des cellules FS, l'étude tridimensionnelle relève également la présence d'un **réseau de cellules endocrines, somatotropes** (GH), de part en part de l'hypophyse (Bonfont et al., 2005) (Figure 27). Ce réseau repose sur la présence de jonctions adhérentes entre les cellules GH (Figure 27) et change d'organisation en fonction de la demande en hormone. De plus, lorsqu'une stimulation au GHRH est appliquée, ceci entraîne l'apparition de vagues calciques qui se propagent dans certaines parties du réseau (Bonfont et al., 2005). L'harmonisation de l'activité des cellules GH dans certaines parties du réseau contribue probablement à optimiser la réponse de l'hypophyse à la stimulation hypothalamique. Ce réseau de cellules endocrines GH semble donc être un support de l'organisation des pulsatilités de la GH par l'hypophyse.

Pour le moment, cette étude sur les cellules GH est la seule étude publiée qui décrit l'existence d'une organisation en réseau tridimensionnelle des cellules endocrines. Il est aussi possible que ce soit le cas pour d'autres types cellulaires endocrines, étant donné que les autres hormones hypophysaires présentent aussi des sécrétions pulsatiles. Au laboratoire, l'organisation spatiale des cellules ACTH et des cellules à prolactine PRL, est en cours d'étude. Il semble que l'organisation en 3 dimensions existe aussi pour ces cellules. Ainsi,

l'ensemble de ces travaux indique que l'hypophyse bien qu'hétérogène semble être bien organisée.

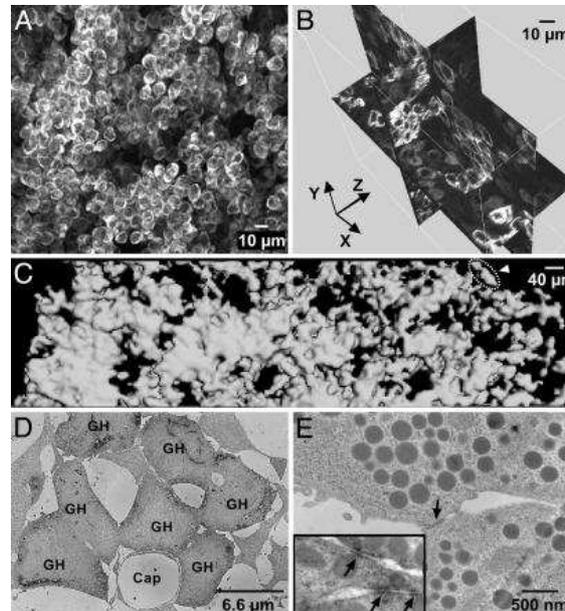


Figure 27 : Organisation tridimensionnelle du réseau de cellules somatotropes (GH) au sein de l'antéhypophyse.

A., B., C., Les cellules GH taggées par la GFP forment un réseau en 3 dimensions au sein de l'antéhypophyse. D. et E. Les images de microscopie électronique montrent la présence de liens étroits, entre les cellules du réseau, dus à des jonctions adhérentes identifiées par les flèches.

(d'après Bonnefont X et al, PNAS 2005)

En conclusion, bien que l'activité sécrétoire rythmique de l'hypophyse soit largement soutenue par les facteurs hypothalamiques, elle possède aussi un fonctionnement rythmique intrinsèque. Ainsi, chaque cellule a un fonctionnement électrique rythmique propre qui joue sur les sécrétions d'hormones. Ces rythmicités cellulaires sont synchronisées au sein de la glande entière, par des communications intercellulaires. L'ensemble des mécanismes électriques intra et intercellulaires participe ainsi aux pulsatilités hypophysaires, ceci n'exclut pas la participation d'autres mécanismes de régulation dans le fonctionnement rythmique de l'hypophyse.

IV) Problématique.

La rythmicité des fonctions biologiques est une composante essentielle de l'organisation des êtres vivants. Chez les mammifères, un grand nombre de fonctions physiologiques et comportementales sont coordonnées sur une échelle de temps de 24h par un **système circadien complexe** (cf II). Les sécrétions hormonales font partie des paramètres rythmiques de l'organisme. Nous avons vu précédemment (Cf III) que l'antéhypophyse sécrète ses hormones de façon hautement **pulsatile et rythmique**, avec des rythmes que l'on retrouve sur différentes échelles de temps (GH : sécrétion ultradienne, ACTH : libération circadienne et FSH et LH : sécrétion infradienne). Cette pulsativité antéhypophysaire est cruciale pour l'efficacité d'action de ses hormones qui contrôlent un grand nombre de fonctions physiologiques. Dans ce travail, nous souhaitons savoir, de manière générale, **si le système circadien, dans sa complexité, participe au fonctionnement pulsatile et rythmique de l'antéhypophyse.**

Certaines études ont déjà pu montrer qu'il existe un lien entre l'horloge des NSC et la sécrétion circadienne de l'ACTH par l'antéhypophyse (Szafarczyk et al., 1979). Parallèlement, le système circadien contrôle aussi des fonctions non-circadiennes telles que le rythme ultradien du chant des drosophiles (Kyriacou and Hall, 1980) ou le rythme infradien de la reproduction chez des souris (Miller et al., 2004). Dans la mesure où le système circadien peut contrôler **des fonctions non circadiennes**, nous avons cherché à savoir, dans un premier temps, si ce système complexe peut participer au contrôle des pulsativités antéhypophysaires non circadiennes ? Pour répondre à cette première question, nous avons étudié deux axes endocrines liés à des pulsativités antéhypophysaires non-circadiennes : **l'axe somatotrope impliquant la sécrétion ultradienne de GH et l'axe gonadotrope impliquant la sécrétion infradienne de FSH et LH, par l'antéhypophyse.**

Nous avons vu que le système circadien est composé d'une multitude d'oscillateurs circadiens autonomes dont le fonctionnement repose sur un mécanisme intracellulaire rythmique impliquant des gènes horloges. L'antéhypophyse fait partie de ces différents oscillateurs circadiens autonomes. En effet, deux études différentes ont montré que la glande, conservée pendant plusieurs jours *ex-vivo*, présente un rythme circadien de l'expression d'un

gène ou d'une protéine horloge qui se maintient sur plusieurs cycles (Figure 28) (Abe et al., 2002; Yoo et al., 2004).

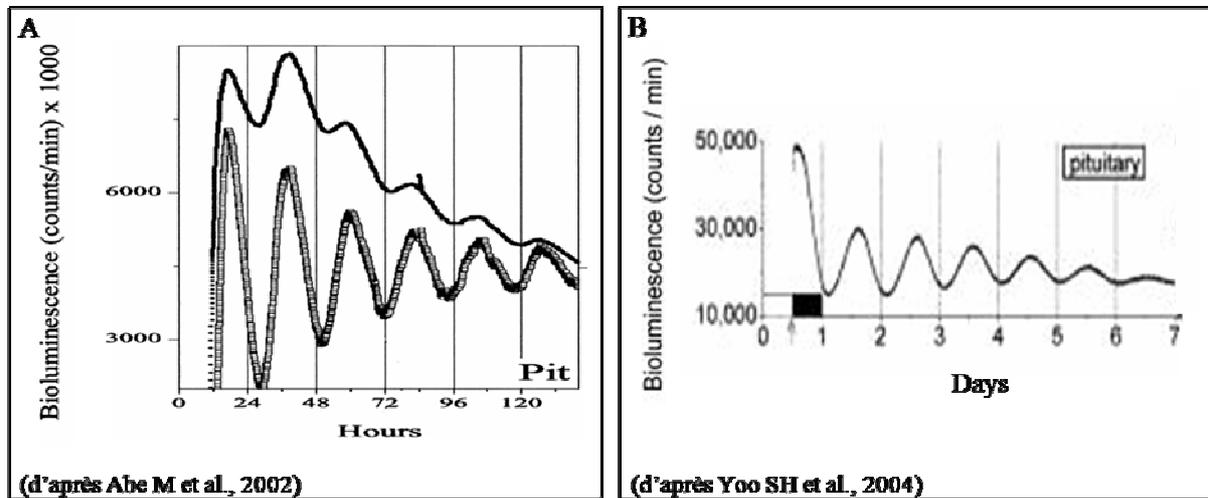


Figure 28 : L'antéhypophyse : un oscillateur circadien autonome.

(A) Oscillations circadiennes dans l'expression du gène horloge *mPer1* dans deux hypophyses conservées *ex-vivo*. Les hypophyses sont issues de rats transgéniques exprimant la luciférase sous le contrôle du promoteur de *mPer1*. (B) Oscillations circadiennes dans l'expression de la protéine horloge PERIOD2 dans une hypophyse conservée *ex-vivo*. L'hypophyse est issue d'une souris exprimant une protéine chimère PERIOD2 : luciférase.

De plus en plus d'études montrent que les gènes horloges interviennent dans le fonctionnement rythmique des organes dans lesquels ils sont exprimés (Kornmann et al., 2007; Lamia et al., 2008). Or l'hypophyse sécrète ses hormones de façon hautement pulsatile et rythmique. Nous avons vu que cette pulsatilité est, notamment, gouvernée par l'action de neuro-hormones hypothalamiques et d'autres facteurs extra-hypophysaires. Mais, nous avons également vu que **l'antéhypophyse possède des mécanismes intrinsèques** qui pourraient participer au fonctionnement pulsatile de la glande. La mise en évidence de l'expression des gènes horloges dans l'hypophyse apporte de nouveaux éléments pour la compréhension des mécanismes rythmiques intra hypophysaires et laisse une question en suspens : **l'activité pulsatile de la glande peut-elle aussi être liée à une horloge antéhypophysaire ?**

Dans le but de répondre à cette question nous avons, dans la seconde partie de ce travail, caractérisé l'horloge antéhypophysaire.

MATERIELS ET METHODES

1. Expériences de RT-PCR-quantitative

Animaux

Les animaux ont été placés dans différentes conditions, selon l'étude réalisée :

- **Quantification des gènes hépatiques**

Des souris mâles et femelles sauvages (WT), ou *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* dans lesquelles l'horloge circadienne est inactivée (van der Horst et al., 1999), âgées de 8 à 10 semaines, sont maintenues en 12L/12D avec une disponibilité alimentaire permanente. ZT0 et ZT12 correspondent respectivement au début et à la fin de la phase lumineuse.

Pour quantifier l'expression des gènes hépatiques au cours du temps, les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale toutes les 4 heures pendant 24h. Le foie a été prélevé et immédiatement congelé dans de l'azote liquide, puis conservé à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

Dans cette étude, un lot de mâles *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* a reçu pendant une semaine une injection de bGH (50 μg) (fourni par Dr Parlow), d'Octréotide (50ng) (Sigma), ou de Serum physiologique administrée toutes les 12 heures. Les animaux sont sacrifiés à ZT4 le 8^{ième} jour.

- **Expériences sur les ovaires**

Des souris femelles sauvages (WT), ou *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* âgées de 8 à 10 semaines, sont maintenues en 12L/12D avec une disponibilité alimentaire permanente.

Pour quantifier l'expression de certains gènes des ovaires, les animaux sont tous sacrifiés à la même heure par dislocation cervicale, le jour du proestrus. Les ovaires sont prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide, puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

- **Caractérisation de l'horloge hypophysaire**

Des souris mâles sauvages (WT), âgées de 8 à 10 semaines, sont maintenues en 12L/12D avec une disponibilité alimentaire permanente.

Pour quantifier l'expression des gènes horloges au cours du temps, 3 animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale toutes les 4 heures pendant 24h. L'hypophyse, le foie, les poumons ont été prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

- **Expériences de variation de la photopériode**

Des souris mâles sauvages (WT), âgées de 8 à 10 semaines, de fond génétique C57Bl6, sont maintenues soit en conditions classiques 12L/12D (12 heures de jour et 12 heures de nuit), soit en jours longs 18L : 6D (18 heures de jour et 6 heures de nuit), ou en jours courts 8D : 16L (6 heures de jour et 18 heures de nuit), avec une disponibilité alimentaire permanente. ZT0 correspond au début de la phase lumineuse. Pour quantifier l'expression des gènes horloges au cours du temps, 3 animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale toutes les 4 heures pendant 24h. L'hypophyse, le foie, les poumons ont été prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

- **Expériences d'inversion de prise alimentaire (RF)**

Des souris mâles sauvages (WT), âgées de 8 à 10 semaines, de fond génétique C57Bl6, sont maintenues en 12L/12D et réparties en plusieurs lots :

- un lot de souris contrôle ayant accès à la nourriture en continu (ad libitum).

- un lot de souris ayant accès à la nourriture uniquement la journée **pendant 1 semaine** (DRF1) et un lot contrôle ayant accès à la nourriture uniquement pendant les 12h de nuit (NRF1).

-un lot de souris ayant accès à la nourriture uniquement la journée **pendant 3 semaines** (DRF3) et un lot contrôle ayant accès à la nourriture uniquement pendant les 12h de nuit (NRF3).

Pour quantifier l'expression des gènes horloges au cours du temps, 3 animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale toutes les 4 heures pendant 24h. L'hypophyse, le foie, les poumons ont été prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

- **Expériences de surrénalectomie**

Des souris mâles sauvages (WT), âgées de 9 semaines, surrénalectomisées et témoins (sham) ont été sacrifiées, par dislocation cervicale, toutes les 6 heures pendant 24 heures. A chaque point, l'hypophyse, le foie, les poumons de 2 sham et 2 opérées en DRF et 2 sham et 2

opérées en NRF, ont été prélevés et immédiatement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

Extraction des ARNs et transcription inverse

Les ARNs totaux ont été extraits à l'aide d'un kit RNeasy (QUIAGEN) puis dosés par mesure de la densité optique à 260nm. Nous avons ensuite synthétisé les ADNc avec $500\mu\text{g}$ d'ARN, avec 250ng de Random Hexamers, 10mM de dNTP et 200Unités de Reverse transcriptase Superscript III (Invitrogen) dans un volume finale de $20\mu\text{l}$.

Choix des primers et PCR-Q

Nous avons utilisé la méthode de RT-PCR-quantitative par détection de la fluorescence en temps réel à l'aide du kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) avec le thermocycler Abi Prism 7500 (Applied Biosystems).

Les amorces des gènes ont été sélectionnées avec le logiciel Primer Express (Tableau 1). Pour chaque gène, nous nous sommes assurés que les amorces recouvrent une jonction exon-exon, et nous avons testé au préalable la spécificité et l'efficacité de la PCR avec ces amorces. Nous avons réalisé la PCR sur 10 à 20ng d'ADNc total pour chaque échantillon résultant de la RT-PCR.

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de $10\mu\text{l}$ avec 50nM de primers. Les paramètres des cycles de la PCR étaient : 2 minutes à 50°C , 10 minutes à 95°C , puis il y a eu 40 cycles à 95°C pendant 15s, puis à 60°C pendant 1 minute. L'étape finale est ensuite une étape de dénaturation qui permet de vérifier qu'un seul produit a été amplifié.

Analyse

Les données ont ensuite été analysées avec le logiciel ABI Prism 7500 SDS. L'amplification relative de cDNA a été calculée par comparaison du nombre de cycles nécessaires (CT) pour arriver à un seuil de fluorescence fixé. Nous avons ensuite normalisé les résultats avec les valeurs d'amplification du gène *Gapdh* que nous avons utilisé comme gène de référence après avoir vérifié que son expression est constante dans toutes nos conditions expérimentales. Les données sont représentées sous la forme de moyennes +/- SEM.

Pour l'analyse statistique, une ANOVA et des tests de Man-Whitney ont été pratiqués. La significativité a été placée à $p < 0.05$

Gènes		Séquence des Primers (5'-3')	Gènes		Séquence des Primers (5'-3')
Cyp2b9	forward	TGGCCGAGGGACCATTG	Per1	forward	GAAAGAAACCTCTGGCTGTTCT
	reverse	GCCCACTGGCAAAAAATATACC		reverse	GGAATGTTGCAGCTCTCCAAA
Cyp2d9	forward	GAAGACCCCTTTCCTCATCAG	Per2	forward	ATCAACCCGTGGAGCAGGAA
	reverse	TTCTCAGTCAACAGGTTATCC		reverse	GGGAGCTGCGAACACATCCT
Cyp3a41	forward	TCGATGAGACTCTGCCCAATAA	Cry1	forward	GTTCCGCGGCTCTTCCA
	reverse	GCACCATATCCAGGTATTCCATCT		reverse	ATCTCAAGACACTGAAGCAAAAA
Cyp4a12	forward	CCCAACTGTGTGGCCAAATC	Cry2	forward	GGGACTCTGTCTATTGGCATCTG
	reverse	GGCTGTGCCGGGAAGAC		reverse	GTCACTCTAGCCCGCTTGGT
Cyp7b1	forward	AGCCCTGCGTGACGAAAATTG	Emal1	forward	GCAGTGCCACTGACTACCAAGA
	reverse	GCACAGCCTCAGAACCTCAAG		reverse	TCC1GGACATTGCATTGCAT
Elovl3	forward	AGTGGTCTGTCTATCTGTTG	Clock	forward	CACAGCGGAGGTCGTCCT
	reverse	GCTGAGAAGAAAGAGAAAAGG		reverse	GACATCGCTTGTGTTAATG
Gapdh	forward	GGAGCGAGACCCCACTAACA	Npas2	forward	CACTCGGAAAATGGACAAAACC
	reverse	ACATACTCAGCACCGGCCTC		reverse	TGAGACTTCATTGTGTTCTGCAA
Ghr	forward	GTTGACGAAATAGTGCAACCTGAT			
	reverse	CACGAATCCCGTCAAACTAA			
Igf1	forward	CCCACTGACATGCCCAAGA			
	reverse	CTCCTTTCAGCTTCGTTTCT			
Mup1	forward	GGGAAACCTTCCAGCTGATG			
	forward	GCAAACCTTTCCTTGATGTCTGA			

Tableau1 : Séquences des Primers utilisés pour la PCR-Quantitative.

2. Expériences d'immunofluorescences.

- **Immunomarques de PER1 dans le cerveau et l'hypophyse**

L'expression de la protéine PER1 a été détectée dans les NSC, et dans chacun des types cellulaires de l'hypophyse, par l'anticorps anti-PER1 (fourni et produit par le Dr David Weaver- University of Massachusetts). Les animaux sont d'abord perfusés avec du Paraformaldéhyde à 4% (PFA 4%). Le cerveau et l'hypophyse de chaque animal sont prélevés et fixés sur la nuit, dans du PFA 4%. Des coupes coronales de 50 micromètres d'épaisseur ont ensuite été réalisées avec un vibratome. Le jour de l'expérience, les coupes sont sélectionnées et l'on réalise une étape de démasquage, en mettant les coupes dans un tampon de démasking (Roche) porté à 90°C pendant 3 min. Les coupes sont ensuite incubées pendant 48h à 4°C, avec les anticorps primaires: anti-PER1 (de lapin) dilué à 1/8 000 dans du PBS-BSA2%-Triton0.1%-Sérum d'âne 1%, et ceux dirigés contre les différentes hormones hypophysaires (anti GH, ACTH, TSH, FSH, LH, PRL, de Guinea Pig) dilués dans le même tampon à 1/8000. Les coupes sont ensuite rincées dans du PBS et incubées pendant 2h avec les anticorps secondaires dilués à 1/2000 : Anti –Guinea Pig couplé au fluorophore Alexa 488 (Molecular Probes) anti-lapin couplé au fluorophore Cyanine 3 (Molecular Probes). Les images ont été acquises à l'aide d'un apotome (Zeiss).

Pour chaque expérience, le marquage de PER1 a d'abord été validé sur des coupes de NSC obtenues toutes les 4 heures pendant 24 heures (Figure 29).

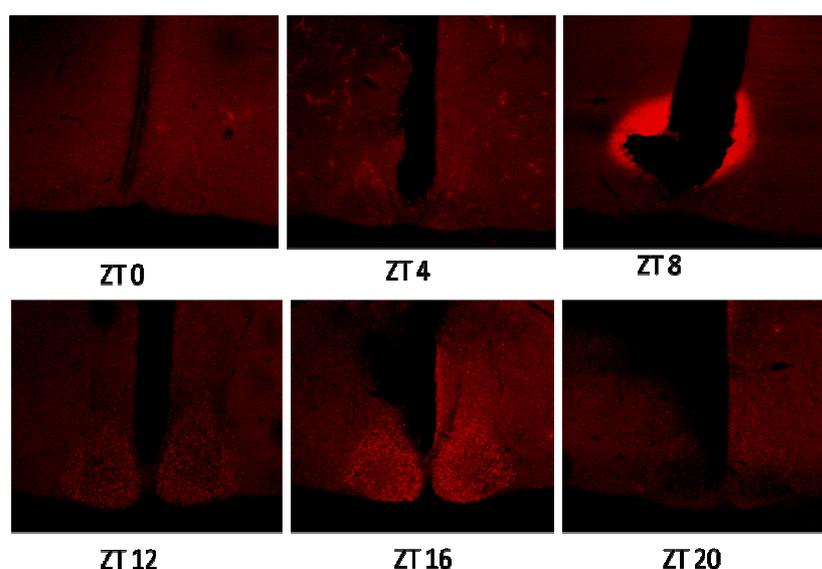


Figure 29 : Expression de PER1 dans les Noyaux Suprachiasmatiques (NSC).

Immunofluorescence utilisant un anticorps anti-PER1 (en rouge). PER1 est exprimée avec un rythme circadien dans les NSC et présente un pic maximal d'expression entre ZT 12 et ZT16, soit 4 heures avant l'hypophyse.

- **Marquage de l'apoptose (Caspase3-clivée) dans les ovaires**

Le prélèvement des ovaires est effectué après une perfusion PFA 4%. Les ovaires sont post-fixés la nuit dans du PFA% et sont ensuite incubés 24 heures dans du sucrose à 20%, pour être ensuite inclus dans du tissu-tex et congelés à -80°C. Des coupes de 15µm sont réalisées au cryostat. Les coupes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante, avec l'anticorps primaire anti-caspase3 clivé, de lapin (Cell Signaling) dilué à 1/500. Les coupes sont ensuite rincées avec du PBS et incubées à nouveau avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorophore Cyanine 3 (Molecular Probes), dilué à 1/2000.

3. Surrénalectomie

Des souris mâles de 6 semaines ont été anesthésiées sous masque d'isoflurane et ont reçu une injection sous-cutanée de Kétoprofen (0.30mg), un antalgique, et de NaCl (100µl), pour compenser les pertes hydriques dues à l'opération. Deux catégories d'animaux sont définies : les animaux témoins (Sham) et les animaux surrénalectomisés (Adx). Pour la surrénalectomie, les deux glandes surrénales ont été retirées via deux incisions bilatérales. Les animaux surrénalectomisés ont ensuite été maintenus pendant 3 semaines à l'animalerie en 12L : 12D, avec une alimentation restreinte NRF ou DRF, et de l'eau salée (9g de NaCl par litre) pour le maintien de l'équilibre hydrique, puisque ces souris ne peuvent plus sécréter d'aldostérone.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Nathalie Coutry, pour l'apprentissage de la chirurgie.

4. Dosages d'hormones et phéromones

- **Prélèvements de sang**

Le sang est prélevé, dans des tubes héparinés, au niveau du tronc, après que les animaux aient été guillotiné à différents moments de la journée pris au hasard. Le sang est centrifugé à 2000 tours par minutes pendant 10 min à 4°C, pour extraire le plasma qui est alors conservé à -80°C jusqu'aux dosages.

- **Hormone de croissance**

L'hormone de croissance a été dosée dans le sang et dans la glande entière par la technique de dosage Radio-Immunologique (RIA), en collaboration avec Danielle Carmignac (Londres). Le Dr Parlow nous a fourni le kit. Pour le dosage de la GH dans les hypophyses entières, les glandes sont homogénéisées dans du PBS-BSA3%, et l'homogénat est dosé par RIA

- **Testostérone**

Les dosages de testostérone sont effectués avec un kit ELISA (Cayman Chemical).

- **MUP**

Les niveaux d'expression des MUPs sont déterminés dans l'urine. L'urine d'un même animal est prélevée le matin et le soir et les deux urines obtenues sont mélangées puis centrifugées (3 min à 8800g, 40°C). Le surnageant est dilué au 1/20 dans du Laemli 2X et est porté à 90°C pendant 1min30s. 8µl de cette solution est déposée sur un gel d'électrophorèse (15%SDS-Polyacrylamide) qui est coloré avec du bleu de Comassie après migration. Les bandes bleues obtenues, aux alentours du poids moléculaire de 20 000, correspondent aux protéines MUPs. La taille de ces bandes est analysée dans Image J, afin d'obtenir une étude semi-quantitative.

5. Caractérisation de la fonction de reproduction et de lactation

Huit souris femelles de chaque génotype : *Cry1+/-Cry2+/-* (servant de témoin), *Cry1-/-*, *Cry2-/-* et *Cry1-/-Cry2-/-*, et âgées de 8 semaines, sont mises en accouplement avec des mâles sauvages (1 mâle pour 4 femelles). Les femelles gestantes sont isolées et la mise bas est surveillée. Le jour de la mise bas, le nombre de petits est compté et on ne laisse à la mère que 4 petits. A partir de ce jour (P) et jusqu'à P10, les mères et les petits sont pesés tous les jours.

6. Frottis vaginaux.

Le suivi jour après jour des cycles ovariens des souris est effectué par des frottis vaginaux qui ont lieu tous les jours à la même heure. 10µl de sérum physiologique sont introduits dans le vagin des souris, et ré-aspiré avec une pipette, se chargeant ainsi de cellules de l'épithélium vaginal. La forme et la population des cellules sont analysées, après une coloration à l'éosine. Ceci qui permet de déterminer la phase du cycle (Figure 30).

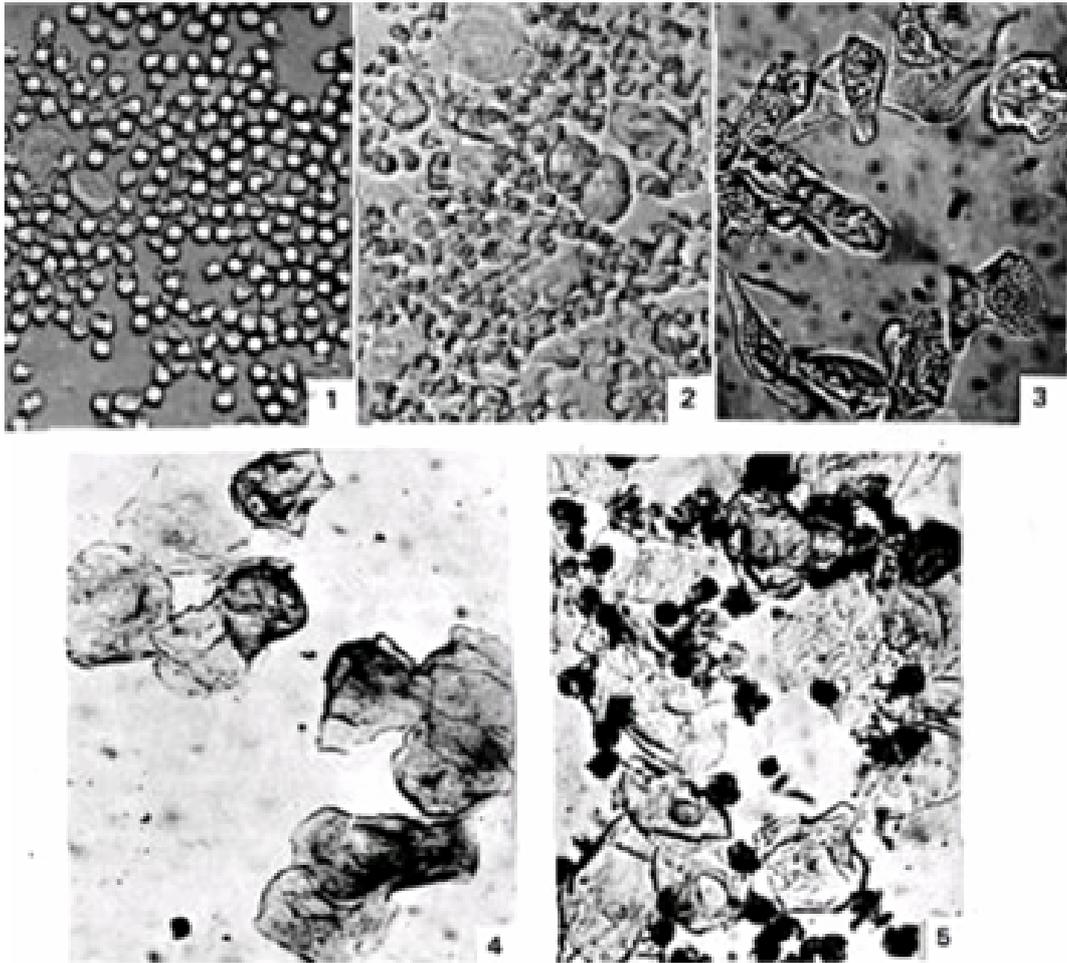


Figure 30 : Cytologie vaginale

Les cycles ovariens des souris durent entre 4 et 5 jours pendant lesquels la cytologie vaginale évolue. La Phase de Diestrus (1) est caractérisée par l'abondance de leucocytes. La phase de proestrus (2) est définie par la présence de 50% de leucocytes et 50% de cellules épithéliales nucléées. Les phases d'Early-Estrus (3) et d'Estrus (4) (ovulation) sont caractérisées par la présence d'un grand nombre de cellules épithéliales anucléées. La phase de Metestrus (5) est définie par la présence de leucocytes et de cellules épithéliales nucléées.

RESULTATS

PARTIE I

PULSATILITES NON-CIRCADIENNES

CONTRÔLEES PAR L'HORLOGE

CIRCADIENNE

1) L'horloge circadienne contrôle la pulsativité ultradienne de GH.

Publication :

The Circadian Clock Components CRY1 and CRY2 Are Necessary to Sustain Sex Dimorphism in Mouse Liver Metabolism.

Bur I.M, Cohen-Solal A.M, Carmignac D, Abecassis P-Y, Chauvet N, Martin A.O, van der Horst G.T.J, Robinson I.C.A.F, Maurel P, Mollard P, and Bonnefont X.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 14, pp. 9066–9073, April 3, 2009.

Cf: Editorial:N. R. Gough, Feminizing Liver Metabolism. Sci. Signal. 2, ec118 (2009).

Problématique:

Comme nous l'avons vu en introduction, l'hormone de croissance est sécrétée avec une pulsativité ultradienne qui est cruciale pour son efficacité d'action. Dans cette partie, **l'objectif de mes travaux était de comprendre si l'horloge circadienne est impliquée dans le contrôle de la pulsativité sécrétoire ultradienne de l'hormone de croissance(GH).**

Chez les souris, le volume de sang est trop faible pour pouvoir faire des prélèvements réguliers en vue de caractériser le profil sécrétoire de la GH. Cependant, le modèle murin est le seul modèle d'altération génétique de l'horloge circadienne. C'est pourquoi, nous avons étudié différents paramètres qui reflètent indirectement la pulsativité GH, chez des souris qui présentent une altération de l'horloge circadienne. Il est connu depuis de nombreuses années que, chez les rats mais aussi chez l'Homme, il existe un dimorphisme sexuel dans le profil de sécrétion de la GH. La pulsativité est très marquée chez les mâles et moins bien chez les femelles (Figure 31). Ce dimorphisme sexuel entraîne des différences de phénotype entre les deux sexes que l'on peut mesurer. Ainsi, ces différences permettent de faire la comparaison des mesures obtenues chez les souris transgéniques avec celles obtenues chez des animaux contrôles, témoins d'un profil pulsatile de GH, pour les mâles sauvages, ou moins pulsatile pour les femelles sauvages.

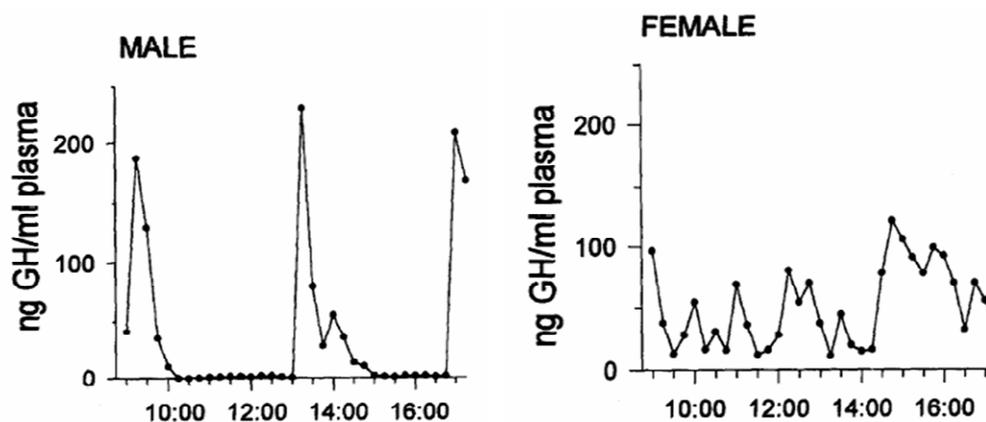


Figure 31 : Dimorphisme sexuel de la sécrétion ultradienne de GH chez les rats.

Chez les rats mâles (à gauche), où la GH est sécrétée avec des pics de grande amplitude, toutes les 4 heures, entrecoupés de périodes de silence. Chez les femelles (à droite), les pics de sécrétion de la GH sont de faible amplitude et il n'y a pas de période de silence.

(d'après Shapiro BH et al., 1995)

L'absence d'une forte pulsativité GH chez les femelles est responsable d'une croissance moins efficace que chez les mâles. De plus, un grand nombre de gènes exprimés dans le foie, cible principale de la GH, qui sont dépendants de la pulsativité de GH, ont des niveaux d'expression différents entre mâles et femelles (Ahluwalia et al., 2004). Une grande partie de ces gènes appartient à la famille des Cytochromes P450, mais il y a aussi le gène *Mup1* qui code pour une phéromone sécrétée dans l'urine. Chez les mâles qui présentent une forte pulsativité, *Mup1* est fortement exprimé, alors que chez les femelles *Mup1* est faiblement exprimé (Johnson et al., 1995; Norstedt and Palmiter, 1984). L'expression de ce gène est souvent utilisée comme marqueur de la pulsativité GH. La croissance et les niveaux d'expression des gènes hépatiques dépendants du pattern GH sont autant de paramètres qui reflètent indirectement la pulsativité GH. L'ensemble de ces différents paramètres a donc été mesuré chez des souris mutantes de l'horloge.

Méthodes :

Plusieurs modèles d'animaux présentant une altération de l'horloge ont été étudiés. Tout d'abord, une partie de l'étude a été réalisée chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}* (notées *Cry^{-/-}*) qui présentent une inactivation de deux des gènes de la composante négative de l'horloge moléculaire (van der Horst et al., 1999).

Ensuite, les résultats ont été comparés à ceux obtenus chez les souris *Bmal1^{-/-}*, inactivées pour *Bmal1*, un gène horloge de la composante positive du mécanisme moléculaire (Bunger et al., 2000).

Enfin, nous avons étudié les paramètres qui reflètent indirectement la pulsativité GH, chez des souris mâles âgées, chez qui la sécrétion de GH (cg. Intro III 1.2) (Dhir and Shapiro, 2003), et l'horloge circadienne (Hastings et al., 2003) sont altérées.

Afin d'identifier les effets des différentes altérations de l'horloge sur le pattern ultradien de GH, nous avons étudié différents paramètres en comparant à chaque fois les mâles et les femelles des différents génotypes. La GH a été dosée par RIA, dans les hypophyses entières, et dans la circulation sanguine à un instant pris au hasard. Le poids des animaux a été suivi pendant 12 semaines à partir du sevrage des petits et donne un indice sur la croissance des animaux. L'expression des gènes du foie dépendant du profil pulsatile de GH (*Mup1*, *Cytochromes P450*) a été mesurée par PCR-quantitative au cours de 24 heures et

les protéines MUPs ont été quantifiées directement dans les urines. Enfin, l'activité enzymatique des CypP450 a été analysée au sein de microsomes.

Toutes les techniques expérimentales sont décrites dans la partie Matériels et méthodes.

Principaux résultats :

*Altération du profil ultradien de GH chez les mâles *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}**

D'une part, nous avons effectué des dosages de la GH circulante présente dans des plasmas, prélevés de manière aléatoire dans le temps, chez souris *Cry^{-/-}* et sauvages (WT). Ces dosages révèlent que la valeur médiane de la distribution des échantillons est plus élevée chez les mâles *Cry^{-/-}* que chez les WT. De plus, chez les mâles *Cry^{-/-}*, nous avons trouvé beaucoup moins d'échantillons présentant une très faible quantité de GH que chez les mâles WT. Ceci suggère que le profil de GH des mâles *Cry^{-/-}* comprend moins de phases de silence et/ou qu'elles durent moins longtemps que chez les mâles WT.

D'autre part, les souris *Cry^{-/-}* ont un problème de croissance : nous avons constaté une différence d'environ 10% entre le poids des animaux sauvages et des souris *Cry^{-/-}*. Cette altération de la croissance est plus marquée chez les mâles que chez les femelles, bien qu'ils ne présentent pas de défaut des taux plasmatiques de testostérone. Ainsi, à l'âge adulte, les mâles ont le même poids que les femelles, provoquant la perte du dimorphisme sexuel.

La quantification des gènes hépatiques (dépendants du profil ultradien de la GH) révèle aussi bien pour les gènes de la famille des Cyp P450 que pour *Mup1*, une féminisation des profils d'expression chez les mâles *Cry^{-/-}* au cours de la journée. Cette féminisation au niveau génique est aussi présente dans l'activité enzymatique des CYP P450, et dans la quantité des protéines MUPs excrétées dans les urines. Ainsi, l'ensemble des marqueurs, géniques et protéiques, utilisés comme des marqueurs du profil de GH, est féminisé chez les mâles *Cry^{-/-}*.

Supposant que la pulsativité GH est altérée chez les mâles *Cry^{-/-}*, des injections pulsatiles de GH (bGH) et d'Octréotide (Oct : un analogue de la somatostatine) ont été effectuées sur ces animaux afin de restaurer le profil GH. Les injections de bGH permettent de mimer les pics de GH, alors que les injections d'Octréotide permettent de recréer les périodes de silence. Après une semaine de traitement, nous avons constaté que ces injections

pulsatiles restaurent les niveaux d'expression des gènes hépatiques qui étaient fortement féminisés chez les mâles *Cry*^{-/-}.

Les travaux présentés ci-dessus convergent tous vers le même résultat : la pulsativité ultradienne de GH est altérée chez les mâles *Cry*^{-/-} qui n'ont plus d'horloge circadienne fonctionnelle.

Altération du dimorphisme hépatique chez les souris *Bmal1*^{-/-}

Nous avons montré que l'altération de l'horloge, chez les mutants *Cry*^{-/-}, aboutit à une perte de la pulsativité GH. Dans cette deuxième étude, nous nous sommes intéressés aux effets d'une autre mutation de l'horloge sur le profil de GH. Ainsi, nous avons mesuré l'expression des gènes hépatiques qui dépendent du profil de GH, chez les souris *Bmal1*^{-/-} (Bunger et al., 2000). Ce travail a été réalisé en collaboration avec F. Delaunay et F. Guillaumond qui nous ont fourni les cDNA de foies, issus des animaux *Bmal1*^{-/-} et de leurs témoins, à ZT4.

Les quantifications obtenues par PCR-quantitative révèlent que chez les mâles *Bmal1*^{-/-}, l'expression des gènes hépatiques tend à se féminiser (Figure R1). Le dimorphisme sexuel présent dans l'expression de certains gènes du foie, en reflet du profil sécrétoire de GH, est donc altéré comme chez les souris *Cry*^{-/-}.

D'autres études ont montré que la croissance corporelle des souris *Bmal1*^{-/-} est altérée (Kondratov et al., 2006; Sun et al., 2006). Ainsi, la perte du dimorphisme sexuel des gènes hépatiques et l'altération de la croissance corporelle observées chez les mâles *Bmal1*^{-/-} semblent être, comme pour les souris *Cry*^{-/-}, le reflet d'une altération de la pulsativité GH. Cette étude indique que la perte de la pulsativité GH observée, chez les mâles *Cry*^{-/-}, n'est pas un effet spécifique des gènes *Cry* (*1-2*), mais qu'elle est plutôt due à une altération de l'horloge circadienne elle-même.

Contrairement aux mâles *Cry*^{-/-} qui ne présentent aucun défaut dans le taux plasmatique de la testostérone (Bur et al., 2009), les mâles *Bmal1*^{-/-} ont un défaut de production des hormones stéroïdiennes et présentent une baisse des taux de testostérone (Alvarez et al., 2008). Ces hormones stéroïdes jouent un rôle sur l'axe somatotrope pour le contrôle de la pulsativité GH. Chez les mâles *Bmal1*^{-/-}, il n'est donc pas possible de discriminer l'effet de l'altération de l'horloge et l'effet de la baisse de la testostérone, sur la pulsativité GH.

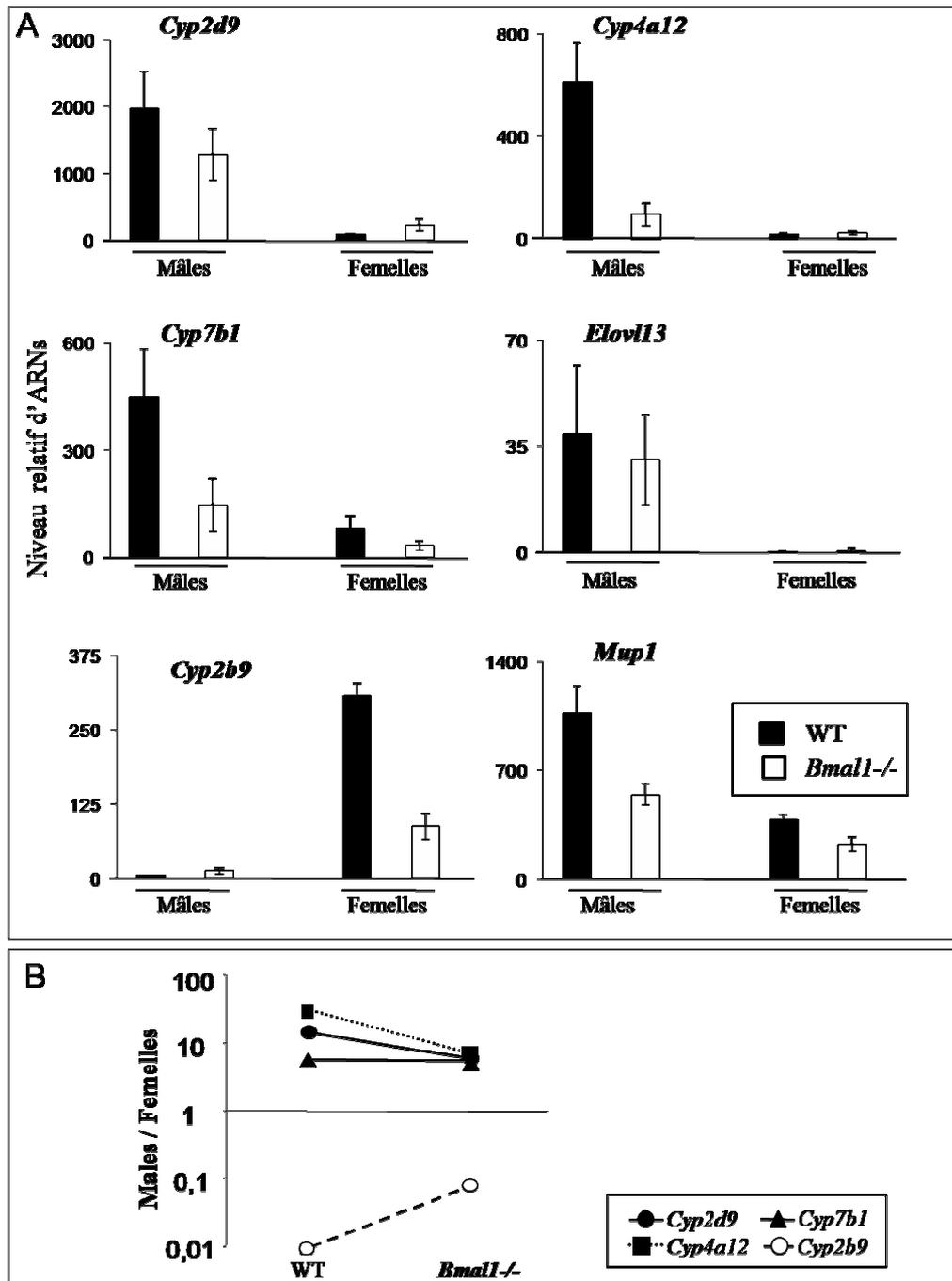


Figure R1 : Altération du dimorphisme sexuel dans l'expression des gènes dépendants de la pulsativité GH, chez les souris *Bmal1*^{-/-}.

(A). Niveau d'expression des gènes hépatiques qui présentent un dimorphisme sexuel chez les souris sauvages en reflet des différences de pulsativité entre mâles et femelles. Pour de nombreux gènes, le niveau d'expression observé chez les mâles *Bmal1*^{-/-} tend à se rapprocher de celui des femelles.

(B). Chez les souris *Bmal1*^{-/-}, le rapport des niveaux d'expression mâles sur femelles tend vers 1, illustrant la perte de dimorphisme sexuel dans l'expression des gènes hépatiques chez ces animaux.

Altération du dimorphisme hépatique chez des souris mâles âgées

Il a été décrit dans la littérature que, chez les souris âgées, l'horloge circadienne est moins robuste (Hastings et al., 2003), et que l'axe somatotrope qui contrôle la sécrétion de GH, est altéré (Dhir and Shapiro, 2003; Kuwahara et al., 2004). Les souris âgées sont donc un autre modèle pour l'étude de l'implication de l'horloge circadienne dans la pulsativité GH. Nous avons donc mesuré et comparé l'expression des gènes hépatiques, dépendants du profil de GH, chez des souris mâles âgées de 2 ans et des souris plus jeunes âgées de 8 semaines. Cette étude révèle une féminisation dans l'expression des gènes hépatiques, chez les souris âgées (Figure 5 (Bur et al., 2009)). De plus, les niveaux observés chez les mâles âgés sont tout à fait similaires à ceux observés chez les mâles *Cry*^{-/-} qui sont du même fond génétique C57Bl6.

Conclusion :

Les trois études présentées ci-dessus montrent selon trois modèles différents d'altération de l'horloge circadienne que celle-ci joue, à l'évidence, un rôle dans les mécanismes responsables de la forte pulsativité ultradienne de GH chez les mâles. Etant donné que le profil de GH contrôle en amont l'expression des enzymes hépatiques, mises en jeu dans le métabolisme de détoxification, et, que d'importantes différences de détoxification ont déjà été décrites entre mâles et femelles, l'horloge circadienne est ici impliquée pour la première fois, dans les mécanismes qui participent au contrôle des différences entre mâles et femelles.

The Circadian Clock Components CRY1 and CRY2 Are Necessary to Sustain Sex Dimorphism in Mouse Liver Metabolism*

Received for publication, November 3, 2008, and in revised form, February 2, 2009. Published, JBC Papers in Press, February 11, 2009, DOI 10.1074/jbc.M808360200

Isabelle M. Bur^{†1}, Anne M. Cohen-Solal[‡], Danielle Carmignac[§], Pierre-Yves Abecassis[¶], Norbert Chauvet[‡], Agnès O. Martin[‡], Gijsbertus T. J. van der Horst^{||}, Iain C. A. F. Robinson[§], Patrick Maurel^{**}, Patrice Mollard[‡], and Xavier Bonnefont^{†2}

From [†]CNRS, UMR 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle and INSERM, U661 and Université Montpellier, 34094 Montpellier, France, the [§]National Institute of Medical Research, Division of Molecular Neuroendocrinology, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom, [¶]Sanofi-Aventis, Discovery Metabolism and Pharmacokinetics Safety (DMPK-S), 3 Digue d'Alfortville, 94140 Alfortville, France, the ^{||}Erasmus University Medical Center, Department of Genetics, Dr. Molewaterplein 50, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands, and ^{**}INSERM, U632, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, France

In mammals, males and females exhibit anatomical, hormonal, and metabolic differences. A major example of such sex dimorphism in mouse involves hepatic drug metabolism, which is also a noticeable target of circadian timekeeping. However, whether the circadian clock itself contributes to sex-biased metabolism has remained unknown, although several daily output parameters differ between sexes in a number of species, including humans. Here we show that dimorphic liver metabolism is altered when the circadian regulators *Cryptochromes*, *Cry1* and *Cry2*, are inactivated. Indeed, double mutant *Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-} male mice that lack a functional circadian clock express a number of sex-specific liver products, including several cytochrome P450 enzymes, at levels close to those measured in females. In addition, body growth of *Cry*-deficient mice is impaired, also in a sex-biased manner, and this phenotype goes along with an altered pattern of circulating growth hormone (GH) in mutant males, specifically. It is noteworthy that hormonal injections able to mimic male GH pulses reversed the feminized gene expression profile in the liver of *Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-} males. Altogether, our observations suggest that the 24-h clock paces the dimorphic ultradian pulsatility of GH that is responsible for sex-dependent liver activity. We thus conclude that circadian timing, sex dimorphism, and liver metabolism are finely interconnected.

Phenotypic differences between males and females of a given species exist from invertebrates to humans and cover various features including disease susceptibility and life span, for example. Although the anatomical and hormonal differences between sexes are well described, few genetic determinants are

known to account for sexual dimorphism in mammals. Recent genome-wide studies on various mouse tissues showed that major differences in gene expression between males and females involve drug metabolism (1, 2), and among somatic organs, the sex-biased transcriptional activity is particularly high in the liver (3–5). These observations may provide insight into why many drugs exhibit a faster clearance in women as compared with men (6) but also underscore the importance of considering sex issues in studies on liver metabolism.

Interestingly, liver activity also fluctuates along the light-dark cycle and is a noticeable target of circadian timekeeping (7–9). Both systemic cues and a circadian clock within hepatocytes are involved in daily oscillations of liver metabolism (10, 11). However, because most of these studies were focused on males exclusively, the possible interaction between circadian oscillators and sex dimorphism of hepatic activity is not documented.

This prompted us to investigate whether circadian cogwheels could also be involved in the sexual dimorphism observed at the hepatic level. Indeed, several daily output parameters differ between sexes in a number of species, including humans (12–14), which may reflect the ability of the suprachiasmatic nuclei (SCN),³ where the central pacemaker resides, to sense sexual hormones through receptors to androgens and estrogens (15, 16). We therefore assessed liver activity in homozygous double mutant *Cryptochrome 1* and *2* males and females (hereafter referred to as *Cry*^{-/-} mice) that are devoid of a functional circadian clock (17). Our results reveal that *Cry*^{-/-} males have a feminized liver and pinpoint dimorphic GH pulsatility as the main signal altered by the inactivation of *Cryptochromes*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Quantitative Real-time PCR—Eight-week-old *Cry*^{-/-} (17) and isogenic control mice, maintained under a 12-h light/12-h dark cycle (ZT0 and ZT12 refer to lights on and off, respectively) and free access to food and water, were sacrificed by cervical dislocation. Livers were rapidly removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until use. Total RNA extraction was done with the RNeasy kit (Qiagen) according to the

* This work was supported by the Netherlands Organization for Scientific Research Grant ZonMW Vici 918.36.619 to G. T. J. v. d. H., a Marie Curie European Reintegration Grant from the European Community (to X. B.), a grant from the Région Languedoc-Roussillon (to P. M.), a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (to P. M. and X. B.), and a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (to P. M. and X. B.).

¹ Fellow of the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

² To whom correspondence should be addressed: Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France. Tel.: 33-467142989; Fax: 33-467542432; E-mail: Xavier.Bonnefont@igf.cnrs.fr.

³ The abbreviations used are: SCN, suprachiasmatic nuclei; *Cry*, *Cryptochrome*; Cyp, cytochrome P450; GH, growth hormone; OHT, hydroxylated testosterone; MUP, major urinary protein; STAT5b, signal transducer and activator of transcription 5b; ZT, zeitgeber time; ANOVA, analysis of variance.

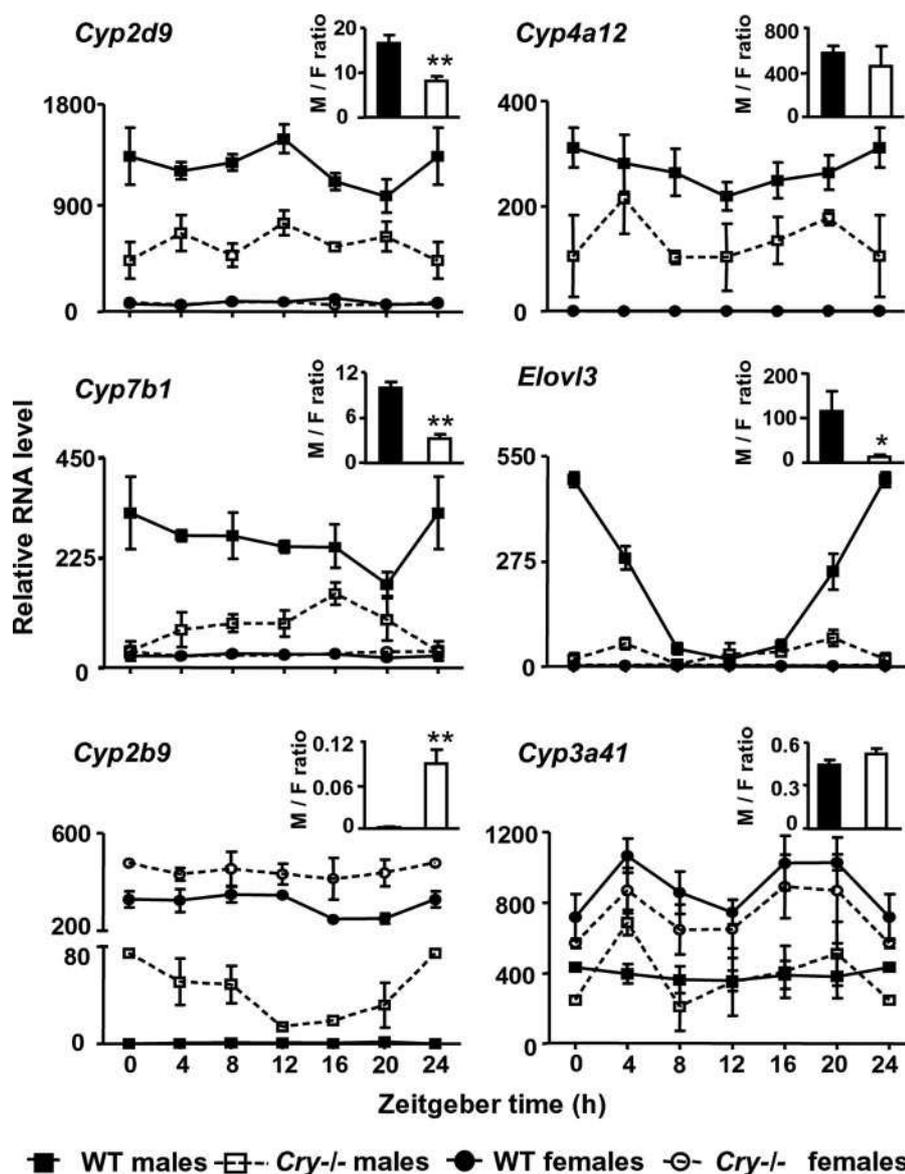


FIGURE 1. The sex dimorphism in gene expression is reduced in the liver of *Cry*^{-/-} mice. Livers from control and *Cry*^{-/-} mice were collected every 4 h. Relative RNA levels, measured by quantitative PCR, are shown for control wild type (WT, closed symbols, solid lines) and *Cry*^{-/-} (open symbols, dotted lines) males (squares) and females (circles), respectively. Data from ZT0 are replotted at ZT24 to improve readability. RNA levels are graphed as means \pm S.E., $n = 3-4$ for each series. For all genes, the global statistical significance is $p < 0.005$ between control males and females and between males of both genotypes (two-way ANOVA). Insets show the average ratio of expression over 24 h between male and female livers (M/F ratio) in wild type (solid bars) and *Cry*^{-/-} mice (open bars). **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ as compared with control males, Mann-Whitney U test.

manufacturer's instructions. Total RNA was then reverse-transcribed into cDNA by using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) with oligonucleotide random hexamers. Primers of the mouse mRNAs to be investigated were designed using Primer Express (Applied Biosystems) or Beacon Designer (Premier Biosoft) and checked for specificity using the BLAST program. In general, PCR primers were chosen to introduce a minimum of a two-nucleotide mismatch with all related *Cyp* subfamily members. Results presented for *Cyp3a41* may actually represent the combined contribution of *Cyp3a41* and *Cyp3a16* RNA because the primers bring only one single nucleotide mismatch in between the two forms and theoretical amplicons with 96% homology that may not be distinguished by

the dissociation curve of amplified products conducted to verify the unicity of amplified products. Real-time PCR was performed and analyzed using a 7500 Fast real-time PCR system with SYBR Green master mix (Applied Biosystems). Relative expression levels were determined using the comparative C_T method to normalize target gene mRNA to *Gapdh*.

Microsome Preparation and Assessment of Cytochrome P450 Enzymatic Activity—Two-month-old mice were sacrificed at ZT4, and their livers were rapidly dissected, homogenized in homogenizing buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, and 250 mM sucrose) with the addition of phosphatase inhibitors (1 mM sodium orthovanadate and 10 mM sodium fluoride) and a protease inhibitor (100 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride) and centrifuged at 9000 rpm for 15 min to obtain a total tissue homogenate. Microsomal pellets were separated from cytosolic supernatant by ultracentrifugation and suspended in potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA and 20% glycerol. Microsomal protein concentrations were determined using the Bradford assay.

Testosterone hydroxylase activity was measured as described previously (18). Liver microsomes were tested at 1 mg of proteins/ml in 0.05 M Tris buffer, pH 7.4, for testosterone hydroxylase activity using 300 μ M of ¹⁴C-labeled testosterone as a substrate. In addition, 5 α -reductase activity was inhibited by the addition of 5 μ M finasteride to the incubation mixture. The NADPH-

regenerating system was composed of 10 mM glucose-6-phosphate, 5 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 10 mM MgCl₂ in 0.05 M Tris buffer, pH 7.4. The reaction was started by the addition of 1 mM NADPH. The incubation, at 37 $^{\circ}$ C, lasted 15 min, and the reaction was stopped using a mixture of 3 ml of dichloromethane and 65 nmol of 11 β -hydroxytestosterone (UV internal standard). Each sample was vigorously vortexed and centrifuged. Two ml of organic phase were transferred to a clean glass test tube and evaporated to dryness under a stream of nitrogen gas. Nitrogen-dried dichloromethane extracts were dissolved in a mixture of 0.1 M ammonium acetate/methanol/acetonitrile. Testosterone metabolites were separated by reverse phase high pressure liquid chroma-

Sex Dimorphism in the Liver Depends on Circadian Timekeeping

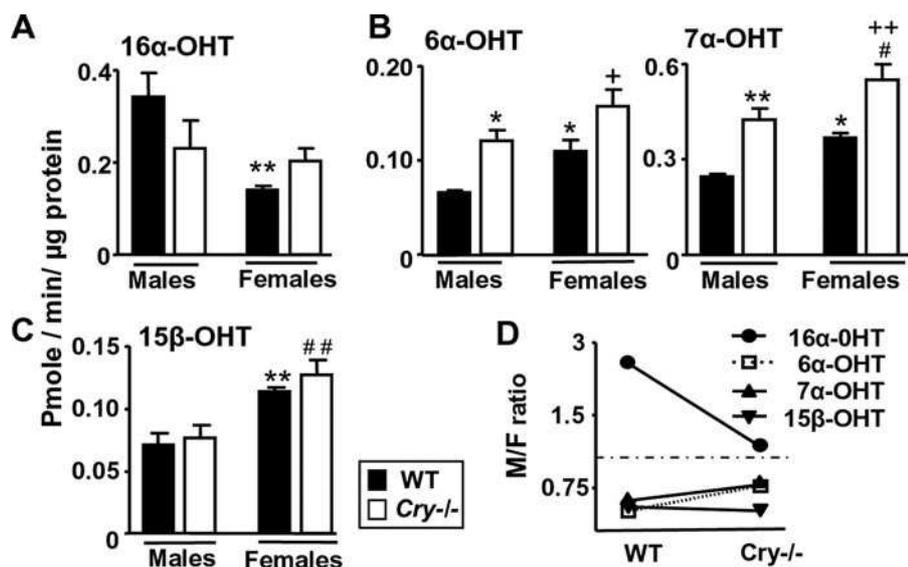


FIGURE 2. Sex differences in liver microsomal testosterone hydroxylase activities are reduced in *Cry*^{-/-} mice. Testosterone hydroxylase activities were determined in liver microsomes prepared from wild type (WT, solid bars) and *Cry*^{-/-} mice (open bars). Specific activities are shown for male-predominant 16 α -hydroxylase (A), female-predominant 6 α -hydroxylase and 7 α -hydroxylase (B), and 15 β -hydroxylase (C). D, activity ratios between male and female microsomes are plotted on a log scale. Note that this ratio tends to 1 (horizontal dashed line) for microsomal activities measured from *Cry*^{-/-} mice in A and B, whereas it remains constant for 15 β -hydroxylase activity. **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ as compared with control males, ++, $p < 0.01$ and +, $p < 0.05$ as compared with control females and ##, $p < 0.01$ and #, $p < 0.05$ as compared with *Cry*^{-/-} males; symbols are omitted when differences are not significant (two-way ANOVA; $n = 5$ animals in each condition, means \pm S.E.).

tography, using Symmetry C18 column 5 μ m (220 \times 2.1 mm), heated at 55 $^{\circ}$ C. The mobile phases used were (phase A) 0.1 M ammonium acetate; 30% methanol and (phase B) 0.1 M ammonium acetate; 70% methanol. Hydroxylated metabolites were monitored by UV at 247 nm and by radioactivity detection and eluted with a linear gradient: 0.7% of phase B/min at a flow rate of 350 μ l/min. Hydroxylated testosterone (OHT) standards (2 α -OHT, 2 β -OHT, 6 α -OHT, 6 β -OHT, 7 α -OHT, 11 β -OHT, 15 α -OHT, 15 β -OHT, 16 α -OHT, 16 β -OHT) were used to identify testosterone metabolites.

Determination of MUPs Levels in Urine—Urine was collected at ZT4 and briefly centrifuged (3 min at 8800 \times g). The supernatant was diluted (1/20) with 2 \times Laemmli buffer and heated at 90 $^{\circ}$ C for 90 s. Routinely, 8 μ l of urine solution were analyzed by electrophoresis on a 15% SDS-polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue. Relative amounts of proteins in the molecular weight range of 20,000 were estimated by integrating band density, expressed in arbitrary units.

Hormonal Assays—Circulating hormones were measured from trunk blood collected in heparinized centrifuge tubes for plasma preparation. For pituitary content, anterior pituitary glands were homogenized in phosphate-buffered saline. Assays were performed using a testosterone enzyme-linked immunosorbent assay kit (Cayman Chemical), according to the manufacturer's recommendations, and a GH-specific radioimmunoassay using reagents provided by A. F. Parlow.

RESULTS

The Sex Dimorphism in Liver Activity Is Impaired in *Cry*^{-/-} Mice—To determine whether circadian clock components impact on differences between males and females, we assessed by real-time quantitative PCR the expression of several dimor-

phic genes in the liver of male and female mice sacrificed at selected time points around the light-dark cycle and compared their expression level in control and double homozygous *Cry*^{-/-} mice. Sexually dimorphic genes include members of the *cytochrome P450 (Cyp)* family that are involved in the hydroxylation of steroid hormones and various chemicals, and *Elovl3*, involved in fatty acid biosynthesis (1). In control animals, we found that the difference in expression between males and females persists all along the light-dark cycle for most of the genes considered (Fig. 1). As reported previously (19, 20), *Elovl3* exhibits daily variations in male liver and is hardly detectable in females at any time point (Fig. 1).

Interestingly, the male-female dimorphism is strongly reduced in *Cry*^{-/-} mice. Indeed, the male-predominant genes *Cyp2d9*, *Cyp4a12*, and *Cyp7b1* are significantly down-regulated along the light-dark cycle in male *Cry*^{-/-} livers, whereas modest, if any, alteration is noticed in females (Fig. 1). The expression of *Elovl3* becomes constitutively low, and daily variations are abolished in male livers. Conversely, the female-predominant gene *Cyp2b9* is significantly up-regulated in *Cry*^{-/-} mutant males, which dramatically increased the expression ratio between males and females (Fig. 1, inset). Hence, inactivation of *Cry1* and *Cry2* genes leads to a feminization of the expression patterns of several genes in the male liver.

The different expression patterns of *Cyp* genes between sexes are believed to affect the rate of metabolism for a given substrate directly. To assess whether the feminized gene expression profile of *Cry*^{-/-} males is translated at the metabolic level, we measured the activity of microsomal hydroxylases. Levels of the male-predominant testosterone 16 α -hydroxylase activity tend to become similar in microsomes from *Cry*^{-/-} males and females (Fig. 2, A and D). In parallel, the sexual dimorphism in production of the female-predominant metabolites 6 α -OH and 7 α -OH testosterone is reduced in *Cry*^{-/-} mice as compared with wild types (Fig. 2, B and D). Although testosterone metabolites cannot be reliably ascribed to individual *Cyp* forms, these findings mirror our results obtained with quantitative PCR and support that metabolic sex dimorphism is altered in *Cry*^{-/-} mice.

It is worth noting that the feminization of *Cry*^{-/-} males is incomplete and does not extend to all sexually dimorphic genes of liver metabolism. For example, the male-female difference in expression of the female-predominant gene *Cyp3a41* remains unchanged in *Cry*^{-/-} animals (Fig. 1). Similarly, the female-predominant testosterone 15 β -hydroxylase activity is not altered in either *Cry*^{-/-} males or females (Fig. 2, C and D).

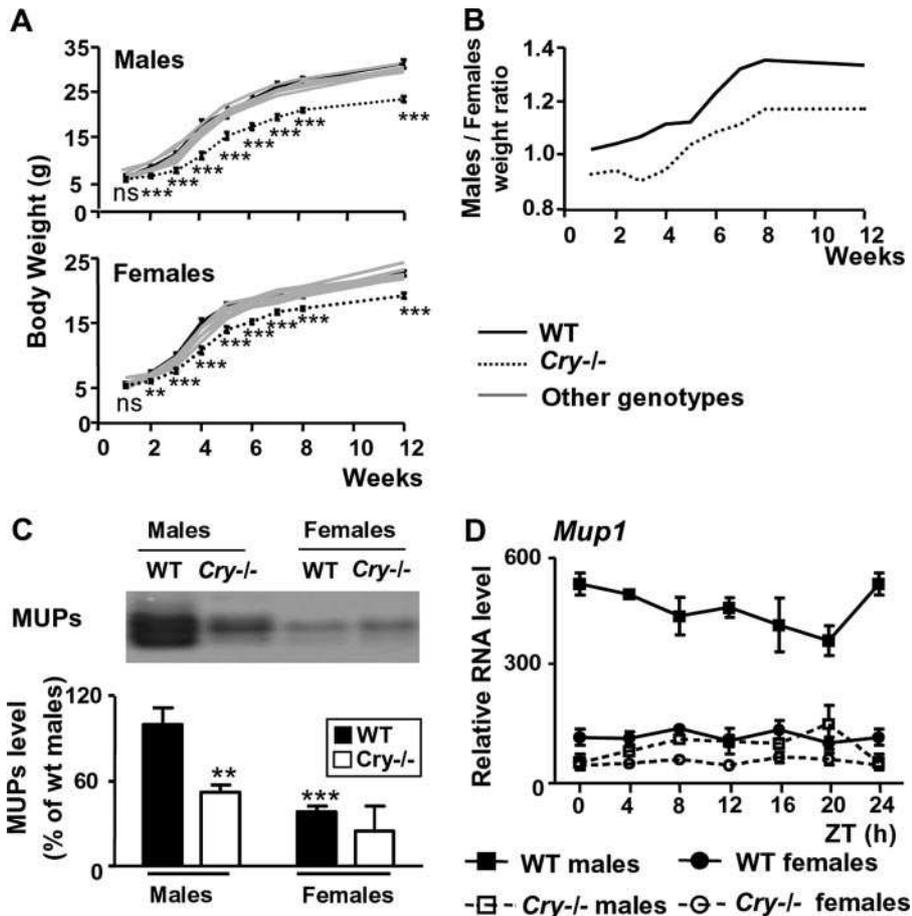


FIGURE 3. The GH-dependent sex dimorphism is suppressed in *Cry*^{-/-} mice. A, body weight of animals obtained from *Cry1*^{+/-}/*Cry2*^{+/-} intercrosses. Wild type (black solid line), *Cry*^{-/-} (dotted line) and littermates bearing at least one wild type *Cry* allele (gray solid lines), males (upper panel) and females (lower panel), were weighed weekly from 1 to 8 weeks of age and at 12 weeks. Data are graphed as means \pm S.E. ***, $p < 0.005$, **, $p < 0.01$, and ns, not significant, for control versus *Cry*^{-/-} mice, Mann-Whitney *U* test. B, male/female body weight ratios for wild type (WT, solid line) and *Cry*^{-/-} (dotted line) mice. Note that ratio values are close to 1 in *Cry*^{-/-} mice, indicating a loss of sexually dimorphic growth rates. C, MUPs accumulation. A representative example of MUPs stained with Coomassie Blue after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (upper panel) and pooled analysis of MUPs content in urine of wild type (solid bars, $n = 9$ males and $n = 14$ females) and *Cry*^{-/-} (open bars, $n = 15$ males and $n = 12$ females) is shown. ***, $p < 0.005$ and **, $p < 0.01$ as compared with wild type males (two-way ANOVA). D, *Mup1* expression level in the liver of mice used in Fig. 1. The global statistical significance by two-way ANOVA is $p < 0.001$ between control males and females and between males of both genotypes.

Moreover, *Cry*^{-/-} males are fertile⁴ and exhibit normal levels of circulating testosterone (3784 ± 1099 pg/ml, $n = 8$, and 2996 ± 860 pg/ml, $n = 6$, in wild type and *Cry*^{-/-} males, respectively, $p > 0.05$, Mann-Whitney *U* test), which is in contrast with another mutant mouse line lacking the circadian clock protein BMAL1 (21). These observations suggest that the feminization of the liver of *Cry*^{-/-} mutant males is not driven by impaired gonadic function. Instead, a definite pathway must be altered downstream the testicular activity, leading to the partial feminization of the liver.

Dimorphic Traits Dependent on Ultradian GH Pulsatility Are Feminized in *Cry*^{-/-} Males—Ultradian profiles of circulating GH are a key mediator for sex-dependent effects on the liver in many species (3, 22–24). Indeed, a major difference between males and females in both rats and mice is the sustained (3–4 h) interpulse interval of low GH between peaks of secretion (25,

26), required for the expression of male-specific liver genes (27). These sex differences in GH patterns largely contribute to the sexual dimorphism in body growth (28). The pulsatile GH release is also well known for increasing the synthesis of major urinary proteins (MUPs) in the liver of males and their subsequent accumulation in urine (29, 30). We therefore decided to rely on these two parameters, body growth and MUPs content, as indirect read-outs of GH pulsatility.

Firstly, previous studies reported that clock-deficient *Bmal1*^{-/-} or *Cry*^{-/-} mice are significantly smaller than control animals (31–33). This prompted us to systematically compare the postnatal growth of *Cry*^{-/-} males and females. Double mutant *Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-} animals of either sex exhibit a marked reduction in size and show a 10–20% reduction of body weight as compared with littermates bearing at least one wild type allele of either *Cry* gene (Fig. 3A). This growth deficit first becomes apparent at 2–3 weeks after birth, which matches the onset of the somatotroph axis (28). Importantly, the growth deficiency of *Cry*^{-/-} mice is more pronounced in males than in females, leading to a decrease of sex dimorphism in body growth as emphasized by the lower body weight ratio between males and females in mutant animals as compared with wild type mice (Fig. 3B).

Secondly, to estimate the accumulation of MUPs, urine from matched control and *Cry*^{-/-} males and females was collected and analyzed by electrophoresis. We found that MUPs levels are dramatically decreased in the urine of male *Cry*^{-/-} mice as compared with wild type males (Fig. 3C). This is not due to a deficiency in urine concentration because urine osmolarity is even slightly higher in *Cry*^{-/-} mice than in control animals (2397 ± 184 mosM/kg H₂O, $n = 12$ and 2451 ± 231 mosM/kg H₂O, $n = 9$ for mutant males and females, respectively; 1871 ± 130 mosM/kg H₂O, $n = 11$ and 1873 ± 316 mosM/kg H₂O, $n = 7$ for wild type males and females, respectively). Rather, the decreased MUPs content in the urine of *Cry*^{-/-} males is associated with the down-regulation of the *Mup1* gene expression in their liver (Fig. 3D). Thus, both body growth and MUPs accumulation show impaired sex dimorphism in *Cry*^{-/-} mice, suggesting that altered GH profiles may be responsible for their feminized metabolic pattern.

⁴ I. M. Bur, A. M. Cohen-Solal, and X Bonnefont, unpublished observations.

Sex Dimorphism in the Liver Depends on Circadian Timekeeping

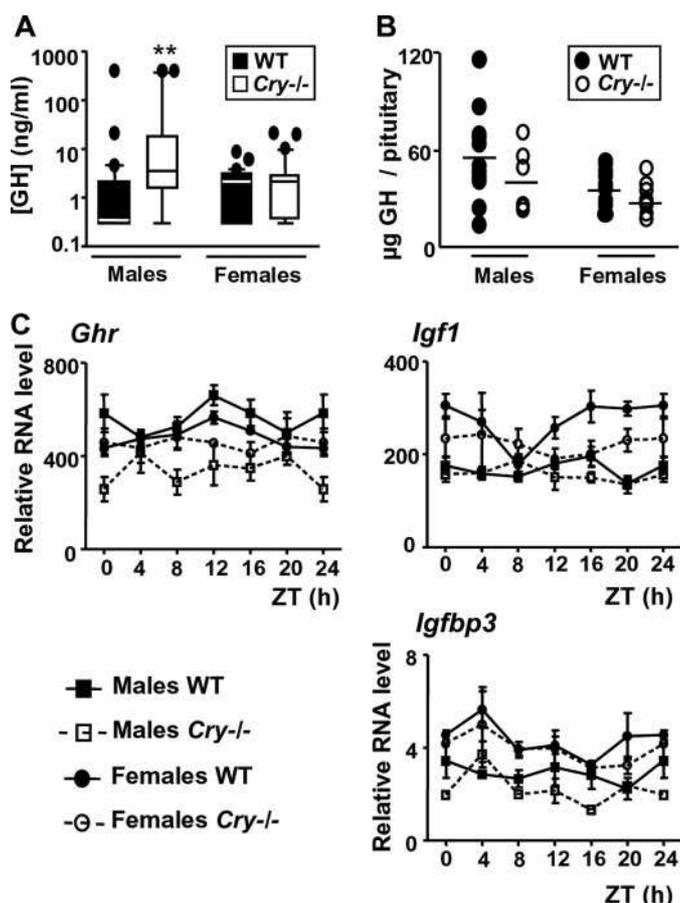


FIGURE 4. Circulating GH levels are altered in *Cry*^{-/-} males. *A*, box plots of circulating GH levels measured in trunk blood randomly collected between ZT2 and ZT8 from wild type (WT, solid boxes with median in white, $n = 30$ males and 30 females) and *Cry*^{-/-} mice (open boxes with median in black, $n = 20$ males and 30 females) of each sex. Individual values outside 90% of the population distributions are plotted as black circles. The median values of the four groups are significantly different ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test). **, $p < 0.01$ between wild type and *Cry*^{-/-} males (Dunn's multiple comparison test). *B*, the total amount of GH was quantified from whole pituitary glands of *Cry*^{-/-} (open circles) and control (solid circles) males and females. The inactivation of *Cry* genes has no effect on average GH levels ($p = 0.20$ and $p = 0.15$ for control versus *Cry*^{-/-} mice in males and females, respectively, Mann-Whitney *U* test). *C*, expression levels of genes involved in GH signaling were measured in the liver from mice used in Fig. 1. RNA levels are graphed as means \pm S.E., $n = 3-4$ for each series. The global statistical significance by two-way ANOVA is $p < 0.001$ and $p < 0.05$ between males of both genotypes for *Ghr* and *Igfbp3*, respectively. No significant alteration was found for *Igf1* in *Cry*^{-/-} males as compared with controls. *Ghr*, GH receptor.

***Cry*^{-/-} Males Exhibit Altered Circulating GH Levels**—The direct assessment of temporal GH patterns in the mouse, unlike in rat, is hampered by technical difficulties of repeated blood sampling in freely moving animals. To evaluate whether the inactivation of the *Cry* genes is associated with an altered GH secretion pattern, we collected trunk blood at random times from control and *Cry*^{-/-} males and females. As reported previously (29), control males and females show a similar distribution of their GH levels, except that maximal values are higher in males (Fig. 4A). Interestingly, 53% of the values obtained from male blood (16/30) were below 1 ng/ml, whereas this proportion falls to only 23% in females (7/30). It is likely that such a difference is the footprint of the long and short durations of GH troughs in between secretion peaks in

males and females, respectively, as described in the single study that reported direct measurements of GH pulsatility in the mouse (25). The *Cry* deletion did not significantly alter the distribution of GH values in females. In contrast, GH levels were significantly shifted higher in *Cry*^{-/-} males (Fig. 4A). Only 20% of random GH values were below 1 ng/ml (4/20), suggesting that GH trough duration is shorter than in control males. These data suggest that the ultradian GH profile is altered in *Cry*^{-/-} males with reduced non-secreting episodes.

Accordingly, we found that total pituitary GH contents from wild type males are scattered along a wide range of values (Fig. 4B), which possibly depicts the alternating course of GH surges and troughs, whereas the narrow pattern obtained with glands from *Cry*^{-/-} males resembles the distribution of values from females (Fig. 4B). However, although GH patterns are altered in *Cry*^{-/-} males, their pituitary gland remains able to secrete a high amount of GH when stimulated with the intravenous injection of 100 ng of GH-releasing hormone or synthetic GH-releasing hexapeptide GHRP6 (data not shown). Moreover, although we noticed a slight down-regulation of the GH receptor, *Ghr*, in the liver of *Cry*^{-/-} males, no important alteration were found in the somatotroph liver outputs, such as genes coding for the insulin-like growth factor *Igf1* and its binding protein *Igfbp3* (Fig. 4C).

Taken together, our data show that the *Cry*^{-/-} mutation alters the GH tempo. Interestingly, it is already known that the internal circadian clock gets less robust (34) and that the somatotroph axis dampens (35) during aging. To investigate whether these alterations may affect sex dimorphism in liver metabolism, we compared liver gene expression between young and old male mice. We found that aged wild type male mice have a feminized liver gene pattern (Fig. 5), as reported previously in rats (27). Although slight differences can be noted, the liver of young *Cry*^{-/-} and old wild type males are therefore submitted to similar changes as compared with young control animals (Figs. 1 and 5). Hence, we reasoned that circadian timekeeping may pace the GH pulsatility that is responsible for male-specific liver activity and body growth.

Mimicking GH Pulses Reverses the Feminized Phenotype of *Cry*^{-/-} Males—If our hypothesis is correct that altered GH profiles are responsible for the loss of sex dimorphism, it should be possible to reverse the hepatic feminization by reinstating GH pulses and interpulses in *Cry*^{-/-} males. Accordingly, we administered bovine GH (50 µg/mouse) at 12-h intervals during 1 week to *Cry*^{-/-} males, a protocol previously shown to masculinize hepatic gene expression in wild type female mice (23). This treatment restores typical male *Mup1* mRNA levels and reverses the feminized pattern of hepatic *Cyp2b9*, *Cyp2d9*, *Cyp4a12*, *Cyp7b1*, and *Elovl3* in *Cry*^{-/-} males to levels similar to those measured in untreated wild type males (Fig. 6). To exclude a spurious effect from high concentrations of exogenous GH, we forced the pituitary gland of *Cry*^{-/-} males to secrete endogenous GH in a pulsatile manner but without generating excess GH exposure. Because patterned infusions of somatostatin can elicit rebound bursts of GH (36), we repeatedly injected octreotide (50 ng/mouse every 12 h), a long lasting somatostatin agonist, to *Cry*^{-/-} males. This treatment also res-

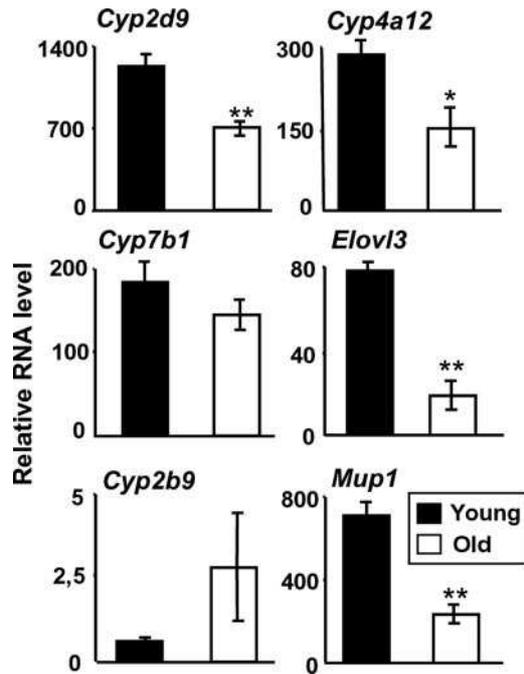


FIGURE 5. **Aged male mice have a feminized liver gene pattern.** Livers of 8-week-old (solid bars) and 2-year-old (open bars) C57BL/6 male mice were collected between ZT2 and ZT4. Sex-specific liver genes show a feminization of their expression level in aged males. Relative RNA levels are graphed as means \pm S.E., $n = 5$ animals in each condition. **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$, Mann-Whitney U test.

cues a male pattern of liver gene expression in the mutant mice (Fig. 6), and confirms that rhythmic activation of the GH axis, with regular and sustained low trough values of GH, is responsible for the reversal of the feminized phenotype of the $Cry^{-/-}$ male liver.

DISCUSSION

Circadian Timekeeping as a Regulator of Ultradian GH Release—Altogether, our data reveal *Cry1* and *Cry2* as genetic determinants of sexual dimorphism in liver metabolism. The presence of functional CRY products appears essential for tuning the ultradian GH pulsatility required for the male-specific liver activity. Similarly, previous studies reported that the circadian clock gene *Bmal1* is also necessary to maintain male-female differences in body growth (33) or that liver expression of *Elov13* follows a female-like profile in male homozygous *Clock/Clock* mutants (19). Moreover, male rats with lesioned SCN exhibit a feminized steroid metabolism (37), as we observed for $Cry^{-/-}$ mice. Last, the alteration of circadian timekeeping during aging (34) is concomitant with dampening of the GH pulsatility (35) and leads to the feminization of liver gene expression in rats (27) and mice (this study). Thus, although we cannot exclude a non-circadian role for *Cry* genes, we conclude that the feminized phenotype of $Cry^{-/-}$ males is at least partly due to the disruption of their circadian clock.

The SCN transiently synchronize the GH rhythm with the light-dark cycle, likely through somatostatinergic neurons (38, 39), and male rats with SCN lesions present alterations in the amplitude of ultradian GH pulses (39). Thus, the alteration of GH secretion in $Cry^{-/-}$ may result from impaired circadian

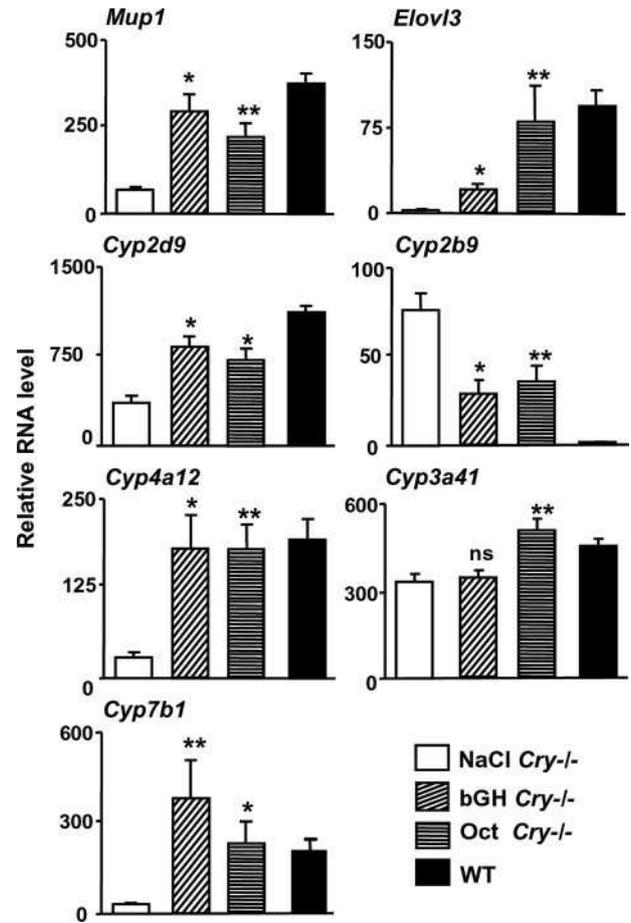


FIGURE 6. **Patterned GH pulses reverse the feminized phenotype of $Cry^{-/-}$ males.** Liver gene expression was assessed at ZT4 in $Cry^{-/-}$ males that received two subcutaneous injections a day, at ZT0 and ZT12 during 1 week, of saline ($n = 4$), 50 μ g of highly purified pituitary bovine GH (bGH, $n = 5$), or 50 ng of octreotide ($n = 5$), and untreated control males ($n = 5$). Both hormonal treatments restored a control-like expression pattern in the liver of $Cry^{-/-}$ males. **, $p < 0.01$ and *, $p < 0.05$ as compared with NaCl, Mann-Whitney U test. WT, wild type.

outputs from their SCN (40). Indeed, the SCN, equipped with receptors for gonadal hormones (15, 16), may indirectly tune the GH secretion profiles responsible for dimorphic liver metabolism.

Another hypothesis, not exclusive from the former one, is that the circadian clockwork within the pituitary gland may synchronize unitary ultradian activities of GH-secreting cells (41, 42) through long distance homotypic cell networks (43, 44). Although such a possibility remains to be investigated, it is worth noting that circadian timekeeping is known to interfere with other rhythms outside the 24-h range, such as ultradian courtship song in flies (45) and infradian estrous cycles in mice (46).

The GH secretion profile in $Cry^{-/-}$ males differs from that of control males, with fewer trough values. However, it remains distinct from the female GH pattern, which exhibits a lower mean level. Thus, $Cry^{-/-}$ males have a unique GH profile that leads to a female-like metabolic pattern. However, this feminization is not complete and underscores the complex regulation of sexually dimorphic liver genes, which mainly involves transduction through the signal transducer and activator of tran-

Sex Dimorphism in the Liver Depends on Circadian Timekeeping

scription 5b (STAT5b) and hepatic nuclear factor 4 α (HNF4 α) pathways (47–49). For example, the expression level of the female-predominant gene *Cyp3a41* is not altered in *Cry*^{-/-} mutants. Interestingly, several genes of the *Cyp3a* family, including *Cyp3a41*, were previously reported to be resilient to the inactivation of STAT5b (47) but not of HNF4 α (49). Our data may thus define a new paradigm to study the sexually dimorphic action of GH in the mammalian liver through both transduction cascades.

Interrelationship between Circadian Timekeeping, Sex Dimorphism, and Liver Metabolism—Finally, our data reveal that circadian timekeeping may control cell and body metabolism by pacing the secretion of pituitary GH, in addition to the well known direct regulation at the transcription level in liver cells (7, 8). Over the last decades, chronomedicine has been developed, assuming that a circadian control of sensitivity to drugs exists in humans as well as in rodents (7, 50, 51). Interestingly, a recent trial for time-modulated treatment of metastatic colorectal cancer revealed intriguing opposite outcomes for men and women patients (52). Further studies will be necessary to unveil whether our results could be extended to human beings and provide some mechanistic insights into how the circadian time, sex, and metabolism must interact and constitute an undividable troika to optimize personalized therapy.

Acknowledgments—We are indebted to A. F. Parlow (National Institutes of Health, NIDDK, National Hormone and Peptide Program, Torrance, CA) for providing us with bovine GH and reagents for radioimmunoassay. We thank C. Legerverend, F. Gachon, and A.-L. Mausset-Bonnefont for critical reading of the manuscript. D. Hadou, P. Makoundou, N. Oueslati, and S. Faibie are acknowledged for technical assistance.

REFERENCES

- Rinn, J. L., Rozowsky, J. S., Laurenzi, I. J., Petersen, P. H., Zou, K., Zhong, W., Gerstein, M., and Snyder, M. (2004) *Dev. Cell* **6**, 791–800
- Yang, X., Schadt, E. E., Wang, S., Wang, H., Arnold, A. P., Ingram-Drake, L., Drake, T. A., and Lusis, A. J. (2006) *Genome Res.* **16**, 995–1004
- Ahluwalia, A., Clodfelter, K. H., and Waxman, D. J. (2004) *Mol. Endocrinol.* **18**, 747–760
- Rinn, J. L., and Snyder, M. (2005) *Trends Genet.* **21**, 298–305
- Isensee, J., and Ruiz Noppinger, P. (2007) *Gend. Med.* **4**, Suppl. B, S75–S95
- Schwartz, J. B. (2003) *Clin. Pharmacokinet.* **42**, 107–121
- Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., Descombes, P., and Schibler, U. (2006) *Cell Metab.* **4**, 25–36
- 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. (2002) *Cell* **109**, 307–320
- Zhang, Y. K., Yeager, R. L., and Klaassen, C. D. (2008) *Drug Metab. Dispos.* **37**, 106–115
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J. S., and Schibler, U. (2007) *PLoS Biol.* **5**, e34
- Lamia, K. A., Storch, K. F., and Weitz, C. J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15172–15177
- Daan, S., Damassa, D., Pittendrigh, C. S., and Smith, E. R. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 3744–3747
- Davis, F. C., Darrow, J. M., and Menaker, M. (1983) *Am. J. Physiol.* **244**, R93–R105
- Roenneberg, T., Kuehnle, T., Pramstaller, P. P., Ricken, J., Havel, M., Guth, A., and Mewes, M. (2004) *Curr. Biol.* **14**, R1038–1039
- Karatsoreos, I. N., Wang, A., Sasanian, J., and Silver, R. (2007) *Endocrinology* **148**, 5487–5495
- Vida, B., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Coen, C. W., Liposits, Z., and Kallo, I. (2008) *J. Neuroendocrinol.* **20**, 1270–1277
- van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., and Yasui, A. (1999) *Nature* **398**, 627–630
- Reinerink, E. J., Doorn, L., Jansen, E. H., and Van Iersel, A. A. (1991) *J. Chromatogr.* **553**, 233–241
- Anzulovich, A., Mir, A., Brewer, M., Ferreyra, G., Vinson, C., and Baler, R. (2006) *J. Lipid Res.* **47**, 2690–2700
- Brolinson, A., Fourcade, S., Jakobsson, A., Pujol, A., and Jacobsson, A. (2008) *Endocrinology* **149**, 3158–3166
- Alvarez, J. D., Hansen, A., Ord, T., Bebas, P., Chappell, P. E., Giebultowicz, J. M., Williams, C., Moss, S., and Sehgal, A. (2008) *J. Biol. Rhythms* **23**, 26–36
- Legerverend, C., Mode, A., Wells, T., Robinson, I., and Gustafsson, J. A. (1992) *FASEB J.* **6**, 711–718
- Jarukamjorn, K., Sakuma, T., Jaruchotikamol, A., Ishino, Y., Oguro, M., and Nemoto, N. (2006) *Toxicology* **219**, 97–105
- Waxman, D. J., and O'Connor, C. (2006) *Mol. Endocrinol.* **20**, 2613–2629
- MacLeod, J. N., Pampori, N. A., and Shapiro, B. H. (1991) *J. Endocrinol.* **131**, 395–399
- Tannenbaum, G. S., and Martin, J. B. (1976) *Endocrinology* **98**, 562–570
- Dhir, R. N., and Shapiro, B. H. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15224–15228
- Clark, R. G., Jansson, J. O., Isaksson, O., and Robinson, I. C. (1985) *J. Endocrinol.* **104**, 53–61
- Low, M. J., Otero-Corchon, V., Parlow, A. F., Ramirez, J. L., Kumar, U., Patel, Y. C., and Rubinstein, M. (2001) *J. Clin. Investig.* **107**, 1571–1580
- Norstedt, G., and Palmiter, R. (1984) *Cell* **36**, 805–812
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., and Antoch, M. P. (2006) *Genes Dev.* **20**, 1868–1873
- Masaki, S., Todo, T., Nakano, Y., Okamura, H., and Nose, H. (2005) *J. Physiol. (Lond.)* **566**, 213–224
- Sun, Y., Yang, Z., Niu, Z., Wang, W., Peng, J., Li, Q., Ma, M. Y., and Zhao, Y. (2006) *J. Biomed. Sci.* **13**, 845–851
- Hastings, M. H., Reddy, A. B., and Maywood, E. S. (2003) *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 649–661
- Kuwahara, S., Sari, D. K., Tsukamoto, Y., Tanaka, S., and Sasaki, F. (2004) *Brain Res.* **998**, 164–173
- Clark, R. G., and Robinson, I. C. (1988) *Endocrinology* **122**, 2675–2682
- Gustafsson, J. A., Eneroth, P., Hokfelt, T., and Skett, P. (1978) *Endocrinology* **103**, 141–151
- Davies, J. S., Carter, D. A., and Wells, T. (2004) *Endocrinology* **145**, 2950–2958
- Willoughby, J. O., and Martin, J. B. (1978) *Brain Res.* **151**, 413–417
- Albus, H., Bonnefont, X., Chaves, I., Yasui, A., Doczy, J., van der Horst, G. T., and Meijer, J. H. (2002) *Curr. Biol.* **12**, 1130–1133
- Bonnefont, X., Fiekers, J., Creff, A., and Mollard, P. (2000) *Endocrinology* **141**, 868–875
- Bonnefont, X., and Mollard, P. (2003) *FEBS Lett.* **548**, 49–52
- Bonnefont, X., Lacampagne, A., Sanchez-Hormigo, A., Fino, E., Creff, A., Mathieu, M. N., Smallwood, S., Carmignac, D., Fontanaud, P., Travo, P., Alonso, G., Courtois-Coutry, N., Pincus, S. M., Robinson, I. C., and Mollard, P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16880–16885
- Fauquier, T., Guérineau, N. C., McKinney, R. A., Bauer, K., and Mollard, P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 8891–8896
- Kyriacou, C. P., and Hall, J. C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6729–6733
- Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H., and Takahashi, J. S. (2004) *Curr. Biol.* **14**, 1367–1373
- Clodfelter, K. H., Holloway, M. G., Hodor, P., Park, S. H., Ray, W. J., and Waxman, D. J. (2006) *Mol. Endocrinol.* **20**, 1333–1351
- Holloway, M. G., Laz, E. V., and Waxman, D. J. (2006) *Mol. Endocrinol.* **20**,

Sex Dimorphism in the Liver Depends on Circadian Timekeeping

- 647–660
49. Wiwi, C. A., Gupte, M., and Waxman, D. J. (2004) *Mol. Endocrinol.* **18**, 1975–1987
50. Gorbacheva, V. Y., Kondratov, R. V., Zhang, R., Cherukuri, S., Gudkov, A. V., Takahashi, J. S., and Antoch, M. P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3407–3412
51. Levi, F., and Schibler, U. (2007) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 593–628
52. Giacchetti, S., Bjarnason, G., Garufi, C., Genet, D., Iacobelli, S., Tampellini, M., Smaaland, R., Focan, C., Coudert, B., Humblet, Y., Canon, J. L., Adenis, A., Lo Re, G., Carvalho, C., Schueller, J., Anciaux, N., Lentz, M. A., Baron, B., Gorlia, T., and Levi, F. (2006) *J. Clin. Oncol.* **24**, 3562–3569

2) Cycles infradiens liés à la fonction de reproduction.

Problématique:

La fonction de reproduction, chez les femelles, repose sur différents **cycles infradiens** (Figure 32). Parmi ceux-ci, les cycles oestriens durent entre 4 et 5 jours, chez les souris. Ils dépendent des variations infradiennes des sécrétions hypophysaires (LH : Luteinizing Hormone et FSH : Follicule Stimulating Hormone) au cours des cycles (Figure 32). Une autre hormone hypophysaire, la prolactine, varie au cours des cycles de la reproduction et a une grande importance lors de la gestation et de la lactation.

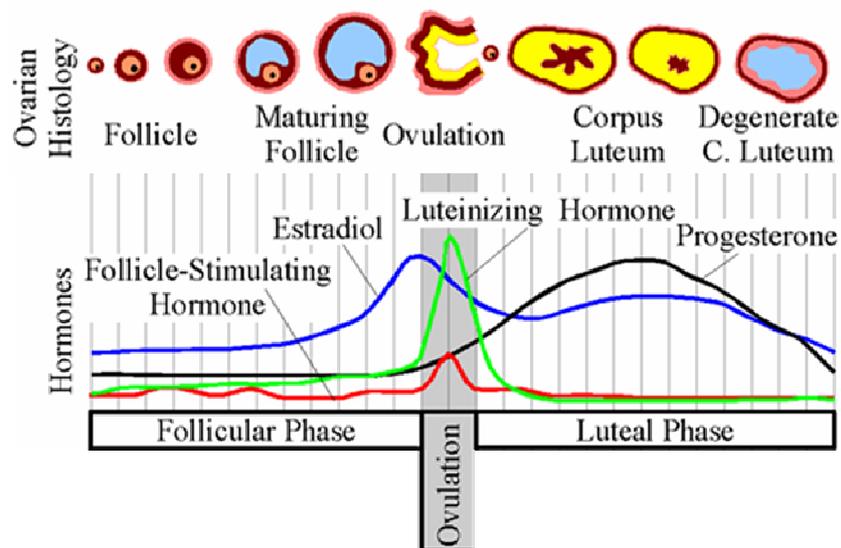


Figure 32: La fonction de reproduction repose sur différents cycles infradiens.

Plusieurs études ont déjà permis d'établir un lien entre ces cycles infradiens qui contrôlent la reproduction et l'horloge circadienne (pour revue (de la Iglesia and Schwartz, 2006)). Des expériences de lésion des Noyaux Suprachiasmatiques révèlent une altération des capacités reproductives, due à un blocage des cycles oestriens et à la perte du pic préovulatoire de LH (Brown-Grant and Raisman, 1977; Ronnekleiv and Kelly, 1988; Wiegand et al., 1980). De plus, il a récemment été montré que les femelles portant la mutation du gène horloge *Clock* (femelles *Clock/Clock*) ont des problèmes dans la fonction de reproduction (Miller et al., 2004). Les souris portant cette mutation ont des cycles ovariens irréguliers, et semblent avoir quelques difficultés pour déclencher le pic de LH préovulatoire.

De plus, lorsque ces souris sont gestantes, de nombreux troubles sont observés : fort taux d'avortement précoce, nombre important de souriceaux mort-nés, suggérant fortement une altération de la sécrétion de prolactine. Cette étude apporte de nombreuses informations, mais elle a été effectuée chez des souris portant une mutation du gène *Clock* et non pas une invalidation totale de l'horloge. Afin de connaître le rôle exact de l'horloge dans la fonction de reproduction, il est nécessaire d'utiliser des souris portant une invalidation de l'horloge. **C'est pourquoi, dans cette étude, notre attention a été focalisée sur la fonction de reproduction des souris femelles *Cry*^{-/-}, *Cry1*^{-/-} et *Cry2*^{-/-}, qui présentent différents degrés d'altération de l'horloge circadienne.**

Méthodes :

Plusieurs paramètres permettant de caractériser les capacités reproductives des souris *Cry1*^{-/-}, *Cry2*^{-/-}, et *Cry*^{-/-} ont été étudiés.

Des frottis vaginaux permettent de suivre les cycles ovariens, principaux marqueurs des cycles infradiens de la reproduction.

L'anatomie et le fonctionnement des ovaires ont ensuite été caractérisés. Des marquages de la Caspase3-clivé mettent en avant le processus d'apoptose et renseignent sur la maturation des follicules. Ils peuvent révéler certains défauts de la phase folliculaire.

Enfin, les capacités de reproduction des femelles ont été analysées. Les souris des différents génotypes ont été mises en accouplement et différents paramètres tels que la capacité de mener les souriceaux à l'âge adulte, le taux de mortalité, la croissance des souriceaux ont été étudiés.

Principaux résultats :

Altération des cycles oestriens chez les femelles *Cry*

Des frottis vaginaux ont été effectués tous les jours pendant 35 jours chez des femelles des différents génotypes : femelles sauvages (WT) utilisées comme témoins, femelles *Cry1*^{-/-} ou *Cry2*^{-/-}, mutantes pour un des deux gènes *Cry(1-2)* de l'horloge moléculaire et enfin femelles *Cry1*^{-/-}*Cry2*^{-/-} (notées *Cry*^{-/-}) inactivées pour les 2 gènes *Cry(1-2)*.

Cette étude révèle que l'ensemble des souris inactivées, pour un ou deux des gènes *Cry(1-2)*, présente des irrégularités dans les cycles oestriens (Figure R2).

Ces résultats corroborent ceux précédemment obtenus chez les mutants *Clock* de l'horloge (Miller et al., 2004). Chez les mutants *Clock* comme chez les Souris *Cry*, on constate que plus l'horloge est altérée, plus les cycles oestriens sont irréguliers. En effet, les souris homozygotes *Clock/Clock* ont des irrégularités plus fortes que les souris hétérozygotes *Clock/+* ou sauvages (Miller et al., 2004). De même chez les souris *Cry*, l'altération des cycles oestriens est plus forte chez les femelles *Cry-/-*, qui présentent une altération des deux gènes *Cry1* et *Cry2*, que chez les femelles *Cry1-/-* ou *Cry2-/-*. Il existe aussi une différence dans le degré d'altération des cycles entre les femelles *Cry1-/-* et les femelles *Cry2-/-* (Figure R2). Celle-ci pourrait reposer sur le fait que *Cry1* a un rôle prédominant, par rapport à *Cry2*, dans le mécanisme moléculaire de l'horloge à l'échelle cellulaire (Liu et al., 2007). Cette étude réalisée chez des souris *Knock-out*, ainsi que celle publiée sur les mutantes *Clock* montrent que l'horloge circadienne est impliquée dans les cycles infradiens oestriens mis en jeu dans la reproduction.

Apoptose précoce chez les femelles Cry-/-

Nous avons observé, par des marquages immunofluorescents dans les ovaires, qu'il existe une apoptose intense chez les femelles *Cry-/-* par rapport aux souris sauvages (WT) (Figure R3A). Le processus d'apoptose est un processus normal qui permet la sélection des quelques follicules qui arriveront à maturation. Ce phénomène est généralement présent dans des follicules arrivés à un stade avancé de la maturation et il est engendré par la baisse de la sensibilité de ces follicules à la FSH. Chez les femelles *Cry-/-*, ce processus est fortement présent dans les follicules en début de maturation (follicules pré-antraux) (Figure R3A). Ceci suggère qu'il y aurait une altération de la sensibilité et/ ou de la signalisation induite par la FSH chez les femelles *Cry-/-*.

L'expression du gène codant pour le récepteur de la FSH (*R FSH*) dans les ovaires de souris WT et de souris *Cry-/-* a donc été analysée (Figure R3B). Cette étude relève une forte diminution de l'expression du gène. Ceci pourrait être à l'origine d'une mauvaise sensibilité des follicules à la FSH. La FSH permet aussi aux follicules, en cours de maturation, d'exprimer le gène de l'*Aromatase* qui code pour une enzyme impliquée dans la production d'oestrogènes. Chez les femelles *Cry-/-*, l'expression de ce gène est fortement abaissée en

comparaison avec son niveau chez les femelles WT (Figure R3B). L'ensemble de ces résultats indique que l'altération de l'horloge circadienne peut entraîner des défauts de sécrétion et/ou de signalisation des hormones gonadotropes qui peuvent être responsables des irrégularités observées dans les cycles oestriens de ces souris.

Baisse des performances de reproduction des femelles Cry^{-/-}

Les croisements réalisés à l'animalerie pour le maintien de la lignée des souris ont, depuis longtemps, montré que les femelles *Cry^{-/-}* présentent d'importants troubles de la reproduction. Nous avons donc étudié, de manière plus détaillée, les performances des femelles *Cry^{-/-}* dans la reproduction. Ainsi, nous nous sommes intéressés à différents paramètres permettant de quantifier les défauts.

Tout d'abord, nous avons observé que le pourcentage de femelles parvenant à être gestantes est diminué lorsque l'horloge est altérée (Figure R4). De plus, le nombre moyen de souriceaux obtenus dans chaque portée est lui aussi diminué lorsque l'horloge est plus fortement altérée (Figure R4). Ainsi, les souris *Cry^{-/-}* ont en moyenne 5 petits par portée contre une moyenne de 7.6 chez des femelles sauvages de la même lignée. Il semble donc que, comme chez les souris *Clock/Clock*, l'altération de l'horloge circadienne entraîne certaines modifications lors de la gestation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à différents paramètres reflétant l'action de la prolactine lors de la lactation. Ainsi, dès la naissance, les souriceaux issus de différentes mères ont été pesés durant 10 jours (de P0 à P10) (Figure R5). On constate que les souriceaux, issus des mères *Cry^{-/-}*, grossissent moins bien que les autres souriceaux (Figure R5A). Ce défaut n'est vraisemblablement pas dû au génotype des souriceaux, puisque les souris *Cry1^{+/-}Cry2^{+/-}* grossissent normalement (Bur et al., 2009). Cette altération de la croissance pourrait être due à un problème de nourrissage et d'allaitement chez les femelles *Cry^{-/-}* qui pourrait être relié à une altération dans la sécrétion de prolactine.

De plus, le pourcentage de souriceaux qui survivent dans les 10 jours après la mise bas est de 75% chez les mères *Cry^{-/-}* (75%), contre 100% chez les autres mères (Figure R5C).

Enfin, la prise de poids des différentes mères, lors de la lactation, est également plus faible chez les femelles *Cry*^{-/-} (Figure R5B), suggérant, en partie, un défaut dans le développement des glandes mammaires.

L'ensemble de cette étude chez les souris *Cry* suggère que l'horloge circadienne participe au contrôle de la sécrétion de prolactine, comme cela a déjà été proposé chez les mutants *Clock*.

Conclusion :

Cette étude confirme l'existence de liens entre l'horloge circadienne et les cycles infradiens de la reproduction. L'altération de l'horloge entraîne l'altération des cycles oestriens (chez les souris *Cry* et souris *Clock/Clock*), l'altération de la sécrétion infradienne de LH, responsable de l'ovulation (mutants *Clock*), et peut-être même celle de la FSH, responsable de la maturation des follicules (souris *Cry*^{-/-}). De plus, les résultats obtenus lors de cette étude mettent en avant un possible lien entre l'horloge circadienne et l'axe lactotrope.

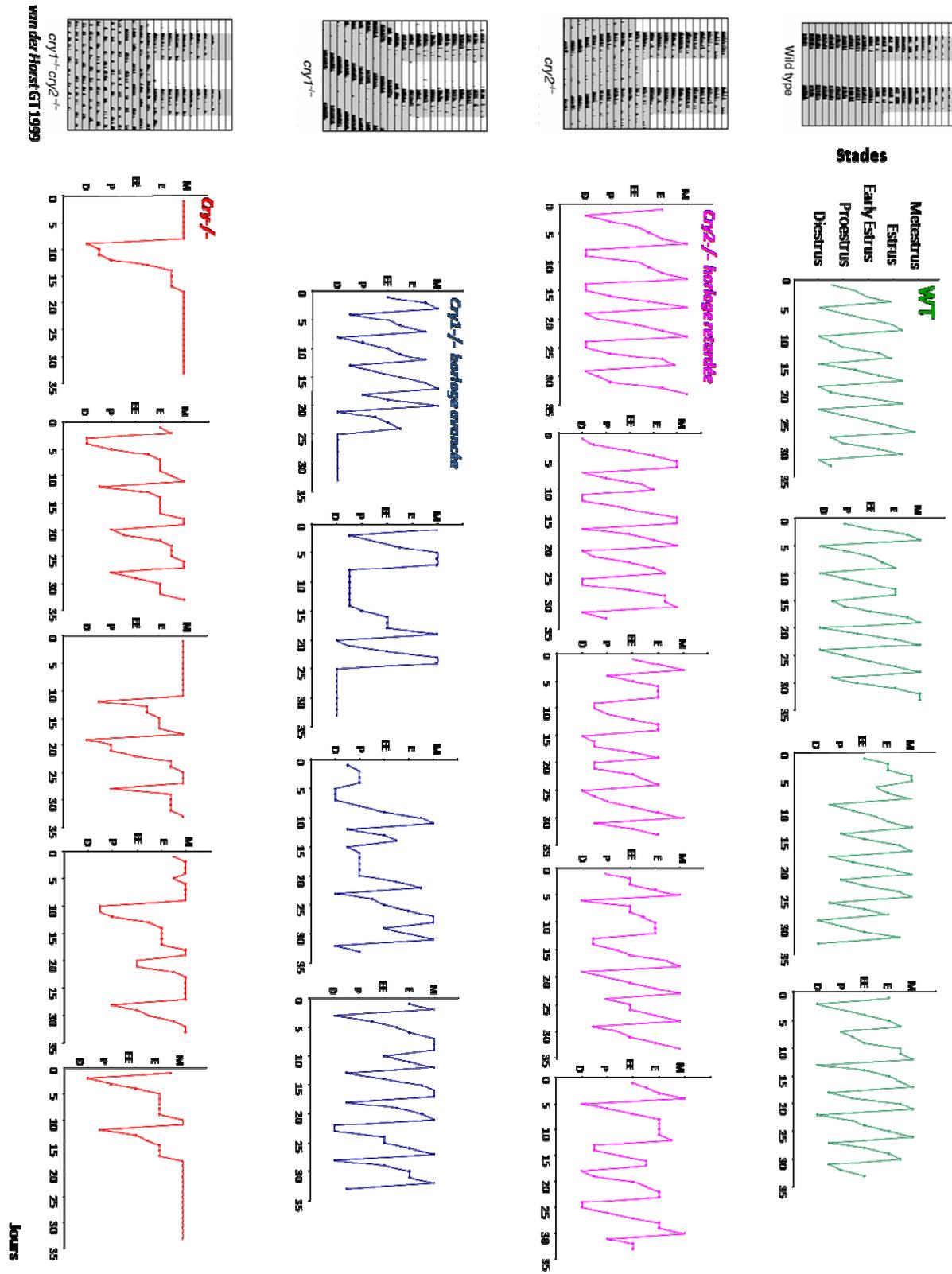


Figure R2 : Altération de l'horloge circadienne et irrégularité des cycles oestriens de la reproduction.
 Des frottis vaginaux ont été réalisés sur des souris de différents génotypes (WT : sauvages, *Cry1*^{-/-}, *Cry2*^{-/-}, *Cry*^{-/-}) tous les jours pendant 35 jours. Plus l'horloge circadienne est altérée, plus les cycles ovariens sont irréguliers.

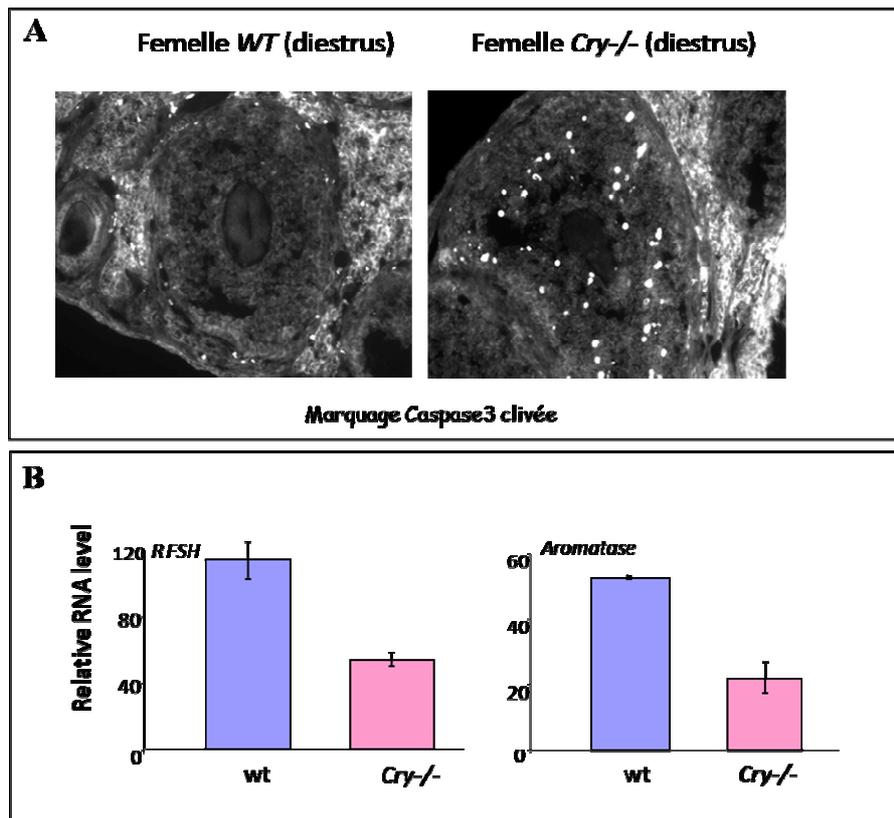


Figure R3 : Altération de la maturation folliculaire.

(A) Les souris *Cry*^{-/-} présentent une apoptose massive, identifiée par les points blancs lumineux, dans des follicules en cours de maturation (follicules pré-antraux).

(B) Les niveaux d'expression des gènes codant pour le Récepteur à la FSH (*RFSH*) et pour l'aromatase, une enzyme intervenant dans la synthèse des hormones gonadiques dans les ovaires, sont fortement diminués chez les femelles *Cry*^{-/-}.

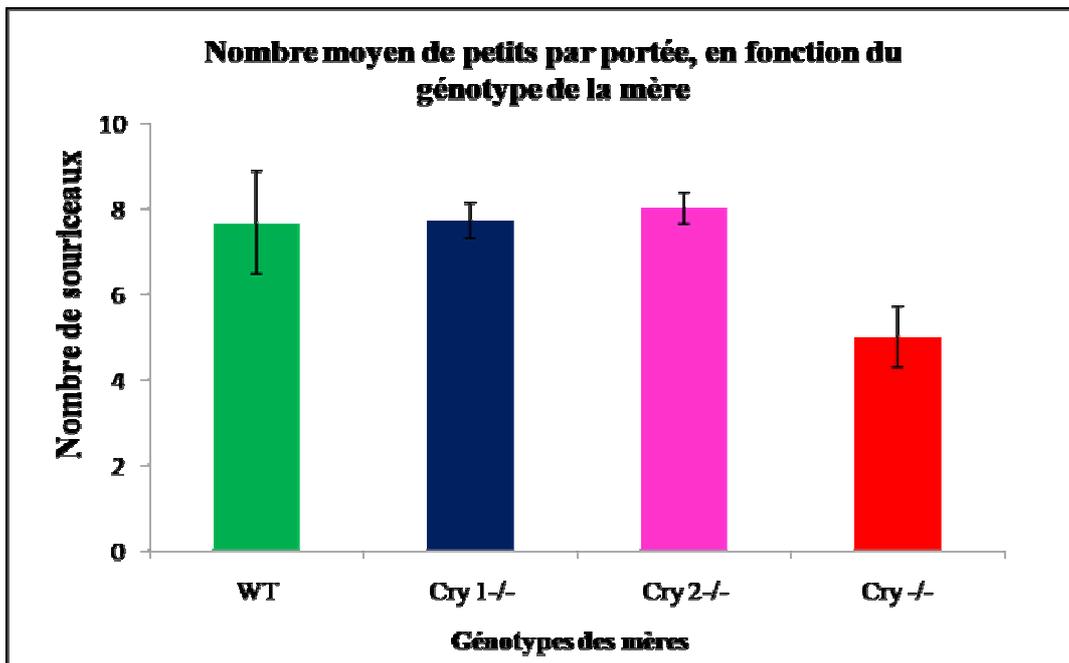
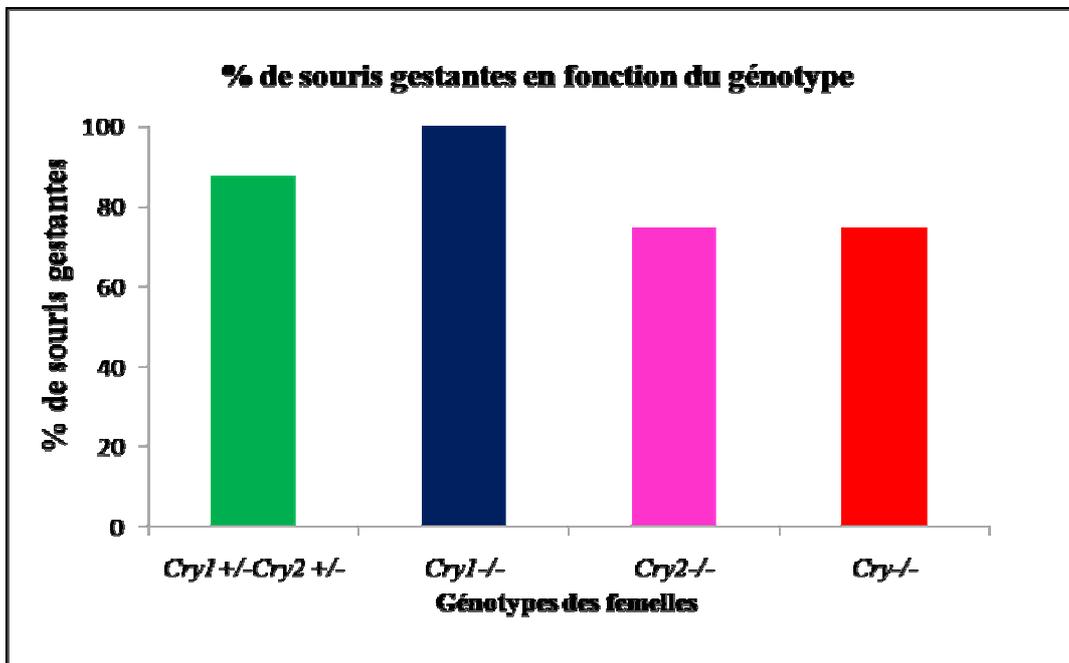


Figure R4 : Etude de paramètres reflétant indirectement la fonctionnalité de l'axe lactotrope, lors de la gestation.

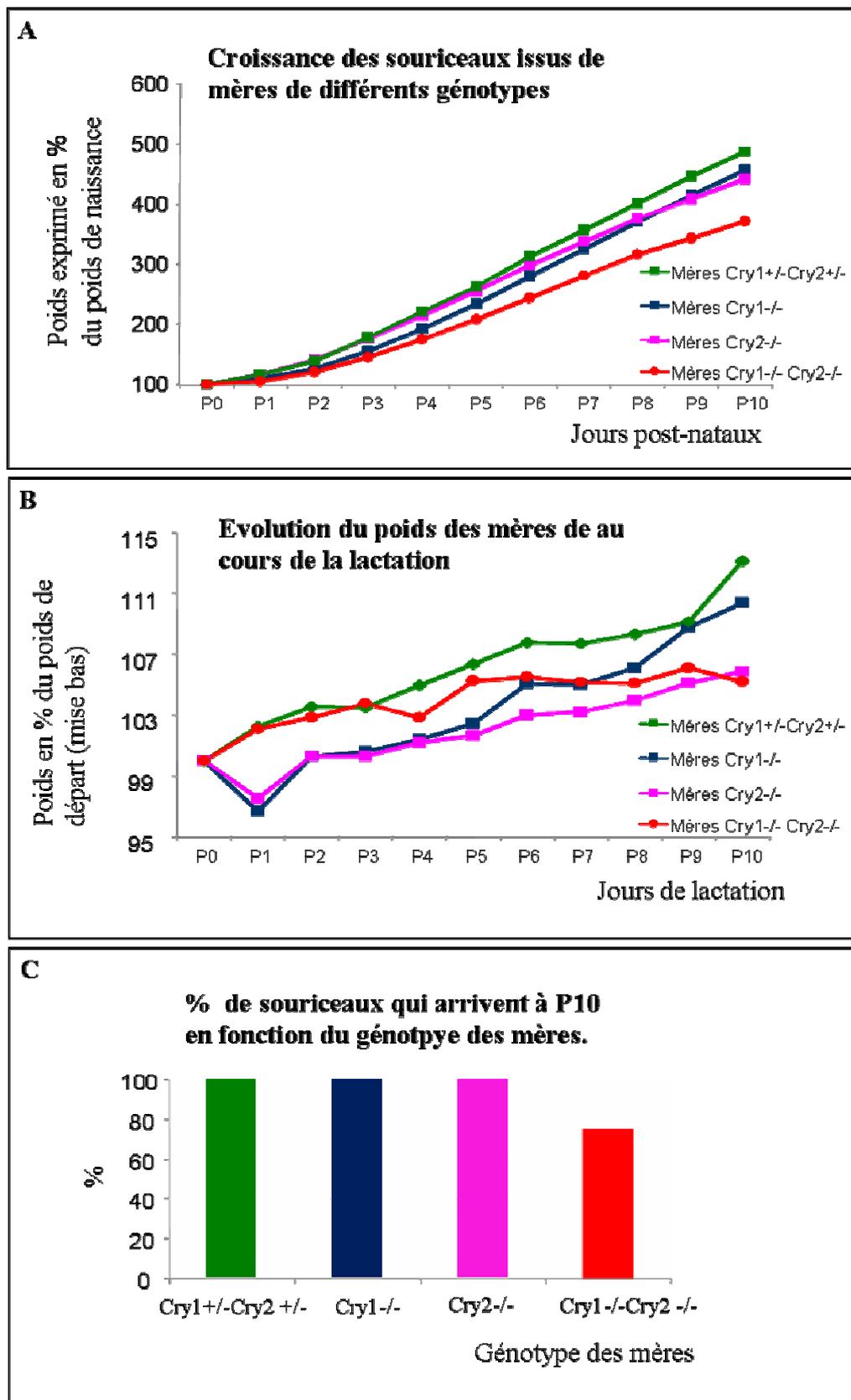


Figure R5 : Altération de la lactation chez les femelles *Cry1-/-Cry2-/-*.

(A). Le suivi du poids des souriceaux de la naissance jusqu'à P10 (10^{ème} jour après la naissance) montre que les souriceaux issus des mères *Cry1-/-Cry2-/-* grossissent moins bien.

(B). Les femelles *Cry1-/-Cry2-/-* sont celles qui prennent le moins de poids au cours de la lactation.

(C). Les femelles *Cry1-/-Cry2-/-* sont celles qui ont le plus de difficultés à mener leur petits à P10.

PARTIE II

CARACTERISATION DE L'HORLOGE HYPOPHYSAIRE.

1) Expression des gènes et protéines horloges dans l'hypophyse.

Dans la partie précédente, nous avons vu que l'horloge circadienne intervient dans différentes pulsatilités sécrétoires antéhypophysaires (GH, FSH, LH, PRL). Cependant, les mécanismes d'action de l'horloge dans ces pulsatilités demeurent encore inconnus. **Une hypothèse est que l'expression des gènes horloges dans l'antéhypophyse pourrait contribuer à son fonctionnement pulsatile.** Nous avons donc décidé de caractériser l'horloge antéhypophysaire.

Problématique:

L'antéhypophyse est sous-divisée en trois lobes : le lobe antérieur (*pars distalis*), le lobe tubéral (*pars tuberalis*), et le lobe intermédiaire (*pars intermedia*). Chez de nombreuses espèces saisonnières, la forte expression des récepteurs de la mélatonine et leur régulation, dans la *pars tuberalis*, ont fait de celle-ci une structure hautement impliquée dans la régulation des fonctions saisonnières. C'est pourquoi, la *pars tuberalis* a fait l'objet d'un grand nombre d'études, et l'expression des gènes horloges dans ce lobe antéhypophysaire est relativement bien connue (Sun et al., 1997; von Gall et al., 2002). Ainsi, dans ce lobe, la mélatonine contrôle l'expression du gène *Per1* chez les souris WT qui est inexistante chez les souris déficientes en mélatonine (Sun et al., 1997) comme chez les souris *Mt1R*^{-/-} qui n'expriment plus le récepteur de la mélatonine (von Gall et al., 2002). Cependant, les études concernant l'horloge dans la *pars distalis* (ou lobe antérieur) qui sécrète l'ensemble des hormones évoquées précédemment, sont beaucoup moins nombreuses. Une étude réalisée chez des rats montre, *in-situ*, que certains gènes horloges sont exprimés dans ce lobe. Cependant, cette étude a été effectuée à un seul moment dans la journée et ne permet pas de voir si cette expression est cyclique (Shieh, 2003).

D'autres études réalisées, *ex-vivo*, ont mis en évidence le fonctionnement cyclique de l'horloge moléculaire au sein de fragments de glandes en culture, et ce, grâce au suivi de l'expression de formes transgéniques de gènes ou protéines horloges étiquetées avec la luciférase comme système rapporteur bioluminescent (Abe et al., 2002; Yoo et al., 2004).

L'ensemble des études réalisées n'a pas permis de caractériser, *in-situ*, la présence de l'horloge native dans le lobe antérieur de l'antéhypophyse. C'est pourquoi, nous nous sommes

intéressés, ici, à l'expression des gènes et protéines horloges, *in-situ*, dans le lobe antéhypophysaire.

Méthodes :

Des expériences de PCR-quantitative ont été réalisées pour mesurer l'expression des gènes horloges principaux dans l'hypophyse. Des hypophyses entières de souris de la lignée C57Bl6 qui ne sécrètent pas de mélatonine (Goto et al., 1989) ont été prélevées, toutes les 4 heures, pendant 24 heures. L'anté et la neurohypophyse n'ont pas été séparées pour cette étude, ce qui permet une préparation rapide des échantillons, d'autant que les gènes horloges ne sont pas exprimés dans les terminaisons nerveuses de la neurohypophyse (Shieh, 2003). Le foie a également été étudié et utilisé comme tissu périphérique de référence.

Par la suite, des expériences d'immunofluorescence avec un anticorps anti-PER1 nous ont permis de caractériser les acteurs de l'horloge moléculaire à l'échelle cellulaire dans l'hypophyse.

Toutes les techniques expérimentales sont décrites dans la partie Matériels et méthodes.

Principaux résultats :

Expression cyclique des gènes horloges dans l'antéhypophyse.

D'une part, la quantification des principaux gènes horloges révèle que ceux-ci sont exprimés avec un rythme journalier dans l'hypophyse (Figure R6). Ces résultats nous permettent de confirmer la présence de l'horloge moléculaire, *in-situ*, dans l'hypophyse. D'autre part, les profils obtenus montrent que le gène *Clock* présente un profil peu rythmique dans l'hypophyse, contrairement à *Npas2* (Figure R6). Ce résultat suggère que la composante positive de l'horloge moléculaire hypophysaire pourrait plutôt reposer sur le dimère BMAL1/NPAS2. Il semble donc que l'horloge hypophysaire ait un fonctionnement un peu différent des horloges périphériques. Cependant, la comparaison des rythmes d'expression des gènes horloges dans ce lobe avec ceux du foie, utilisé comme tissu périphérique de référence, montre que l'horloge des deux tissus présente le même rythme et la même phase (Figure R7).

L'horloge hypophysaire, tout comme l'horloge hépatique, est donc décalée de 4 heures par rapport à l'horloge centrale des NSC (Damiola et al., 2000).

De plus, ces travaux ayant été réalisés chez des souris ne sécrétant pas de mélatonine, les résultats obtenus nous permettent de conclure que, contrairement à la *pars tuberalis*, l'expression des gènes horloges dans la *pars distalis* ne dépend pas de la sécrétion de mélatonine.

Etude de l'horloge avec une résolution cellulaire

Le parenchyme de l'antéhypophyse est constitué de 6 types cellulaires endocrines différents, responsables de sécrétions hormonales rythmiques, ayant différentes périodes. Ainsi, de cette hétérogénéité émergent plusieurs questions : toutes les cellules endocrines de l'antéhypophyse expriment-elles l'horloge moléculaire ? Existe-il un lien entre la présence de l'horloge à l'échelle cellulaire et le fonctionnement rythmique des cellules endocrines ?

Pour répondre à ces questions, nous avons étudié l'expression de la protéine PER1 de l'horloge, au cours de 24 heures, sur des coupes d'hypophyses. Cette étude nous a permis d'observer que la protéine PER1 est exprimée avec un rythme journalier dans les 6 types cellulaires endocrines de l'antéhypophyse (Figure R8/9). De plus, PER1 présente la même phase d'expression dans toutes les cellules. Cette synchronisation peut expliquer la robustesse du rythme observé, *ex-vivo*, avec le système *Per1-luciférase* (Abe et al., 2002). Aussi, cette synchronisation suggère-t-elle que l'horloge est dissociée du rythme sécrétoire dans l'antéhypophyse, à l'éventuelle exception des cellules ACTH qui ont une forte rythmicité sécrétoire circadienne. A ce propos, lors de l'analyse des résultats, nous avons observé que le marquage de PER1 dans les cellules ACTH est beaucoup plus intense que dans les autres types cellulaires (Figure R8). Il pourrait donc y avoir un rôle particulier de l'horloge dans ce type cellulaire.

Conclusion :

D'une part, cette étude nous a permis de montrer, *in situ*, que les gènes horloges sont exprimés dans l'antéhypophyse. D'autre part, nous avons vu que l'horloge antéhypophysaire a un fonctionnement rythmique plus proche des horloges périphériques que de l'horloge centrale des NSC. Enfin, l'étude à l'échelle cellulaire nous a permis de montrer que les six types cellulaires endocrines de l'antéhypophyse expriment l'horloge moléculaire. Cependant, il reste à établir un lien entre la présence de l'horloge et le fonctionnement rythmique des cellules endocrines.

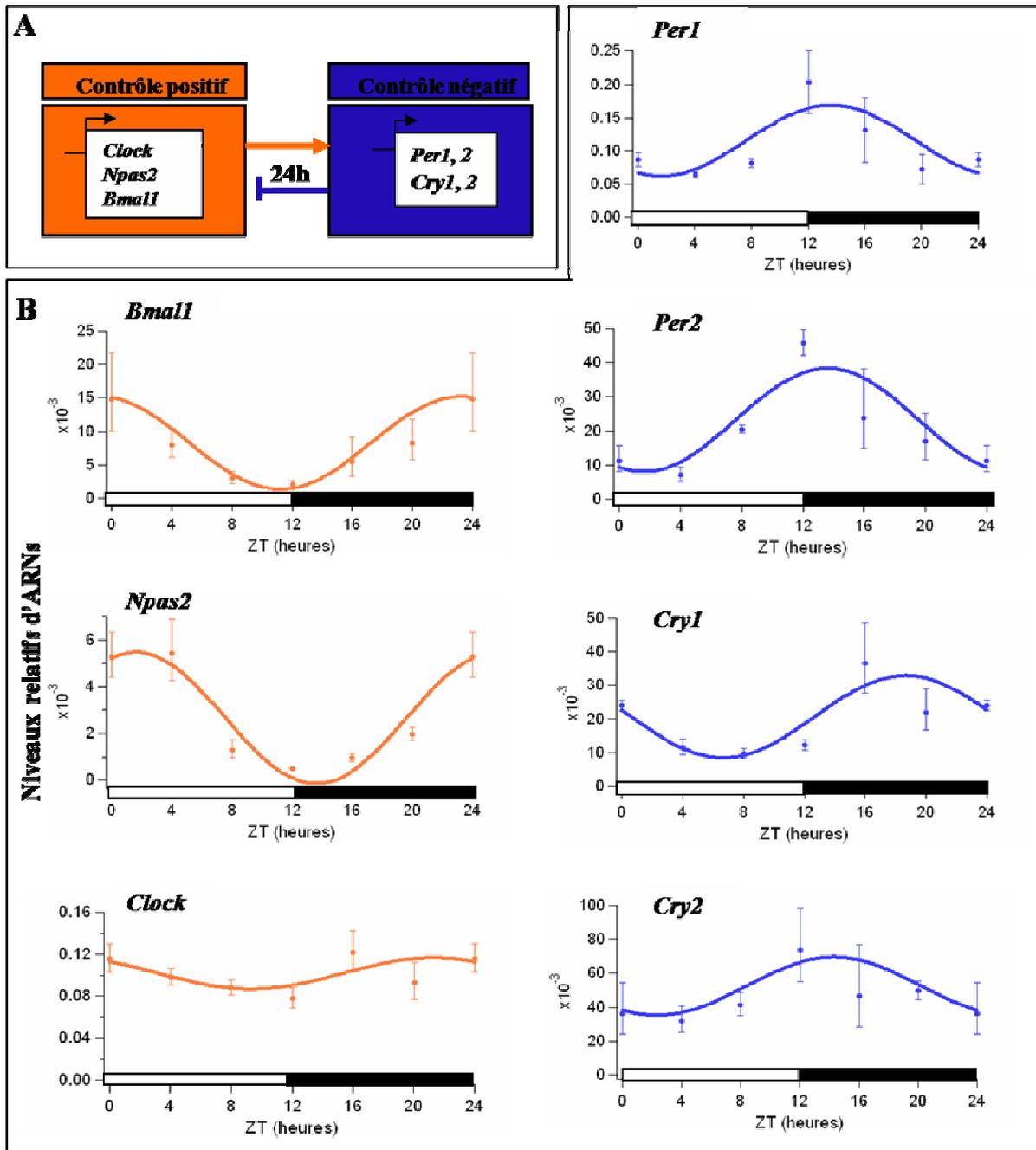


Figure R6 : Expression des principaux gènes horloges, in-vivo, dans l'hypophyse.

(A) Schéma de rappel de la principale boucle d'autocontrôle qui compose l'horloge moléculaire, comportant une composante positive et une composante négative.

(B) Les principaux gènes de la composante positive (en orange) sont exprimés avec une rythmicité circadienne dans l'hypophyse entière. Il en est de même pour les gènes de la composante négative (en bleu).

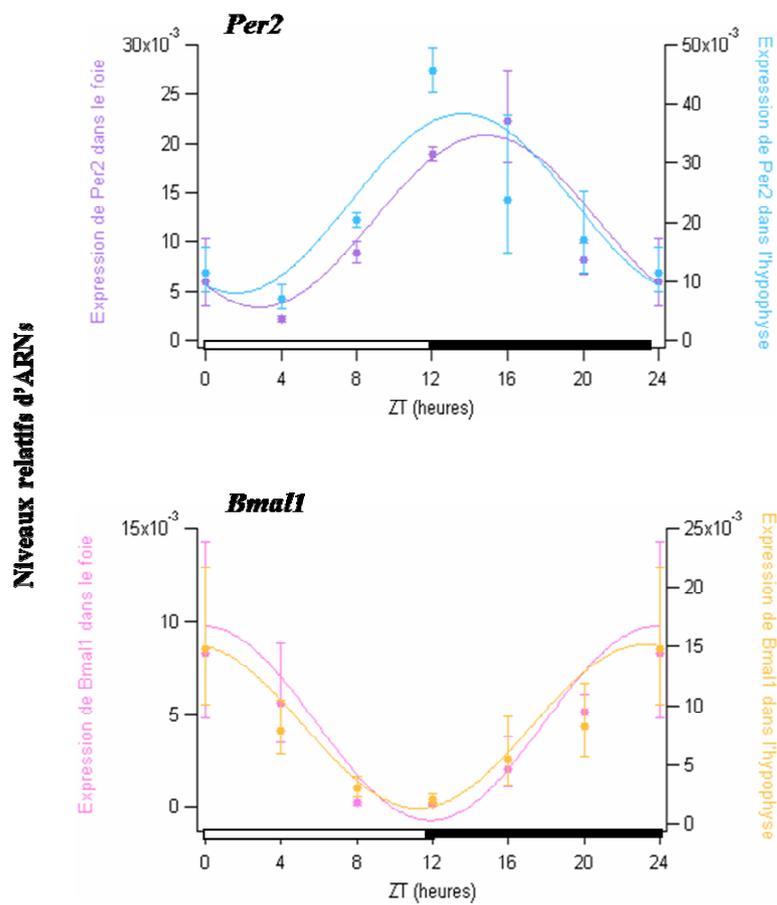


Figure R7 : Le rythme d'expression des gènes horloges a la même phase dans le foie et l'hypophyse. Comparaison des profils d'expression de *Per2* et *Bmal1*, deux gènes horloges appartenant à la composante négative et positive de l'horloge moléculaire, dans le foie (en bleu pour *Per2* et en rose pour *Bmal1*) et dans l'hypophyse (en violet pour *Per2* et en jaune pour *Bmal1*).

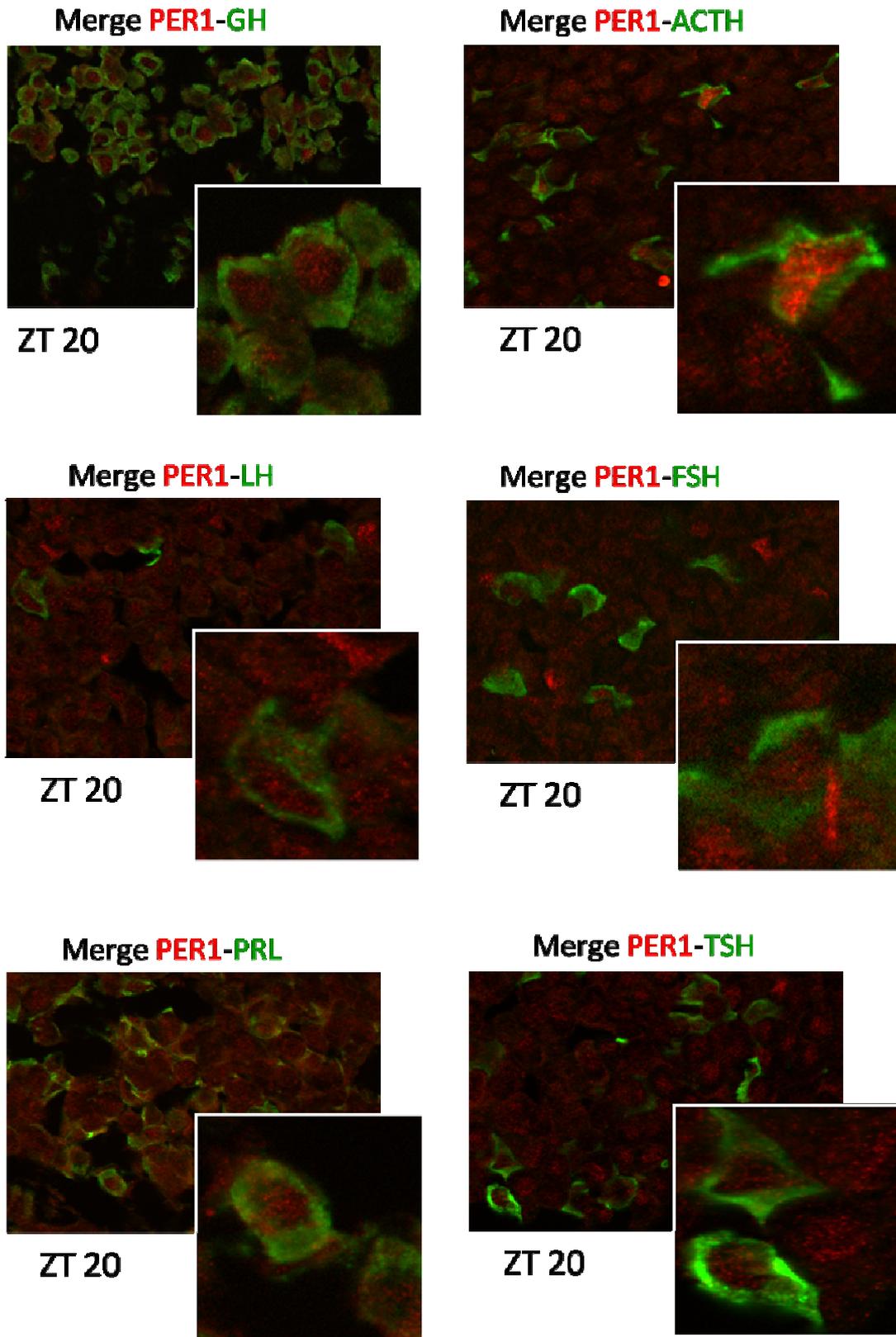


Figure R8 : Expression de PER1 dans les 6 types cellulaires endocrines de l'hypophyse.

Immunofluorescence utilisant un anticorps anti-PER1(en rouge) et un anticorps dirigé contre l'hormone spécifique des différents types cellulaires endocrines de l'antéhypophyse (en vert), réalisée à ZT20, au moment du pic d'expression PER1. On note que PER1 est exprimée dans tous les types cellulaires de l'antéhypophyse, mais que l'expression est plus intense dans les cellules ACTH.

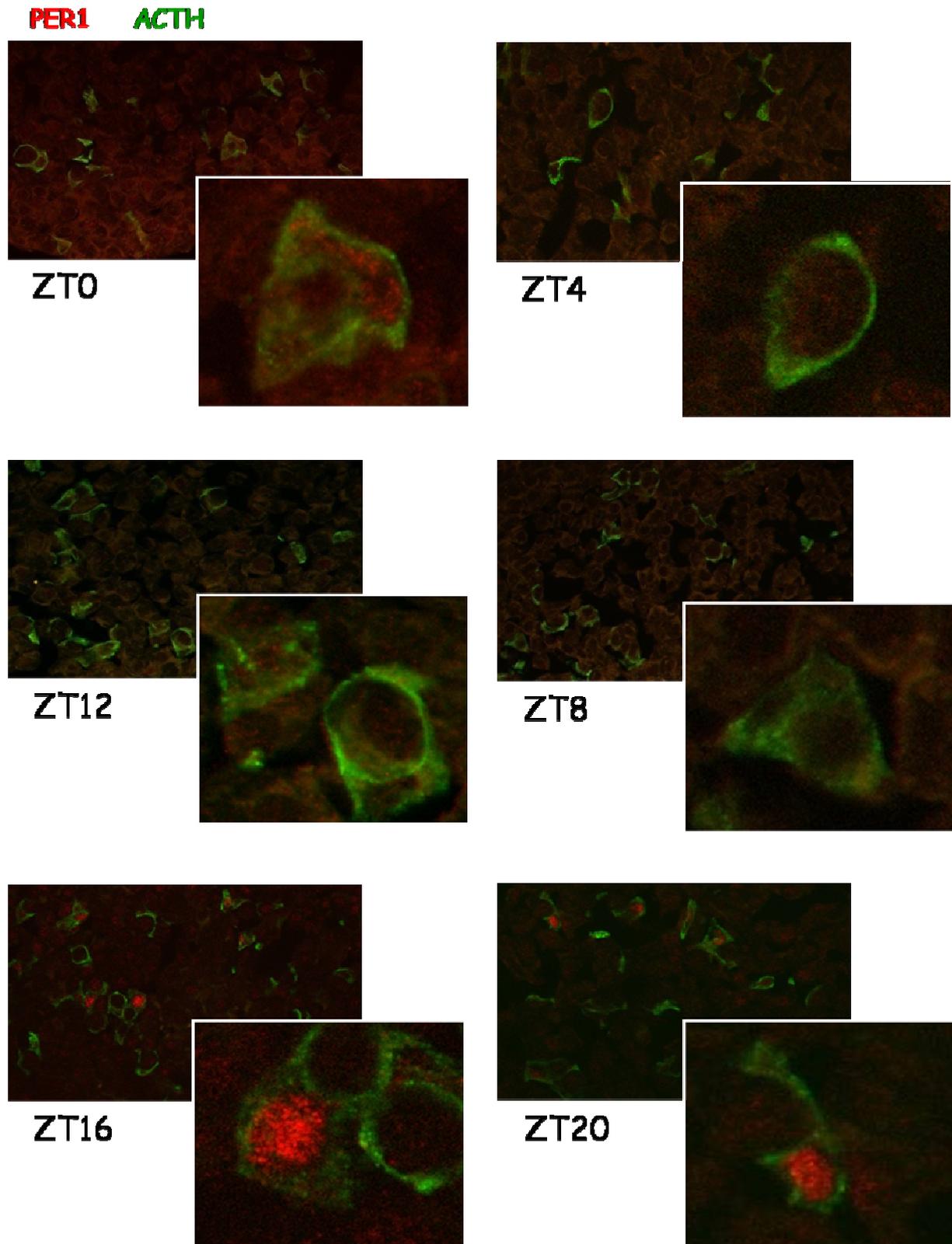


Figure R9 : Expression de PER1 au cours du cycle circadien dans les cellules ACTH

Immunofluorescence utilisant un anticorps anti-PER1 (en rouge) et un anticorps anti-ACTH (en vert), au cours de 24 heures. PER1 présente une forte expression circadienne dans les ACTH, avec une expression maximale entre ZT 16 et ZT20.

2) L'hypophyse une horloge complexe au cœur du système circadien.

Problématique :

Une étude réalisée chez des hamsters, animaux saisonniers, montre que l'horloge centrale et les horloges périphériques sont entraînées par des variations de la photopériode (Carr et al., 2003). Cependant, cette étude montre aussi que les horloges périphériques ne sont pas entraînées de la même manière que l'horloge centrale des NSC. Ces résultats suggèrent que, chez les hamsters, les horloges périphériques peuvent être sensibles à la photopériode. Chez les souris de la lignée C57Bl6, qui ne sont pas des animaux saisonniers et qui ne produisent pas de mélatonine (Goto et al., 1989), nous nous sommes demandé si les variations de photopériodes entraînent l'expression des gènes horloges dans différents tissus périphériques. Nous avons étudié deux tissus différents : l'hypophyse et le foie utilisé comme références.

Méthodes :

Le rythme d'expression de deux gènes *Per2* et *Bmal1* a été étudié dans le foie, l'hypophyse et les poumons d'animaux soumis à différentes conditions :
Tout d'abord, les animaux ont été soumis à des variations de la photopériode. Les résultats obtenus nous ont ensuite conduits à nous intéresser aux effets des changements de la disponibilité alimentaire. Ainsi, l'expression des gènes horloges a été comparée dans différents tissus périphériques, issus de différents lots d'animaux : les animaux contrôles ont accès à la nourriture pendant les 12 heures de nuit (NRF : Nighttime Restricted Feeding) et les autres n'ont pu manger que pendant les 12 heures de jour (DRF : Daytime Restricted Feeding). Enfin, un lot d'animaux a été surrénalectomisé. Parmi ceux-ci, certains ont reçu une alimentation en NRF et d'autres ont été soumis à NRF.

Tous les protocoles sont décrits dans la partie Matériels et méthodes.

Principaux résultats :

Effet des variations de photopériode sur le rythme des horloges périphériques

Dans un premier temps, nous avons étudié le rythme d'expression des gènes *Per2* et *Bmal1* dans le foie et l'hypophyse d'animaux soumis à une photopériode longue (16L : 8D), courte (8L : 16D) ou classique (12L : 12D). D'une part, nous avons constaté que, dans les trois conditions de photopériode testées, l'horloge du foie se synchronise, systématiquement, avec la transition jour-nuit (Figure R10A). Etant donné que le foie est un organe important dans le système digestif, et que l'expression des gènes horloges dans le foie est entraînée par la nourriture (Damiola et al., 2000), il semble alors que la synchronisation du foie avec la transition jour-nuit permette à l'horloge hépatique d'être en phase avec le début de la phase d'alimentation.

D'autre part, les résultats obtenus sur l'hypophyse montrent, de façon surprenante, que les variations de photopériode entraînent une forte diminution de l'amplitude des rythmes de *Per2* et *Bmal1* par rapport aux rythmes observés dans les conditions initiales (12L : 12D). La baisse d'amplitude observée dans l'hypophyse, lors des variations de photopériode, soulève plusieurs questions : lors des changements de la photopériode, l'horloge hypophysaire fait-elle face à un conflit dans l'intégration des signaux qui l'entraînent ? L'hypophyse pourrait-elle être constituée de deux oscillateurs E (Evening) et M (Morning), comme ceux potentiellement présents dans les NSC (Jagota et al., 2000), qui seraient entraînés respectivement par la nourriture et par la lumière ? Afin de dissocier l'oscillateur entraîné par la lumière de celui entraîné par la nourriture, nous nous sommes intéressés à la régulation de l'horloge hypophysaire lors de changements de la disponibilité alimentaire.

Effet de changement de la disponibilité alimentaire sur l'horloge hypophysaire

Les effets des changements de la disponibilité alimentaire (DRF ou NRF) ont été étudiés dans deux tissus périphériques contrôles : le foie et les poumons ainsi que dans l'hypophyse. Dans le foie, nous avons observé, comme précédemment, que l'horloge hépatique suit le rythme alimentaire (Figure 11): le rythme d'expression des gènes *Per2* et *Bmal1* est inversé chez les animaux en DRF.

Dans les poumons, nous avons constaté que l'horloge conserve le même fonctionnement chez les animaux en NRF et en DRF (Figure 11). La nourriture n'a donc aucun effet sur l'horloge pulmonaire. Et, il semble que l'horloge des poumons soit plutôt synchronisée avec le cycle lumineux. Ainsi, ce résultat sur les poumons permet de mieux comprendre les résultats, obtenus par le groupe de Menaker (Stokkan et al., 2001). Ces résultats complexes suggéraient que l'horloge pulmonaire était entraînée par la lumière.

Enfin, dans l'hypophyse, nous avons observé que l'amplitude des rythmes d'expression de *Per2* et *Bmal1* est fortement diminuée et tend même parfois à s'annuler chez les animaux placés en DRF (Figure 11).

Afin de mieux comprendre la régulation de l'horloge hypophysaire, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine PER1 de l'horloge dans les différents types de cellules endocrines antéhypophysaires, lors de changement de la disponibilité alimentaire. Cette étude préliminaire suggère que le rythme d'expression de PER1 dans les cellules ACTH et GH de l'hypophyse est aussi atténué (Figure R12). Il semble que la baisse d'amplitude observée corresponde à une baisse générale de l'amplitude dans tous les types cellulaires, plutôt qu'à la résultante de deux oscillateurs entraînés par deux signaux différents.

Ces résultats, dans leur ensemble, suggèrent qu'il existe au moins deux classes d'horloges périphériques. Certaines horloges périphériques pourraient être entraînées par l'alimentation, comme l'horloge hépatique. D'autres horloges pourraient suivre le rythme de la lumière, comme les poumons. Mais, les résultats obtenus dans l'hypophyse suggèrent l'existence d'une troisième classe d'horloge périphérique entraînée simultanément par divers signaux et soulève la question suivante : l'hypophyse pourrait-elle être un centre intégrateur des signaux d'entraînement du système circadien ?

Effet d'une surrénalectomie sur le rythme des horloges périphériques

Une étude réalisée sur l'horloge du foie a montré que, lors de restrictions temporelles de l'accès à l'alimentation, l'horloge hépatique s'inverse avec une certaine inertie qui est due au rythme imposé par l'horloge centrale des NSC, *via* les glucocorticoïdes (Le Minh et al., 2001). Les poumons et l'hypophyse n'étant pas ou pas complètement entraînés par les changements de disponibilité alimentaire, nous avons donc cherché à savoir si les

glucocorticoïdes s'opposent à l'entraînement de l'horloge de ces tissus. Ainsi, nous avons étudié le comportement des différentes horloges hépatique, pulmonaire et hypophysaire, chez des animaux ayant eu une lésion bilatérale des glandes surrénales (surrénalectomie : Adx) et qui ne peuvent plus sécréter les glucocorticoïdes. Ces animaux ont été placés en condition DRF et NRF. Cette étude révèle que le rythme de l'horloge des poumons, ainsi que celui de l'horloge hypophysaire est inchangé suite à la surrénalectomie, et ce, quelles que soient les conditions d'alimentation (Figure R13). Il semble donc qu'aucune inertie, *via* les glucocorticoïdes, n'agisse comme un frein sur les horloges hypophysaire et pulmonaire.

Conclusion :

L'ensemble des résultats de cette étude fait apparaître l'existence de plusieurs classes d'horloges périphériques. Certaines pourraient être entraînées par l'alimentation, d'autres par la lumière. Ces travaux indiquent que l'horloge hypophysaire apparaît comme étant une horloge périphérique particulière, puisqu'elle ne se comporte comme aucune de celles des deux autres classes. Sa position anatomique particulière, juste en-dessous du système nerveux central et des NSC, pourrait lui permettre d'intégrer des signaux provenant à la fois de l'horloge centrale, et de la périphérie. Ainsi, l'hypophyse pourrait être une horloge particulière située au cœur du système circadien.

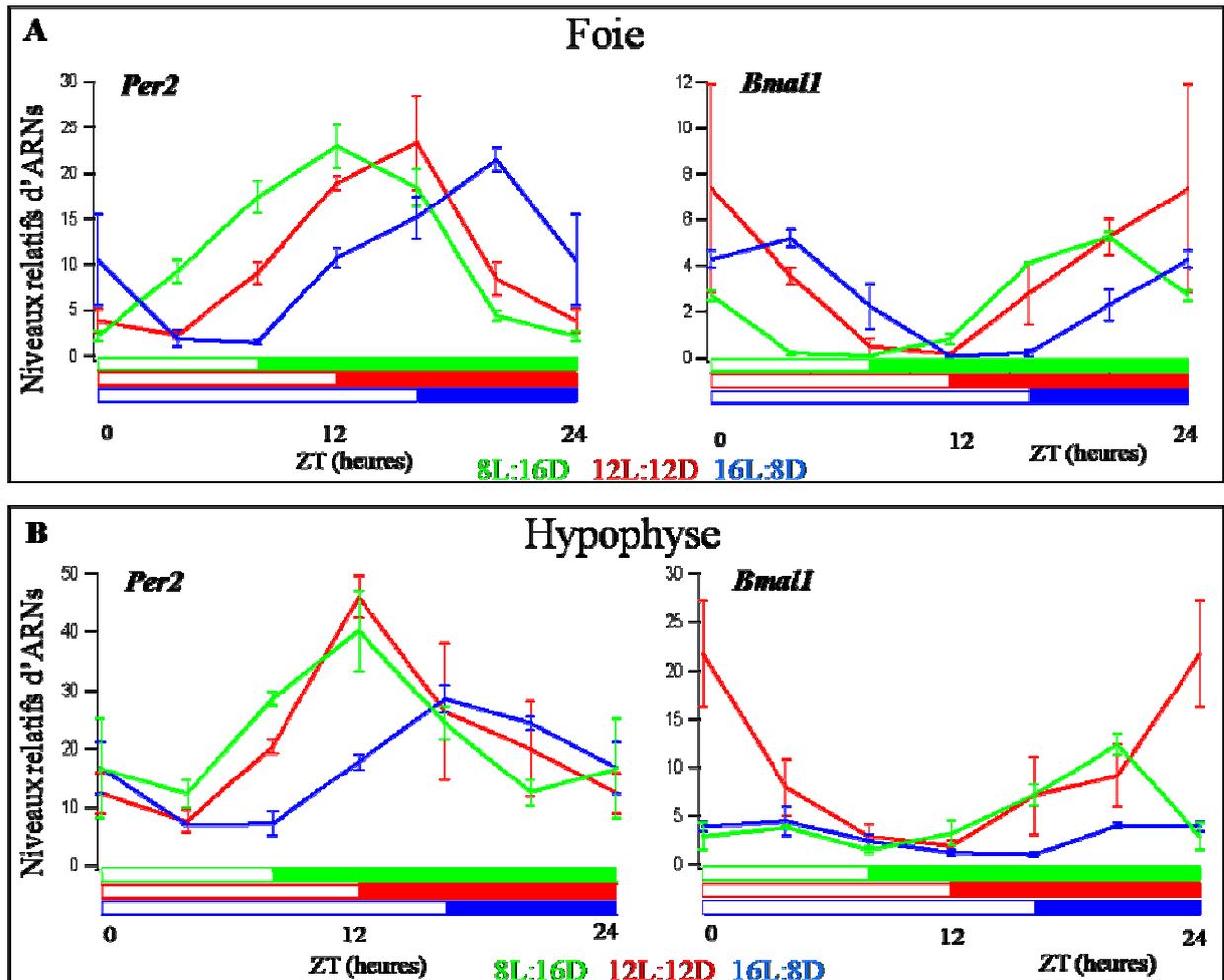


Figure R10 : Étude de la durée des jours sur les rythmes des horloges hépatique et hypophysaire.

(A). Dans le foie, lorsque la photopériode est changée, le rythme d'expression de *Per2* et *Bmal1* reste synchronisé sur la transition jour-nuit qui correspond au début de la phase naturelle d'alimentation.

(B). Dans l'hypophyse, les variations de la photopériode entraînent une forte diminution de l'amplitude des rythmes d'expression de *Per2* et *Bmal1*.

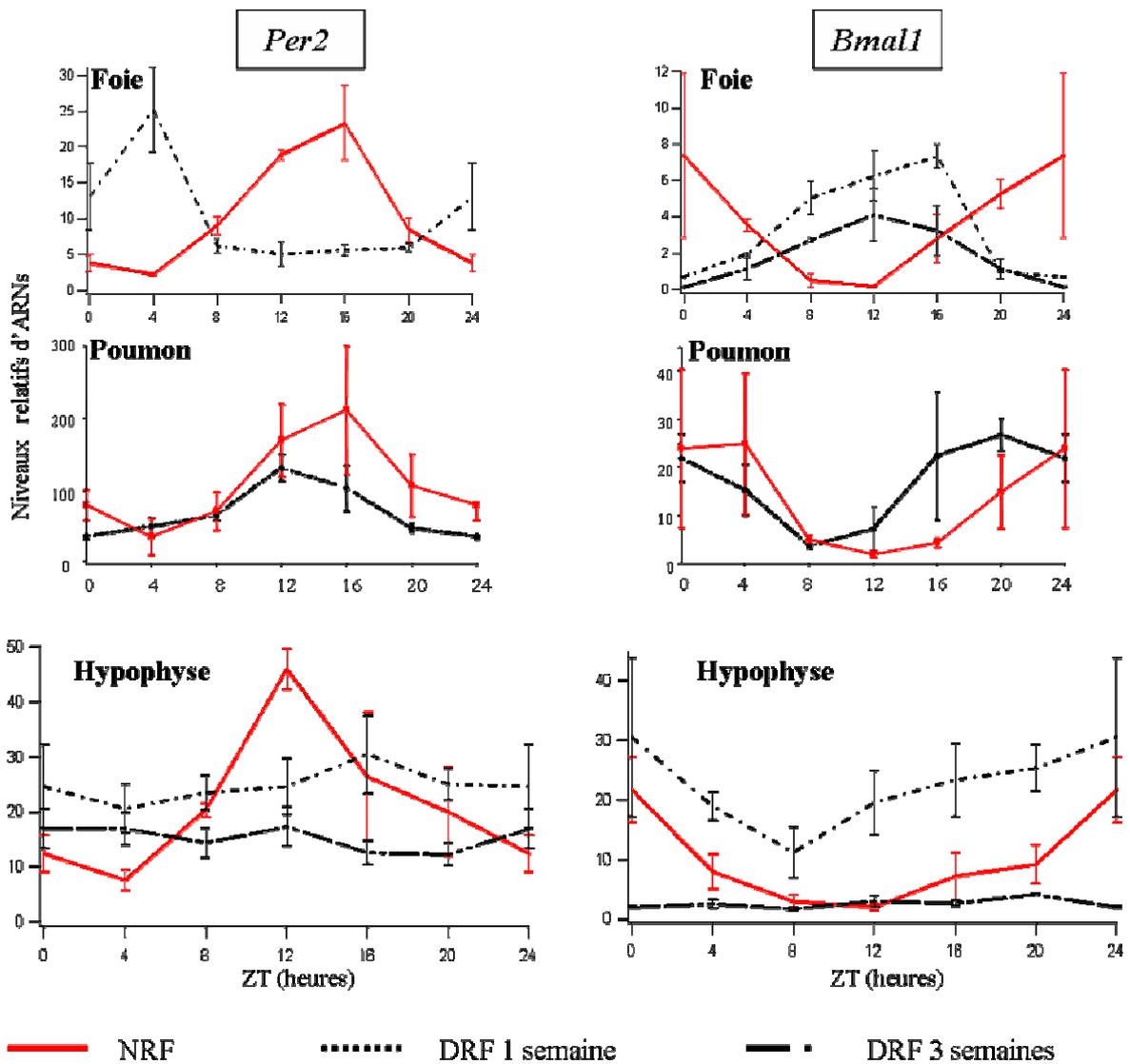


Figure R11 : Effets d'une inversion de la prise alimentaire sur l'expression de *Per2* et *Bmal1*.

Dans le foie, l'inversion de la prise alimentaire (DRF) au bout d'1 et 3 semaines entraîne l'inversion des rythmes de *Per2* et *Bmal1*, par rapport aux conditions contrôles (NRF). A l'inverse, dans les poumons, l'inversion de la prise alimentaire ne change pas les rythmes de *Per2* et *Bmal1*. Enfin, dans l'hypophyse, l'inversion de la prise alimentaire entraîne un comportement intermédiaire, l'amplitude des rythmes de *Per2* et *Bmal1* est fortement diminuée.

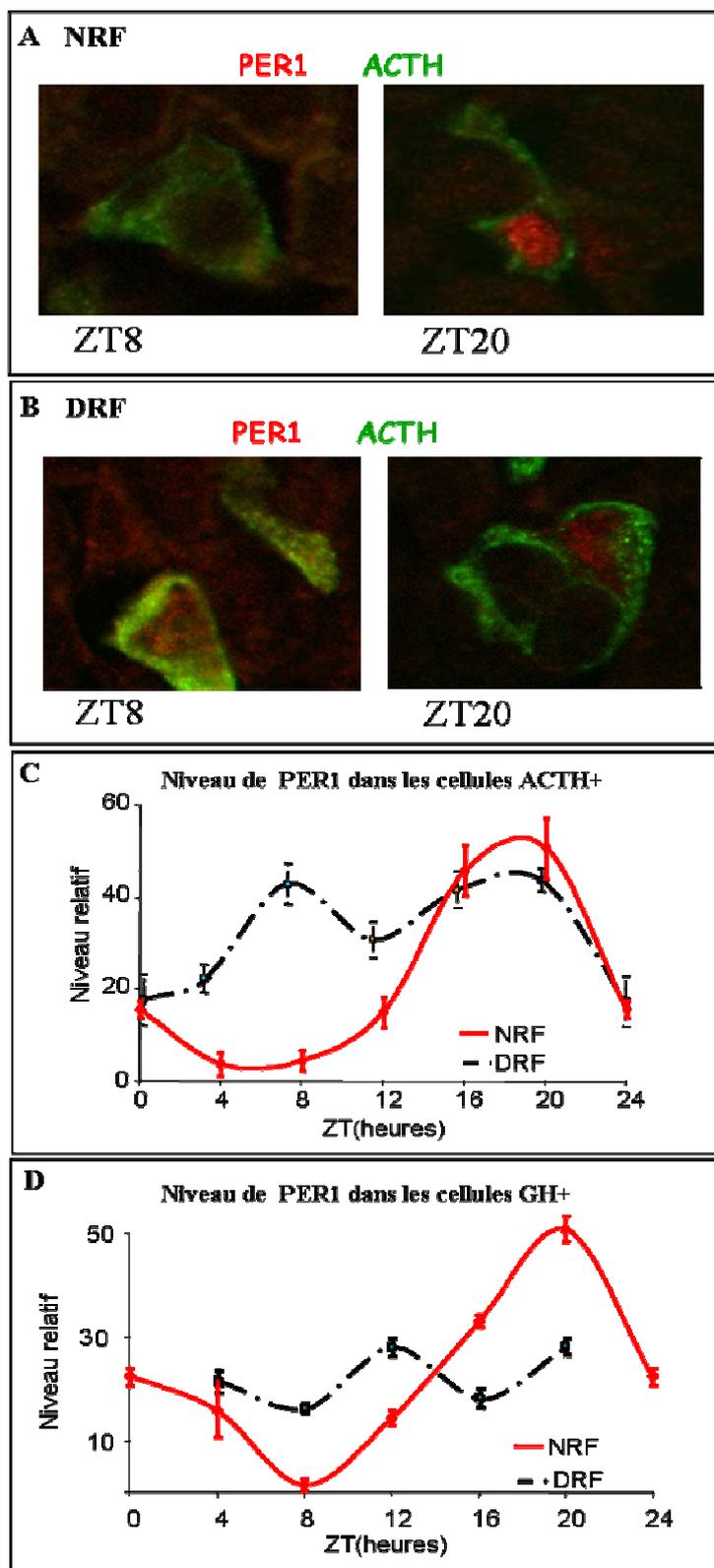


Figure R12 : Comportement de l'horloge des cellules ACTH et GH, lors d'une inversion de la prise alimentaire.

(A)(B) Les Immunofluorescences utilisant l'anticorps anti-PER1 (en rouge) et un anticorps anti-ACTH (en vert), au point bas (ZT8) et au point haut (ZT16) d'expression de PER1, montrent que l'expression de PER1 dans les cellules ACTH semble être constante en DRF. La quantification de PER1, toutes les 4 heures, dans les cellules ACTH et GH, en NRF et DRF, montre également que dans ces deux types cellulaires le rythme tend à s'atténuer.

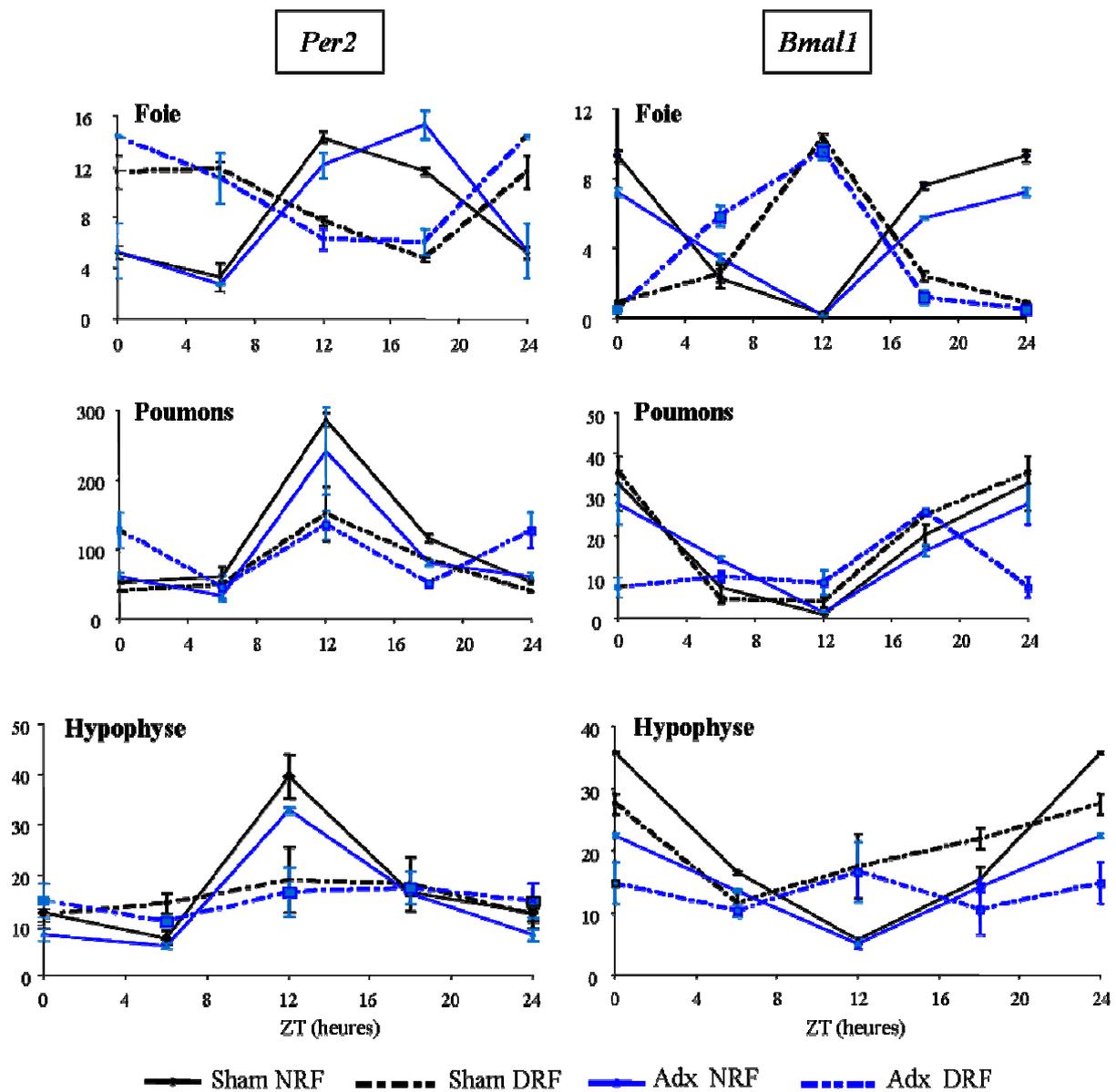


Figure R13 : Les glucocorticoïdes ne sont pas responsables de l'entraînement de l'horloge hypophysaire.

Chez des animaux ayant subi une ablation des glandes surrénales (Adx), les rythmes d'expression de *Per2* et *Bmal1* dans le foie, le poumon et l'hypophyse, en NRF et DRF, suivent les mêmes rythmes que chez les animaux contrôles (Sham).

DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans la problématique générale de l'étude des mécanismes de pulsativité des sécrétions endocrines

Une partie de mes travaux révèle que l'horloge circadienne participe au contrôle de la sécrétion de l'hormone de croissance GH et, par là, agit sur le métabolisme hépatique (Bur et al., 2009). Des relations entre l'horloge et le métabolisme avaient déjà été montrées précédemment (Gachon et al., 2006; Panda et al., 2002a), mais notre étude apporte de nouvelles informations. En effet, nous avons observé que l'horloge circadienne contribue à maintenir le dimorphisme sexuel qui existe dans le métabolisme hépatique, et cet effet passe par le contrôle de la pulsativité de sécrétion de GH. L'altération du profil hautement pulsatile de la GH, chez les souris mâles *Cry*^{-/-}, qui n'ont plus d'horloge circadienne, aboutit à la féminisation de l'activité hépatique, tant au niveau de l'expression génique que de l'activité enzymatique. L'horloge circadienne est donc nécessaire pour maintenir les différences métaboliques entre mâles et femelles, et cet effet passe par le maintien de la pulsativité de GH chez les mâles.

Outre le contrôle de la pulsativité ultradienne de GH, l'horloge circadienne intervient dans d'autres types de pulsativités. En effet, nous avons vu qu'elle contrôle aussi les cycles infradiens liés à la reproduction. **Ainsi, mes travaux de thèse illustrent le fait que l'horloge circadienne peut contrôler des rythmes non-circadiens.**

Chez les Drosophiles *Per*^S portant une mutation du gène *Period*, le rythme ultradien du chant est affecté (Kyriacou and Hall, 1980). Ces mutants, qui ont une période d'activité locomotrice diminuée en libre cours, ont aussi leur période ultradienne de chant réduite.

De la même façon, nos résultats obtenus sur les souris *Cry*^{-/-} ainsi que ceux décrits par le groupe de Takahashi, sur les souris *Clock/Clock* (Miller et al., 2004), montrent l'implication de l'horloge dans les cycles infradiens de la reproduction. Enfin, la mutation *Tau* de l'horloge circadienne, qui diminue la période d'activité locomotrice chez les Hamsters en libre cours, affecte aussi les rythmes ultradiens des sécrétions de LH et de cortisol de ces animaux (Loudon et al., 1994). La période de ces rythmes ultradiens est augmentée. (Remarque : la LH et le cortisol présentent respectivement une forte rythmicité infradienne et circadienne, mais elles sont aussi sécrétées avec une pulsativité ultradienne). **L'ensemble de ces études montre qu'il existe bien un lien entre l'horloge circadienne et différents rythmes biologiques non-circadiens.** Cependant, cette relation n'est pas forcément toujours linéaire. En effet, la diminution de la période de libre cours de l'horloge circadienne entraîne parfois une diminution de la période des rythmes non-circadiens, comme pour le chant des

drosophiles *Per^S* (Kyriacou and Hall, 1980), et parfois une augmentation, comme pour les sécrétions hormonales des hamsters *Tau* (Loudon et al., 1994).

Ces travaux soulèvent tous la même question : comment l'horloge circadienne contrôle-t-elle des rythmes non-circadiens ? Cette question centrale ouvre de nouvelles perspectives d'études sur l'horloge circadienne et suggère que son fonctionnement est peut-être encore plus complexe que ce que nous avons pu montrer en introduction. Ainsi, plusieurs questions pourraient être abordées : Existe-t-il des horloges ultradiennes/ou infradiennes dont le fonctionnement serait régulé par l'horloge circadienne ? L'horloge centrale des NSC possède-t-elle aussi un fonctionnement ultradien et/ou infradien qui pourrait contrôler des rythmes non-circadiens ? L'horloge moléculaire contrôle l'expression circadienne de certains gènes (CCG : Clock-Controlled Gene), mais peut-elle aussi contrôler l'expression ultradienne/infradienne d'autres gènes impliqués dans des rythmicités non-circadiennes ? La récente découverte de groupes géniques, ayant plusieurs harmoniques au cours d'un cycle circadien, abonderait dans ce sens (Hughes et al., 2009).

1. Recherche des sites d'actions de l'horloge circadienne.

Plusieurs niveaux d'implication de l'horloge circadienne dans le contrôle des pulsatilités endocrines de la GH, comme de la reproduction, pourraient être envisagés :

- les NSC
- les neurones neuroendocrines
- l'hypophyse.

Implication des NSC dans les pulsatilités neuroendocrines

Différentes études basées sur des expériences de lésions des NSC ont montré que l'ablation des NSC aboutit à l'abolition de la sécrétion, infradienne, préovulatoire de LH, et à l'altération de la sécrétion de prolactine (Dunn et al., 1980), ou encore à l'altération de la pulsatilité sécrétoire de GH, chez des rats mâles (Gustafsson et al., 1978; Willoughby and Martin, 1978). Dans certains cas, il a même été montré que les rythmes neuroendocrines peuvent être restaurés par une transplantation de neurones des NSC (Meyer-Bernstein et al., 1999). Il existe donc plusieurs exemples d'implication de l'horloge des NSC dans le contrôle

des sécrétions hormonales. Chez les souris *Cry*^{-/-}, dont le fonctionnement circadien des neurones des NSC est altéré (Albus et al., 2002), on peut imaginer que les libérations des neurotransmetteurs VIP et/ou AVP en direction des neurones neuroendocrines soient aussi affectées, engendrant l'altération du signal circadien reçu par les neurones GnRH, GHRH, SIRH... Un mauvais contrôle temporel de l'activité de ces neurones neuroendocrines par les NSC pourrait alors aboutir à l'altération des pulsatilités des axes somatotropes et gonadotropes expliquant ainsi les différents phénotypes de taille et de reproduction observés chez les mutants *Cry*^{-/-}.

Rôle des gènes horloges dans les neurones neuroendocrines

Un grand nombre de structures du système nerveux ainsi que de nombreux organes périphériques expriment aussi les gènes horloges (Abe et al., 2002; Yamazaki et al., 2000). Les neurones neuroendocrines font partie de ces oscillateurs périphériques qui expriment les gènes horloges (Kriegsfeld et al., 2003). Par exemple, les neurones GnRH ou les lignées de cellules GT-1 (neurones GnRH immortalisés) (Olcese et al., 2003) mais aussi les neurones TIDA (Sellix et al., 2006), qui sécrètent la Dopamine dans l'éminence médiane, expriment les gènes horloges. De plus, l'altération de l'horloge moléculaire des cellules GT-1 aboutit à la perturbation du profil sécrétoire de GnRH (Chappell et al., 2003). Il serait intéressant de voir si ce qui est observé ici, *ex-vivo*, a aussi lieu, *in-vivo*. Ces résultats convergent vers le fait que l'horloge des neurones neuroendocrines pourrait être directement impliquée dans leur fonctionnement pulsatile.

L'expression d'un certain nombre de gènes, les CCG (Clock-Controlled Gene) dépend du mécanisme moléculaire de l'horloge. On peut imaginer qu'au sein des neurones neuroendocrines, l'expression de certains gènes, impliqués dans le fonctionnement rythmique des neurones et/ou dans la machinerie sécrétoire, soit régulée par l'horloge moléculaire. Une étude montre, d'ores et déjà, que l'expression du gène de la GnRH présente, *in-vivo*, une régulation journalière (Gore, 1998). Il serait donc intéressant de rechercher si d'autres gènes, agissant directement sur le fonctionnement pulsatile et sécrétoire, peuvent aussi être régulés par l'horloge circadienne des neurones neuroendocrines.

Sachant que l'activité électrique des neurones est corrélée à leur activité sécrétoire, on peut aussi penser que l'expression de l'horloge dans les neurones neuroendocrines contribue à réguler leur activité électrique et sécrétoire. Ainsi, il serait intéressant de comparer l'activité

électrique et les rythmes sécrétoires de différents neurones neuroendocrines, issus d'animaux sauvages et d'animaux n'ayant plus d'horloge circadienne fonctionnelle, comme les mutants *Cry*^{-/-}.

Rôle de l'horloge moléculaire au sein de l'hypophyse

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'expression de gènes et de protéines horloges dans l'hypophyse et plus précisément dans les différents types cellulaires endocrines de l'hypophyse. Ces résultats soulèvent un certain nombre de questions : L'horloge intrahypophysaire peut-elle faire partie des mécanismes intrinsèques qui contribuent à son fonctionnement pulsatile ? Comment l'expression des gènes horloges pourrait-elle être liée aux sécrétions hormonales ? Comment les gènes horloges, exprimés avec un rythme circadien dans toutes les cellules endocrines, pourraient-elles contrôler de façon différente le fonctionnement des cellules endocrines relativement à leurs pulsatilités ?

Afin de répondre à ces questions, les rythmes des sécrétions hypophysaires pourraient être enregistrés, *ex-vivo*, en absence de toute influence hypothalamique, par l'incubation d'hypophyse ou de fragments d'hypophyse, issus de souris WT et *Cry*^{-/-}, comme cela a déjà été effectué pour des hypophyses de rats (Perez and Hymer, 1990). La comparaison des profils permettra d'identifier si l'horloge intrahypophysaire joue un rôle dans les pulsatilités des sécrétions endocrines de l'hypophyse.

Afin de connaître le rôle de l'horloge intrahypophysaire, *in-vivo*, sur les sécrétions d'hormones, on peut envisager de générer des souris porteuses d'**une altération de l'horloge ciblée, dans un type cellulaire de l'hypophyse**. Par exemple, des souris *Bmal1*^{loxP} (Storch et al., 2007) dans lesquelles l'horloge peut être conditionnellement inactivée, pourraient être croisées avec des souris de la lignée GH-*Cre* dans lesquelles la recombinaison *Cre* (Luque et al., 2007) est sous le contrôle du promoteur de la GH. Les souris *Bmal1*^{GH}*Cre* obtenues seront alors dépourvues d'horloge dans les cellules GH, uniquement. Chez ces souris, différents paramètres, reflétant la pulsativité de GH, pourraient être mesurés. La comparaison phénotypique des mutants ubiquitaires de l'horloge (souris *Bmal1*^{-/-} (*CMV-Cre*)) avec les mutants spécifiques (ex : souris *Bmal1*^{GH}*Cre*), ainsi que l'étude de la pulsativité GH, nous

permettra de distinguer **la part que joue l'horloge intra-hypophysaire dans la pulsativité GH.**

Enfin, il serait intéressant de regarder si l'horloge participe aux mécanismes intercellulaires qui contribuent à l'harmonisation de l'activité endocrine de la glande. Nous avons vu, en introduction, que les cellules somatotropes forment un réseau en 3 dimensions qui serait aussi impliqué dans le fonctionnement pulsatile de la glande (Bonfont et al., 2005). Des molécules d'adhérence comme les Cadhérines et de β -Caténines soutiendraient ce réseau. Or, il a été récemment montré que ces molécules forment un complexe avec une protéine CK2 (Caseine Kinase 2) qui participe par ailleurs à l'horloge moléculaire (Wang and Jones, 2006). La phosphorylation des β -Caténines pourrait donc être contrôlée par l'horloge circadienne, suggérant alors que le réseau de cellules GH pourrait lui aussi être modulé de façon circadienne. Il existe donc un lien potentiel entre les composants du réseau de cellules GH et les gènes horloges eux-mêmes. Afin de voir si le réseau de cellules GH pourrait être modulé de façon circadienne par l'horloge, et de voir si cette modulation pourrait être impliquée dans l'activité rythmique des cellules GH, il serait intéressant d'étudier la répartition tridimensionnelle des cellules GH chez les souris mâles *Cry*^{-/-} qui présentent une altération de la pulsativité GH.

2. Perspectives à plus long terme.

L'implication de l'horloge circadienne dans le contrôle des pulsativités endocrines pourraient aboutir, à plus long terme, à différentes perspectives cliniques :

Intérêt dans la chronothérapie

L'horloge circadienne participe au maintien des différences de métabolismes existantes entre les mâles et les femelles, par le biais du contrôle de la sécrétion de GH. Ces résultats pourraient trouver des applications potentielles dans le domaine de la chronomédecine qui vise à optimiser les traitements médicamenteux en jouant sur leur moment d'administration. En effet, une étude clinique, menée sur des patients atteints d'un

cancer du colon en phase métastatique, rapporte que la réponse à une chimiothérapie chronomodulée est très différente entre les hommes et les femmes (Giacchetti et al., 2006). Cependant, les mécanismes expliquant cette différence sont inconnus. Le lien entre le dimorphisme sexuel du métabolisme hépatique, responsable de la détoxification, et l'horloge circadienne révélé dans notre étude pourrait prendre ici toute son importance. Il pourrait aussi être à la base de processus de « personnalisation » des traitements chronomodulés qui dépendraient non seulement du sexe des patients mais aussi de leurs chronotypes.

Amélioration de la prise en charge des problèmes de fertilité féminine.

L'horloge circadienne joue aussi un rôle important dans la fonction de reproduction des femelles. Ces travaux pourraient trouver des applications cliniques en vue de la prise en charge des femmes présentant fréquemment des problèmes de fertilité dus à de fortes perturbations de leur horloge circadienne interne, à cause du travail de nuit ou en horaires décalés (ex : les hôtesses de l'air, les infirmières...etc) (Boden and Kennaway, 2006; Boivin et al., 2007; Lauria et al., 2006; Su et al., 2008; Uehata and Sasakawa, 1982). En effet, ces femmes sont plus sujettes aux cycles menstruels irréguliers, aux troubles de l'ovulation, aux fausses couches, aux accouchements prématurés, autant de causes qui altèrent leur capacité de reproduction. Relativement à ces résultats, il est important de noter qu'en France, 30% des problèmes d'infertilité chez les femmes sont provoqués par des troubles de l'ovulation (AFFSSAPS). Il apparaît donc comme essentiel de comprendre comment l'horloge circadienne interne joue sur la reproduction. Une des pistes à explorer serait de déterminer le rôle du Kisspeptine (Kp) / et de son récepteur GPR54 dans le contrôle circadien de la reproduction. En effet, ce système récemment découvert joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la puberté et dans la régulation de la reproduction. Des mutations du GPR54 empêchent la puberté des souris qui restent donc stériles (Seminara et al., 2003) et sont à l'origine d'un hypogonadisme hypogonadotrope idiopathique chez les humains. De plus, le Kp est un stimulateur puissant de l'axe gonadotrope qui agit en amont des neurones à GnRH. Il stimule la libération de GnRH qui active la libération des gonadotrophines LH et FSH, et ce, chez plusieurs espèces (Dhillon et al., 2005; Gottsch et al., 2004; Matsui et al., 2004; Messenger et al., 2005; Shahab et al., 2005; Smith et al., 2006c). Aussi, chez les femelles, le Kp a un rôle essentiel dans le déclenchement de l'ovulation (Smith et al., 2006c). Enfin, le système Kp/GPR54 est aussi capable d'intégrer des informations temporelles pour

ajuster l'activité de reproduction au moment le plus propice (Revel et al., 2006; Simonneaux et al., 2009). Des études récentes ont aussi suggéré qu'il existe un lien anatomique entre les NSC et les neurones de Kp de l'AVPV (Smith et al., 2006a) (Figure 33). De plus l'expression du gène du Kp semble aussi être régulé de façon circadienne (Robertson et al., 2009).

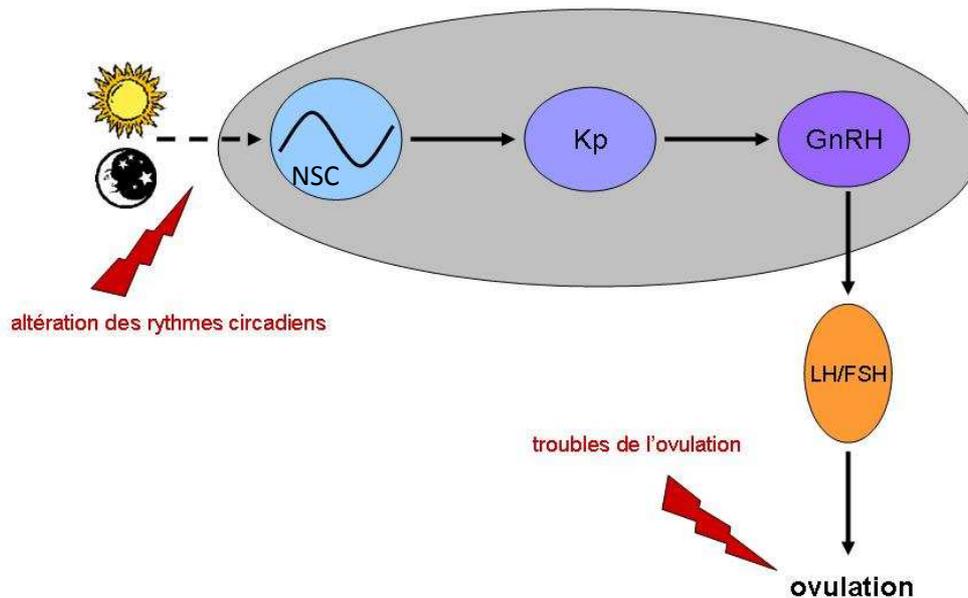


Figure 33 : Représentation schématique des voies de contrôle de l'ovulation par l'horloge circadienne interne.

Les neurones Kp de l'AVPV pourraient donc constituer une voie d'entrée de l'horloge circadienne pour le contrôle de l'ovulation (Figure 33). Par conséquent, toutes les altérations du système circadien, comme celles présentes chez les femmes qui travaillent de nuit ou en horaire décalés, sont susceptibles d'entraîner des troubles de l'ovulation et donc de la capacité de reproduction. La compréhension de ces voies de régulation devrait permettre de trouver des sites d'actions pour de nouvelles drogues permettant de contrôler au mieux la reproduction.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., Block, G. D., 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J Neurosci.* 22, 350-6.
- Ahluwalia, A., Clodfelter, K. H., Waxman, D. J., 2004. Sexual dimorphism of rat liver gene expression: regulatory role of growth hormone revealed by deoxyribonucleic Acid microarray analysis. *Mol Endocrinol.* 18, 747-60.
- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G., Lee, C. C., 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell.* 91, 1055-64.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S., Lee, C. C., 2001. *MPer1* and *mper2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms.* 16, 100-4.
- Albus, H., Bonnefont, X., Chaves, I., Yasui, A., Doczy, J., van der Horst, G. T., Meijer, J. H., 2002. Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr Biol.* 12, 1130-3.
- Albus, H., Vansteensel, M. J., Michel, S., Block, G. D., Meijer, J. H., 2005. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol.* 15, 886-93.
- Alonso, G., Sanchez-Hormigo, A., Loudes, C., El Yandouzi, T., Carmignac, D., Faivre-Bauman, A., Reclin, B., Epelbaum, J., Robinson, I. C., Mollard, P., Mery, P. F., 2007. Selective alteration at the growth-hormone-releasing-hormone nerve terminals during aging in GHRH-green fluorescent protein mice. *Aging Cell.* 6, 197-207.
- Alvarez, J. D., Hansen, A., Ord, T., Bebas, P., Chappell, P. E., Giebultowicz, J. M., Williams, C., Moss, S., Sehgal, A., 2008. The circadian clock protein *BMAL1* is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *J Biol Rhythms.* 23, 26-36.
- Angeles-Castellanos, M., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C., 2004. *c-Fos* expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286, R158-65.
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J., Escobar, C., 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of *c-Fos* and protein *Per1* immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience.* 144, 344-55.
- Aschoff, J., 1965. Circadian Rhythms in Man. *Science.* 148, 1427-32.

B

- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., Weaver, D. R., 2001. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*. 30, 525-36.
- Baes, M., Allaerts, W., Deneef, C., 1987. Evidence for functional communication between folliculostellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology*. 120, 685-91.
- Baker, B. L., Dermody, W. C., Reel, J. R., 1974. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the mammalian hypothalamus (1). *Am J Anat*. 139, 129-34.
- Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schutz, G., Schibler, U., 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*. 289, 2344-7.
- Balsalobre, A., Damiola, F., Schibler, U., 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*. 93, 929-37.
- Bargiello, T. A., Jackson, F. R., Young, M. W., 1984. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature*. 312, 752-4.
- Bartness, T. J., Song, C. K., Demas, G. E., 2001. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*. 16, 196-204.
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., Zoran, M. J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 6, 544-56.
- Bertherat, J., Bluet-Pajot, M. T., Epelbaum, J., 1995. Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol*. 132, 12-24.
- Boden, M. J., Kennaway, D. J., 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*. 132, 379-92.
- Boivin, D. B., Tremblay, G. M., James, F. O., 2007. Working on atypical schedules. *Sleep Med*. 8, 578-89.
- Bonnefont, X., Albus, H., Meijer, J. H., van der Horst, G. T., 2003. Light signalling in cryptochrome-deficient mice. *Novartis Found Symp*. 253, 56-66; discussion 66-72, 102-9.

- Bonnefont, X., Fiekers, J., Creff, A., Mollard, P., 2000. Rhythmic bursts of calcium transients in acute anterior pituitary slices. *Endocrinology*. 141, 868-75.
- Bonnefont, X., Lacampagne, A., Sanchez-Hormigo, A., Fino, E., Creff, A., Mathieu, M. N., Smallwood, S., Carmignac, D., Fontanaud, P., Travo, P., Alonso, G., Courtois-Coutry, N., Pincus, S. M., Robinson, I. C., Mollard, P., 2005. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 16880-5.
- Bouchon, R., Ropartz, P., 1984. [Beneficial effects of pituitary grafts under the renal capsule on behavior of dwarf mutant mice]. *J Physiol (Paris)*. 79, 129-31.
- Bridges, R. S., Millard, W. J., 1988. Growth hormone is secreted by ectopic pituitary grafts and stimulates maternal behavior in rats. *Horm Behav*. 22, 194-206.
- Brown-Grant, K., Raisman, G., 1977. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 198, 279-96.
- Buijs, R. M., Kalsbeek, A., 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*. 2, 521-6.
- Buijs, R. M., Markman, M., Nunes-Cardoso, B., Hou, Y. X., Shinn, S., 1993. Projections of the suprachiasmatic nucleus to stress-related areas in the rat hypothalamus: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 335, 42-54.
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., Radcliffe, L. A., Hogenesch, J. B., Simon, M. C., Takahashi, J. S., Bradfield, C. A., 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*. 103, 1009-17.
- Bur, I. M., Cohen-Solal, A. M., Carmignac, D., Abecassis, P. Y., Chauvet, N., Martin, A. O., van der Horst, G. T., Robinson, I. C., Maurel, P., Mollard, P., Bonnefont, X., 2009. The circadian clock components CRY1 and CRY2 are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism. *J Biol Chem*. 284, 9066-73.

C

- Carr, A. J., Johnston, J. D., Semikhodskii, A. G., Nolan, T., Cagampang, F. R., Stirland, J. A., Loudon, A. S., 2003. Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr Biol*. 13, 1543-8.

- Challet, E., le Maho, Y., Robin, J. P., Malan, A., Cherel, Y., 1995. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav.* 50, 405-12.
- Challet, E., Pevet, P., Lakhdar-Ghazal, N., Malan, A., 1997. Ventromedial nuclei of the hypothalamus are involved in the phase advance of temperature and activity rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Brain Res Bull.* 43, 209-18.
- Chappell, P. E., White, R. S., Mellon, P. L., 2003. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J Neurosci.* 23, 11202-13.
- Christian, C. A., Mobley, J. L., Moenter, S. M., 2005. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 15682-7.
- Clark, R. G., Carlsson, L. M., Robinson, I. C., 1987. Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinol.* 114, 399-407.
- Clark, R. G., Jansson, J. O., Isaksson, O., Robinson, I. C., 1985. Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocrinol.* 104, 53-61.
- Clarke, I. J., Cummins, J. T., Jenkin, M., Phillips, D. J., 1989. The oestrogen-induced surge of LH requires a 'signal' pattern of gonadotrophin-releasing hormone input to the pituitary gland in the ewe. *J Endocrinol.* 122, 127-34.
- Clarke, J. D., Coleman, G. J., 1986. Persistent meal-associated rhythms in SCN-lesioned rats. *Physiol Behav.* 36, 105-13.
- Coleman, G. J., Harper, S., Clarke, J. D., Armstrong, S., 1982. Evidence for a separate meal-associated oscillator in the rat. *Physiol Behav.* 29, 107-15.
- Cuttler, L., Glaum, S. R., Collins, B. A., Miller, R. J., 1992. Calcium signalling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology.* 130, 945-53.

D

- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950-61.

- Davidson, A. J., Poole, A. S., Yamazaki, S., Menaker, M., 2003. Is the food-entrainable circadian oscillator in the digestive system? *Genes Brain Behav.* 2, 32-9.
- Davidson, A. J., Stephan, F. K., 1999. Plasma glucagon, glucose, insulin, and motilin in rats anticipating daily meals. *Physiol Behav.* 66, 309-15.
- Davies, J. S., Carter, D. A., Wells, T., 2004. Photic stimulation inhibits growth hormone secretion in rats: a hypothalamic mechanism for transient entrainment. *Endocrinology.* 145, 2950-8.
- de la Iglesia, H. O., Meyer, J., Carpino, A., Jr., Schwartz, W. J., 2000. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science.* 290, 799-801.
- de la Iglesia, H. O., Schwartz, W. J., 2006. Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology.* 147, 1148-53.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J. C., Matsuda, F., Chaussain, J. L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 10972-6.
- Debruyne, J. P., Noton, E., Lambert, C. M., Maywood, E. S., Weaver, D. R., Reppert, S. M., 2006. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron.* 50, 465-77.
- DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., Reppert, S. M., 2007a. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci.* 10, 543-5.
- DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., Reppert, S. M., 2007b. Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr Biol.* 17, R538-9.
- Denef, C., 2008. Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol.* 20, 1-70.
- Denef, C., Hautekeete, E., Dewals, R., de Wolf, A., 1980. Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by androgens in rat pituitary cells in culture: functional diversity of subpopulations separated by unit gravity sedimentation. *Endocrinology.* 106, 724-9.
- Dhillon, W. S., Chaudhri, O. B., Patterson, M., Thompson, E. L., Murphy, K. G., Badman, M. K., McGowan, B. M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 6609-15.

- Dhir, R. N., Shapiro, B. H., 2003. Interpulse growth hormone secretion in the episodic plasma profile causes the sex reversal of cytochrome P450s in senescent male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 15224-8.
- Diaz-Munoz, M., Vazquez-Martinez, O., Aguilar-Roblero, R., Escobar, C., 2000. Anticipatory changes in liver metabolism and entrainment of insulin, glucagon, and corticosterone in food-restricted rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279, R2048-56.
- Douglas, W. W., 1968. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol.* 34, 451-74.
- Dudley, C. A., Erbel-Sieler, C., Estill, S. J., Reick, M., Franken, P., Pitts, S., McKnight, S. L., 2003. Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science.* 301, 379-83.
- Dunlap, J. C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 96, 271-90.
- Dunn, J. D., Johnson, D. C., Castro, A. J., Swenson, R., 1980. Twenty-four hour pattern of prolactin levels in female rats subjected to transection of the mesencephalic raphe or ablation of the suprachiasmatic nuclei. *Neuroendocrinology.* 31, 85-91.

E-F

- Escobar, C., Diaz-Munoz, M., Encinas, F., Aguilar-Roblero, R., 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *Am J Physiol.* 274, R1309-16.
- Fauquier, T., Guerineau, N. C., McKinney, R. A., Bauer, K., Mollard, P., 2001. Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 8891-6.
- Feillet, C. A., Ripperger, J. A., Magnone, M. C., Dulloo, A., Albrecht, U., Challet, E., 2006. Lack of food anticipation in *Per2* mutant mice. *Curr Biol.* 16, 2016-22.
- Fuller, P. M., Lu, J., Saper, C. B., 2008. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. *Science.* 320, 1074-7.

G

- Gabriel, S. M., Roncancio, J. R., Ruiz, N. S., 1992. Growth hormone pulsatility and the endocrine milieu during sexual maturation in male and female rats. *Neuroendocrinology*. 56, 619-25.
- Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., Descombes, P., Schibler, U., 2006. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab*. 4, 25-36.
- Gambacciani, M., Liu, J. H., Swartz, W. H., Tueros, V. S., Rasmussen, D. D., Yen, S. S., 1987a. Intrinsic pulsatility of ACTH release from the human pituitary in vitro. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 26, 557-63.
- Gambacciani, M., Liu, J. H., Swartz, W. H., Tueros, V. S., Yen, S. S., Rasmussen, D. D., 1987b. Intrinsic pulsatility of luteinizing hormone release from the human pituitary in vitro. *Neuroendocrinology*. 45, 402-6.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., Weitz, C. J., 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 280, 1564-9.
- Giacchetti, S., Bjarnason, G., Garufi, C., Genet, D., Iacobelli, S., Tampellini, M., Smaaland, R., Focan, C., Coudert, B., Humblet, Y., Canon, J. L., Adenis, A., Lo Re, G., Carvalho, C., Schueller, J., Anciaux, N., Lentz, M. A., Baron, B., Gorlia, T., Levi, F., 2006. Phase III trial comparing 4-day chronomodulated therapy versus 2-day conventional delivery of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin as first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer: the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Chronotherapy Group. *J Clin Oncol*. 24, 3562-9.
- Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E., Saper, C. B., 2001. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*. 4, 1165.
- Gooley, J. J., Schomer, A., Saper, C. B., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci*. 9, 398-407.
- Gore, A. C., 1998. Diurnal rhythmicity of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat. *Neuroendocrinology*. 68, 257-63.
- Goto, M., Oshima, I., Tomita, T., Ebihara, S., 1989. Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res*. 7, 195-204.

- Gottsch, M. L., Cunningham, M. J., Smith, J. T., Popa, S. M., Acohido, B. V., Crowley, W. F., Seminara, S., Clifton, D. K., Steiner, R. A., 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 145, 4073-7.
- Green, D. J., Gillette, R., 1982. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245, 198-200.
- Grima, B., Chelot, E., Xia, R., Rouyer, F., 2004. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*. 431, 869-73.
- Gronfier, C., Brandenberger, G., 1998. Ultradian rhythms in pituitary and adrenal hormones: their relations to sleep. *Sleep Med Rev.* 2, 17-29.
- Gronfier, C., Luthringer, R., Follenius, M., Schaltenbrand, N., Macher, J. P., Muzet, A., Brandenberger, G., 1996. A quantitative evaluation of the relationships between growth hormone secretion and delta wave electroencephalographic activity during normal sleep and after enrichment in delta waves. *Sleep*. 19, 817-24.
- Guerineau, N., Corcuff, J. B., Tabarin, A., Mollard, P., 1991. Spontaneous and corticotropin-releasing factor-induced cytosolic calcium transients in corticotrophs. *Endocrinology*. 129, 409-20.
- Guerineau, N. C., Bonnefont, X., Stoeckel, L., Mollard, P., 1998. Synchronized spontaneous Ca²⁺ transients in acute anterior pituitary slices. *J Biol Chem*. 273, 10389-95.
- Guerineau, N. C., McKinney, R. A., Debanne, D., Mollard, P., Gahwiler, B. H., 1997. Organotypic cultures of the rat anterior pituitary: morphology, physiology and cell-to-cell communication. *J Neurosci Methods*. 73, 169-76.
- Guillaumond, F., Dardente, H., Giguere, V., Cermakian, N., 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 20, 391-403.
- Guillemin, R., 2005. Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol*. 184, 11-28.
- Gustafsson, J. A., Eneroth, P., Hokfelt, T., Skett, P., 1978. Central control of hepatic steroid metabolism: effect of discrete hypothalamic lesions. *Endocrinology*. 103, 141-51.
- Gutierrez-Pascual, E., Martinez-Fuentes, A. J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, M. M., Castano, J. P., 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol*. 19, 521-30.

Gylfe, E., Grapengiesser, E., Hellman, B., 1991. Propagation of cytoplasmic Ca²⁺ oscillations in clusters of pancreatic beta-cells exposed to glucose. *Cell Calcium*. 12, 229-40.

H

Hamelink, C. R., Currie, P. J., Chambers, J. W., Castonguay, T. W., Coscina, D. V., 1994. Corticosterone-responsive and -unresponsive metabolic characteristics of adrenalectomized rats. *Am J Physiol*. 267, R799-804.

Hannibal, J., 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*. 309, 73-88.

Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S. M., Georg, B., Fahrenkrug, J., 2002. The photopigment melanopsin is exclusively present in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-containing retinal ganglion cells of the retinohypothalamic tract. *J Neurosci*. 22, RC191.

Hara, R., Wan, K., Wakamatsu, H., Aida, R., Moriya, T., Akiyama, M., Shibata, S., 2001. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*. 6, 269-78.

Hastings, M. H., Herzog, E. D., 2004. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms*. 19, 400-13.

Hastings, M. H., Reddy, A. B., Maywood, E. S., 2003. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 4, 649-61.

Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., Yau, K. W., 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 295, 1065-70.

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

Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S., Bradfield, C. A., 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 5474-9.

Honma, K., Honma, S., Hiroshige, T., 1987. Activity rhythms in the circadian domain appear in suprachiasmatic nuclei lesioned rats given methamphetamine. *Physiol Behav*. 40, 767-74.

Honma, S., Katsuno, Y., Tanahashi, Y., Abe, H., Honma, K., 1998. Circadian rhythms of arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide do not depend on cytoarchitecture of dispersed cell culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 86, 967-76.

Honma, S., Yasuda, T., Yasui, A., van der Horst, G. T., Honma, K., 2008. Circadian behavioral rhythms in *Cry1/Cry2* double-deficient mice induced by methamphetamine. *J Biol Rhythms*. 23, 91-4.

Houben, H., Deneff, C., 1994. Bioactive peptides in anterior pituitary cells. *Peptides*. 15, 547-82.

Hughes, M. E., DiTacchio, L., Hayes, K. R., Vollmers, C., Pulivarthy, S., Baggs, J. E., Panda, S., Hogenesch, J. B., 2009. Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet*. 5, e1000442.

Hurd, M. W., Ralph, M. R., 1998. The significance of circadian organization for longevity in the golden hamster. *J Biol Rhythms*. 13, 430-6.

I-J

Iijima, M., Nikaido, T., Akiyama, M., Moriya, T., Shibata, S., 2002. Methamphetamine-induced, suprachiasmatic nucleus-independent circadian rhythms of activity and *mPer* gene expression in the striatum of the mouse. *Eur J Neurosci*. 16, 921-9.

Iijima, M., Yamaguchi, S., van der Horst, G. T., Bonnefont, X., Okamura, H., Shibata, S., 2005. Altered food-anticipatory activity rhythm in *Cryptochrome*-deficient mice. *Neurosci Res*. 52, 166-73.

Inouye, S. T., 1982. Ventromedial hypothalamic lesions eliminate anticipatory activities of restricted daily feeding schedules in the rat. *Brain Res*. 250, 183-7.

Inouye, S. T., Kawamura, H., 1979. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76, 5962-6.

Inzunza, O., Seron-Ferre, M. J., Bravo, H., Torrealba, F., 2000. Tuberomammillary nucleus activation anticipates feeding under a restricted schedule in rats. *Neurosci Lett*. 293, 139-42.

- Ixart, G., Szafarczyk, A., Belugou, J. L., Assenmacher, I., 1977. Temporal relationships between the diurnal rhythm of hypothalamic corticotrophin releasing factor, pituitary corticotrophin and plasma corticosterone in the rat. *J Endocrinol.* 72, 113-20.
- Jagota, A., de la Iglesia, H. O., Schwartz, W. J., 2000. Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat Neurosci.* 3, 372-6.
- Jobst, E. E., Allen, C. N., 2002. Calbindin neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus do not exhibit a circadian variation in spontaneous firing rate. *Eur J Neurosci.* 16, 2469-74.
- Johnson, C. H., 2005. Testing the adaptive value of circadian systems. *Methods Enzymol.* 393, 818-37.
- Johnson, D., al-Shawi, R., Bishop, J. O., 1995. Sexual dimorphism and growth hormone induction of murine pheromone-binding proteins. *J Mol Endocrinol.* 14, 21-34.
- Johnson, M., 1939. Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white footed mice (*Peromyscus*). *J Exp Zool.* 82, 315-328.
- Johnson, R. F., Moore, R. Y., Morin, L. P., 1988. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 460, 297-313.

K

- Kalsbeek, A., Buijs, R. M., 2002. Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309, 109-18.
- Kalsbeek, A., Buijs, R. M., van Heerikhuize, J. J., Arts, M., van der Woude, T. P., 1992. Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain Res.* 580, 62-7.
- Kalsbeek, A., Garidou, M. L., Palm, I. F., Van Der Vliet, J., Simonneaux, V., Pevet, P., Buijs, R. M., 2000. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci.* 12, 3146-54.
- Kato, M., 1992. Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology.* 131, 2133-8.

- Klarsfeld, A., Rouyer, F., 1998. Effects of circadian mutations and LD periodicity on the life span of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms*. 13, 471-8.
- Knight, P. G., 1996. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol*. 17, 476-509.
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V., Antoch, M. P., 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*. 20, 1868-73.
- Konopka, R. J., Benzer, S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68, 2112-6.
- Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J. S., Schibler, U., 2007. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*. 5, e34.
- Kramer, A., Yang, F. C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T. E., Davis, F. C., Weitz, C. J., 2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*. 294, 2511-5.
- Krieg, R. J., Jr., Johnson, J. H., Adler, R. A., 1989. Growth hormone (GH) secretion in the pituitary-grafted male rat: in vivo effects of GH-releasing hormone and isoproterenol and in vitro release by individual somatotropes. *Endocrinology*. 125, 2273-8.
- Krieger, D. T., 1980. Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinology*. 106, 649-54.
- Kriegsfeld, L. J., Korets, R., Silver, R., 2003. Expression of the circadian clock gene *Period 1* in neuroendocrine cells: an investigation using mice with a *Per1::GFP* transgene. *Eur J Neurosci*. 17, 212-20.
- Kriegsfeld, L. J., Silver, R., 2006. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Horm Behav*. 49, 557-74.
- Kuhlman, S. J., McMahon, D. G., 2004. Rhythmic regulation of membrane potential and potassium current persists in SCN neurons in the absence of environmental input. *Eur J Neurosci*. 20, 1113-7.
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., 1999. *mCRY1* and *mCRY2* are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. 98, 193-205.

Kuwahara, S., Kesuma Sari, D., Tsukamoto, Y., Tanaka, S., Sasaki, F., 2004. Age-related changes in growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin neurons in the hypothalamus and in GH cells in the anterior pituitary of female mice. *Brain Res.* 1025, 113-22.

Kwiecien, R., Hammond, C., 1998. Differential management of Ca²⁺ oscillations by anterior pituitary cells: a comparative overview. *Neuroendocrinology.* 68, 135-51.

Kyriacou, C. P., Hall, J. C., 1980. Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77, 6729-33.

L

Lamia, K. A., Storch, K. F., Weitz, C. J., 2008. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 15172-7.

Landry, G. J., Simon, M. M., Webb, I. C., Mistlberger, R. E., 2006. Persistence of a behavioral food-anticipatory circadian rhythm following dorsomedial hypothalamic ablation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290, R1527-34.

Lanneau, C., Peineau, S., Petit, F., Epelbaum, J., Gardette, R., 2000. Somatostatin modulation of excitatory synaptic transmission between periventricular and arcuate hypothalamic nuclei in vitro. *J Neurophysiol.* 84, 1464-74.

Lauria, L., Ballard, T. J., Caldora, M., Mazzanti, C., Verdecchia, A., 2006. Reproductive disorders and pregnancy outcomes among female flight attendants. *Aviat Space Environ Med.* 77, 533-9.

Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schutz, G., Schibler, U., 2001. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 20, 7128-36.

Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S., Reppert, S. M., 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell.* 107, 855-67.

Lewy, H., Naor, Z., Ashkenazi, I. E., 1996. Rhythmicity of luteinizing hormone secretion expressed in vitro. *Eur J Endocrinol.* 135, 455-63.

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., Kay, S. A., 2007. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell.* 129, 605-16.

Liu, C., Weaver, D. R., Strogatz, S. H., Reppert, S. M., 1997. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell*. 91, 855-60.

Loudon, A. S., Wayne, N. L., Krieg, R., Iranmanesh, A., Veldhuis, J. D., Menaker, M., 1994. Ultradian endocrine rhythms are altered by a circadian mutation in the Syrian hamster. *Endocrinology*. 135, 712-8.

Luque, R. M., Amargo, G., Ishii, S., Lobe, C., Franks, R., Kiyokawa, H., Kineman, R. D., 2007. Reporter expression, induced by a growth hormone promoter-driven Cre recombinase (rGHP-Cre) transgene, questions the developmental relationship between somatotropes and lactotropes in the adult mouse pituitary gland. *Endocrinology*. 148, 1946-53.

M

Marchant, E. G., Mistlberger, R. E., 1997. Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. *Brain Res*. 765, 273-82.

Martinez-Merlos, M. T., Angeles-Castellanos, M., Diaz-Munoz, M., Aguilar-Roblero, R., Mendoza, J., Escobar, C., 2004. Dissociation between adipose tissue signals, behavior and the food-entrained oscillator. *J Endocrinol*. 181, 53-63.

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., Ohtaki, T., 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 320, 383-8.

Meijer, J. H., Albus, H., Weidema, F., Ravesloot, J. H., 1993. The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. *Brain Res*. 603, 284-8.

Meijer, J. H., Schaap, J., Watanabe, K., Albus, H., 1997. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: in vivo versus in vitro models. *Brain Res*. 753, 322-7.

Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Ma, D., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R. R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M. B., Colledge, W. H., Caraty, A., Aparicio, S. A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102, 1761-6.

Meyer-Bernstein, E. L., Jetton, A. E., Matsumoto, S. I., Markuns, J. F., Lehman, M. N., Bittman, E. L., 1999. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*. 140, 207-18.

- Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H., Takahashi, J. S., 2004. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol.* 14, 1367-73.
- Mistlberger, R. E., 1994. Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 18, 171-95.
- Mistlberger, R. E., Rechtschaffen, A., 1984. Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol Behav.* 33, 227-35.
- Moenter, S. M., Caraty, A., Locatelli, A., Karsch, F. J., 1991. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology.* 129, 1175-82.
- Mohawk, J. A., Baer, M. L., Menaker, M., 2009. The methamphetamine-sensitive circadian oscillator does not employ canonical clock genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 3519-24.
- Moore, R. Y., Eichler, V. B., 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201-6.
- Morand, I., Fonlupt, P., Guerrier, A., Trouillas, J., Calle, A., Remy, C., Rousset, B., Munari-Silem, Y., 1996. Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology.* 137, 3356-67.

N-O

- Norstedt, G., Palmiter, R., 1984. Secretory rhythm of growth hormone regulates sexual differentiation of mouse liver. *Cell.* 36, 805-12.
- Nunez, L., Frawley, L. S., 1998. alpha-MSH potentiates the responsiveness of mammotropes by increasing Ca²⁺ entry. *Am J Physiol.* 274, E971-7.
- Olcese, J., Domagalski, R., Bednorz, A., Weaver, D. R., Urbanski, H. F., Reuss, S., Middendorff, R., 2003. Expression and regulation of mPer1 in immortalized GnRH neurons. *Neuroreport.* 14, 613-8.

P-Q

- 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., Hogenesch, J. B., 2002a. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*. 109, 307-20.
- Panda, S., Hogenesch, J. B., Kay, S. A., 2002b. Circadian rhythms from flies to human. *Nature*. 417, 329-35.
- Panda, S., Sato, T. K., Castrucci, A. M., Rollag, M. D., DeGrip, W. J., Hogenesch, J. B., Provencio, I., Kay, S. A., 2002c. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*. 298, 2213-6.
- Pendergast, J. S., Nakamura, W., Friday, R. C., Hatanaka, F., Takumi, T., Yamazaki, S., 2009. Robust food anticipatory activity in BMAL1-deficient mice. *PLoS ONE*. 4, e4860.
- Peng, M. T., Pi, W. P., Wu, C. I., 1969. Growth hormone secretion by pituitary grafts under the median eminence or renal capsule. *Endocrinology*. 85, 360-5.
- Perez, F. M., Hymer, W. C., 1990. A new tissue-slicing method for the study of function and position of somatotrophs contained within the male rat pituitary gland. *Endocrinology*. 127, 1877-86.
- Petersen, S. L., Ottem, E. N., Carpenter, C. D., 2003. Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod*. 69, 1771-8.
- Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., Rouyer, F., 2007. Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS Biol*. 5, e315.
- Pittendrigh, C. S., 1954. On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 40, 1018-29.
- Pittendrigh, C. S., 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons. *J Comp Physiol [A]*. 136, 333-335.
- Pittendrigh, C. S., Minis, D. H., 1972. Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 69, 1537-9.
- Pitts, S., Perone, E., Silver, R., 2003. Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic Clk/Clk mutant mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285, R57-67.

- Plotsky, P. M., Vale, W., 1985. Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science*. 230, 461-3.
- Poulsen, J. H., Williams, J. A., 1976. Spontaneous repetitive hyperpolarisations from cells in the rat adenohypophysis. *Nature*. 263, 156-8.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U., 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 110, 251-60.
- Prosser, H. M., Bradley, A., Chesham, J. E., Ebling, F. J., Hastings, M. H., Maywood, E. S., 2007. Prokineticin receptor 2 (Prokr2) is essential for the regulation of circadian behavior by the suprachiasmatic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104, 648-53.
- Quintero, J. E., Kuhlman, S. J., McMahon, D. G., 2003. The biological clock nucleus: a multiphasic oscillator network regulated by light. *J Neurosci*. 23, 8070-6.

R

- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., Menaker, M., 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247, 975-8.
- Ralph, M. R., Lehman, M. N., 1991. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci*. 14, 362-6.
- Ralph, M. R., Menaker, M., 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*. 241, 1225-7.
- Ray, D., Melmed, S., 1997. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev*. 18, 206-28.
- Reick, M., Garcia, J. A., Dudley, C., McKnight, S. L., 2001. NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science*. 293, 506-9.
- Reppert, S. M., Schwartz, W. J., Artman, H. G., Fisher, D. A., 1983. Comparison of the temporal profiles of vasopressin and oxytocin in the cerebrospinal fluid of the cat, monkey and rat. *Brain Res*. 261, 341-5.

- Revel, F. G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J. D., Simonneaux, V., 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol.* 16, 1730-5.
- Robertson, J. L., Clifton, D. K., de la Iglesia, H. O., Steiner, R. A., Kauffman, A. S., 2009. Circadian Regulation of Kiss1 Neurons: Implications for Timing the Preovulatory GnRH/LH Surge. *Endocrinology.*
- Rohling, J., Wolters, L., Meijer, J. H., 2006. Simulation of day-length encoding in the SCN: from single-cell to tissue-level organization. *J Biol Rhythms.* 21, 301-13.
- Ronnekleiv, O. K., Kelly, M. J., 1988. Plasma prolactin and luteinizing hormone profiles during the estrous cycle of the female rat: effects of surgically induced persistent estrus. *Neuroendocrinology.* 47, 133-41.
- Ruis, J. F., Talamini, L. M., Buys, J. P., Rietveld, W. J., 1989. Effects of time of feeding on recovery of food-entrained rhythms during subsequent fasting in SCN-lesioned rats. *Physiol Behav.* 46, 857-66.
- Rusak, B., Zucker, I., 1979. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* 59, 449-526.

S

- Schlegel, W., Winiger, B. P., Mollard, P., Vacher, P., Wuarin, F., Zahnd, G. R., Wollheim, C. B., Dufy, B., 1987. Oscillations of cytosolic Ca²⁺ in pituitary cells due to action potentials. *Nature.* 329, 719-21.
- Schwartz, J., Cherny, R., 1992. Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocr Rev.* 13, 453-75.
- Schwartz, W. J., Davidsen, L. C., Smith, C. B., 1980. In vivo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol.* 189, 157-67.
- Schwartz, W. J., Gainer, H., 1977. Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science.* 197, 1089-91.
- Schwartz, W. J., Reppert, S. M., Eagan, S. M., Moore-Ede, M. C., 1983. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res.* 274, 184-7.

- Sellix, M. T., Egli, M., Poletini, M. O., McKee, D. T., Bosworth, M. D., Fitch, C. A., Freeman, M. E., 2006. Anatomical and functional characterization of clock gene expression in neuroendocrine dopaminergic neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290, R1309-23.
- Seminara, S. B., Messenger, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno, J. S., Jr., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., Hendrick, A. G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U. B., Slaugenhaupt, S. A., Gusella, J. F., O'Rahilly, S., Carlton, M. B., Crowley, W. F., Jr., Aparicio, S. A., Colledge, W. H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 349, 1614-27.
- Serre-Beinier, V., Le Gurun, S., Belluardo, N., Trovato-Salinaro, A., Charollais, A., Haefliger, J. A., Condorelli, D. F., Meda, P., 2000. Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets. *Diabetes.* 49, 727-34.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S. B., Crowley, W. F., Ojeda, S. R., Plant, T. M., 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 2129-34.
- Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der Horst, G. T., Hastings, M. H., Reppert, S. M., 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science.* 288, 1013-9.
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., Jr., Reppert, S. M., 1997. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron.* 19, 1261-9.
- Shibata, S., Minamoto, Y., Ono, M., Watanabe, S., 1994. Aging impairs methamphetamine-induced free-running and anticipatory locomotor activity rhythms in rats. *Neurosci Lett.* 172, 107-10.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H., Hattori, K., 1982. Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* 247, 154-8.
- Shieh, K. R., 2003. Distribution of the rhythm-related genes rPERIOD1, rPERIOD2, and rCLOCK, in the rat brain. *Neuroscience.* 118, 831-43.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C., Okamura, H., 1997. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell.* 91, 1043-53.
- Shin, S. H., Reifel, C. W., 1981. Adenohypophysis has an inherent property for pulsatile prolactin secretion. *Neuroendocrinology.* 32, 139-44.

- Simonneaux, V., Ansel, L., Revel, F. G., Klosen, P., Pevet, P., Mikkelsen, J. D., 2009. Kisspeptin and the seasonal control of reproduction in hamsters. *Peptides*. 30, 146-53.
- Smith, J. T., Acohido, B. V., Clifton, D. K., Steiner, R. A., 2006a. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol*. 18, 298-303.
- Smith, J. T., Clifton, D. K., Steiner, R. A., 2006b. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*. 131, 623-30.
- Smith, J. T., Popa, S. M., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., Steiner, R. A., 2006c. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 26, 6687-94.
- Soji, T., Mabuchi, Y., Kurono, C., Herbert, D. C., 1997. Folliculo-stellate cells and intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. *Microsc Res Tech*. 39, 138-49.
- Stephan, F. K., Swann, J. M., Sisk, C. L., 1979. Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav Neural Biol*. 25, 545-54.
- Stewart, J. K., Clifton, D. K., Koerker, D. J., Rogol, A. D., Jaffe, T., Goodner, C. J., 1985. Pulsatile release of growth hormone and prolactin from the primate pituitary in vitro. *Endocrinology*. 116, 1-5.
- Stojilkovic, S. S., Catt, K. J., 1992. Calcium oscillations in anterior pituitary cells. *Endocr Rev*. 13, 256-80.
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*. 291, 490-3.
- Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., Rosbash, M., 2005. A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature*. 438, 238-42.
- Storch, K. F., Paz, C., Signorovitch, J., Raviola, E., Pawlyk, B., Li, T., Weitz, C. J., 2007. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell*. 130, 730-41.
- Storch, K. F., Weitz, C. J., 2009. Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 6808-13.
- Su, S. B., Lu, C. W., Kao, Y. Y., Guo, H. R., 2008. Effects of 12-hour rotating shifts on menstrual cycles of photoelectronic workers in Taiwan. *Chronobiol Int*. 25, 237-48.

Sun, Y., Yang, Z., Niu, Z., Wang, W., Peng, J., Li, Q., Ma, M. Y., Zhao, Y., 2006. The mortality of MOP3 deficient mice with a systemic functional failure. *J Biomed Sci.* 13, 845-51.

Sun, Z. S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G., Lee, C. C., 1997. RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell.* 90, 1003-11.

Szafarczyk, A., Ixart, G., Alonso, G., Malaval, F., Nougier-Soule, J., Assenmacher, I., 1981. Effects of raphe lesions on circadian ACTH, corticosterone and motor activity rhythms in free-running blinded rats. *Neurosci Lett.* 23, 87-92.

Szafarczyk, A., Ixart, G., Malaval, F., Nougier-Soule, J., Assenmacher, I., 1979. Effects of lesions of the suprachiasmatic nuclei and of p-chlorophenylalanine on the circadian rhythms of adrenocorticotrophic hormone and corticosterone in the plasma, and on locomotor activity of rats. *J Endocrinol.* 83, 1-16.

T-U

Takahashi, J. S., 2004. Finding new clock components: past and future. *J Biol Rhythms.* 19, 339-47.

Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., McDearmon, E. L., 2008. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 9, 764-75.

Tannenbaum, G. S., Ling, N., 1984. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology.* 115, 1952-7.

Tannenbaum, G. S., Martin, J. B., 1976. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* 98, 562-70.

Tengholm, A., Gylfe, E., 2009. Oscillatory control of insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 297, 58-72.

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptacek, L. J., Fu, Y. H., 2001. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science.* 291, 1040-3.

Triqueneaux, G., Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M. P., Safi, R., Takahashi, J. S., Delaunay, F., Laudet, V., 2004. The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol.* 33, 585-608.

Tse, A., Tse, F. W., Almers, W., Hille, B., 1993. Rhythmic exocytosis stimulated by GnRH-induced calcium oscillations in rat gonadotropes. *Science*. 260, 82-4.

Uehata, T., Sasakawa, N., 1982. The fatigue and maternity disturbances of night workwomen. *J Hum Ergol (Tokyo)*. 11 Suppl, 465-74.

V

van den Pol, A. N., Tsujimoto, K. L., 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*. 15, 1049-86.

Van der Beek, E. M., Horvath, T. L., Wiegant, V. M., Van den Hurk, R., Buijs, R. M., 1997. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol*. 384, 569-79.

van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., Yasui, A., 1999. Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 398, 627-30.

Vila-Porcile, E., 1972. [The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adenohypophysis in the rat (pars distalis)]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 129, 328-69.

Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., Takahashi, J. S., 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science*. 264, 719-25.

von Gall, C., Garabette, M. L., Kell, C. A., Frenzel, S., Dehghani, F., Schumm-Draeger, P. M., Weaver, D. R., Korf, H. W., Hastings, M. H., Stehle, J. H., 2002. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nat Neurosci*. 5, 234-8.

Vrang, N., Larsen, P. J., Mikkelsen, J. D., 1995. Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin tract tracing. *Brain Res*. 684, 61-9.

W

- Wagner, C., Caplan, S. R., Tannenbaum, G. S., 1998. Genesis of the ultradian rhythm of GH secretion: a new model unifying experimental observations in rats. *Am J Physiol.* 275, E1046-54.
- Wang, S., Jones, K. A., 2006. CK2 controls the recruitment of Wnt regulators to target genes in vivo. *Curr Biol.* 16, 2239-44.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., Reppert, S. M., 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron.* 14, 697-706.
- Welsh, D. K., Yoo, S. H., Liu, A. C., Takahashi, J. S., Kay, S. A., 2004. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol.* 14, 2289-95.
- Wiegand, S. J., Terasawa, E., Bridson, W. E., Goy, R. W., 1980. Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology.* 31, 147-57.
- Willoughby, J. O., Martin, J. B., 1978. The suprachiasmatic nucleus synchronizes growth hormone secretory rhythms with the light-dark cycle. *Brain Res.* 151, 413-7.
- Woelfle, M. A., Ouyang, Y., Phanvijhitsiri, K., Johnson, C. H., 2004. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. *Curr Biol.* 14, 1481-6.

X - Y - Z

- Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L. J., Fu, Y. H., 2005. Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature.* 434, 640-4.
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G. T., Okamura, H., 2001. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science.* 292, 278-81.

- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., Tei, H., 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 288, 682-5.
- 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., 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, 5339-46.
- York, D. H., Baker, F. L., Kraicer, J., 1971. Electrical properties of cells in the adenohypophysis--an in vivo study. *Neuroendocrinology*. 8, 10-6.
- Yoshihara, T., Honma, S., Mitome, M., Honma, K., 1997. Independence of feeding-associated circadian rhythm from light conditions and meal intervals in SCN lesioned rats. *Neurosci Lett*. 222, 95-8.
- Zheng, T., Villalobos, C., Nusser, K. D., Gettys, T. W., Faught, W. J., Castano, J. P., Frawley, L. S., 1997. Phenotypic characterization and functional correlation of alpha-MSH binding to pituitary cells. *Am J Physiol*. 272, E282-7.
- Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Reppert, S. M., 1998. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*. 20, 1103-10.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications

Bur I M, Cohen-Solal A, Carmignac D, Abecassis PY, Chauvet N, Martin AO, van der Hors GT, Robinson ICAF, Maurel P, Mollard P, Bonnefont X.

The Circadian Clock Components CRY1 and CRY2 Are Necessary to Sustain Sex Dimorphism in Mouse Liver Metabolism, *J. Biol. Chem.*, Vol. 284, Issue 14, 9066-9073, April 3, 2009.

Cf: Editorial:N. R. Gough, Feminizing Liver Metabolism. Sci. Signal. 2, ec118 (2009).

Communications à des congrès, symposium :

Bur I., Chauvet N., Mollard P. Bonnefont X.

Pulsatilités endocrines contrôlées par l'horloge circadienne

25^e Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Lille 1-3 Octobre 2008

Bur I., Mollard P. Bonnefont X.

Pulsatilités endocrines non circadiennes contrôlées par les cryptochromes

40^e Congrès de la de la Société Francophone de Chronobiologie, Caen 4-6 Juin 2008

Bur I., Cohen-Solal A M, Chauvet N., van der Horst GTJ, Mollard P. Bonnefont X

Differences in liver metabolism between males and females depend on circadian timekeeping
11th Meeting Society for Research on Biological Rhythms, Sandestin (USA), May 17-22, 2008.

Bonnefont X., **Bur I.**, Chauvet N., Mollard P.

L'horloge circadienne participe au dimorphisme sexuel du métabolisme hépatique.

39^e Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, Paris, 19-21 Septembre 2007

Bur I., Chauvet N., Mollard P. Bonnefont X.

The circadian clock controls ultradian rythmicity of growth hormone.

The Endocrine Society, Toronto (Canada), June 2-5 May, 2007.

Bur I., Zouaoui S., Chauvet N., Courtois-Coutry N., Mollard P. Bonnefont X.

The pituitary gland as an original peripheral clock in the circadian system.

Gordon Research Conference Chronobiology, Aussois (France), May 6-11 May, 2007.

Bur I., Chauvet N., Mollard P. Bonnefont X.

A gender issue for the circadian clock: Feminized hepatic metabolism in males without cryptochromes.

Gordon Research Conference Chronobiology, Aussois (France), May 6-11 May, 2007.

Bur I., Chauvet N., Mollard P, Bonnefont X. *Présentation orale.

Sexe ou horloge ?

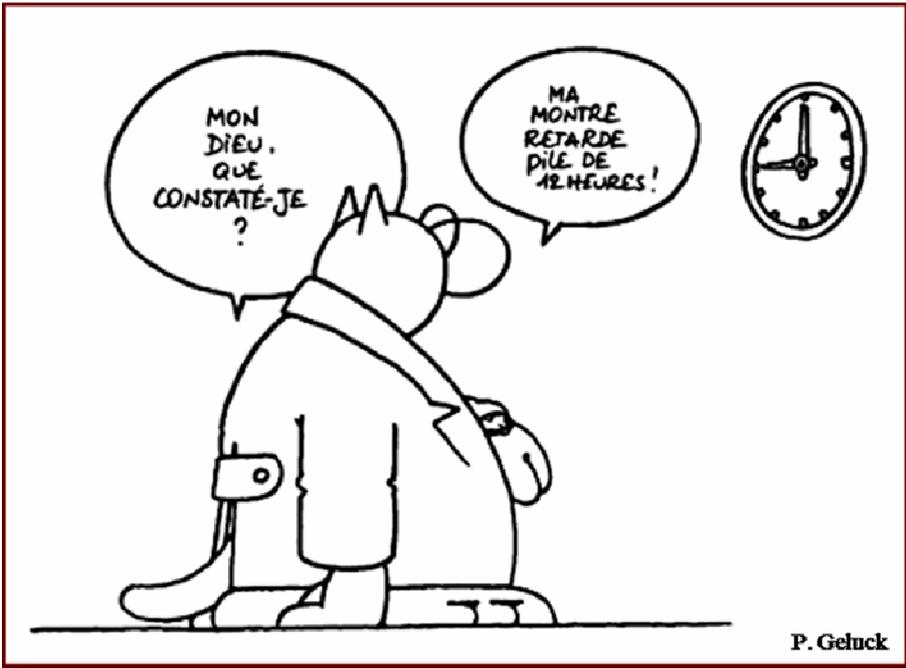
5^{ième} congrès de l'Ecole doctorale « Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé » 25-27

Avril 2007

Bur I., Chauvet N., Courtois–Coutry N., Mollard P., Bonnefont X.

The circadian machinery in the pituitary gland.

10th Meeting Society for Research on Biological Rhythms, Sandestin (USA), May 21–25, 2006.



P. Geinck

Involvement of the circadian clock in the endocrine pulsatility.

The pulsatility of hormones secretion is crucial in the endocrine system, because it confers to hormones: a role and their efficiency. In this respect, the objective of my thesis was to study the involvement of the circadian clock, which controls the daily rhythms of numerous aspects of the physiology and behavior, in these endocrine pulsilities.

In the first part of my work, we studied two functions involving a neuroendocrine pulsatile activity - body growth and female reproduction-, in the knock-out mice *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*, devoid of a functional circadian clock. The main results indicate, at first, that the circadian clock interferes with the GH ultradian pulsatility, and secondly, that the circadian clock is necessary for the preservation of the infradian cycles bound to the reproduction. This study shows, on one hand that, the circadian clock plays a role in mechanisms responsible for hormonal pulsatility, and on the other hand, that this circadian clock can control non-circadian rhythms.

The second part of my work consisted in understanding at which level the clock may act to regulate the endocrine pulsatility. We were interested in the pituitary gland, an important gland of the endocrine system, which presents various types of pulsatility, circadian and not circadian. The pituitary gland expresses the main the clock genes and proteins according to a daily rhythm. And, although the various cells which compose the pituitary have a different endocrine rhythmic functioning, their clocks are in phase. Finally, the pituitary clock seems to integrate various signals, such as light and food. This characterization serves as a basis for new studies to understand if the pituitary clock could also coordinate the activity of the endocrine cells within the gland and so facilitate the genesis of a global pulsatility.

RESUME

La pulsativité des sécrétions hormonales est cruciale dans le système endocrine, puisqu'elle confère aux hormones : leur rôle et leur efficacité d'action. Dans ce cadre, l'objectif de ma thèse a été d'étudier l'implication de l'horloge circadienne, qui contrôle les rythmes journaliers de nombreux aspects de la physiologie et du comportement, dans ces pulsativités endocrines.

Dans un premier temps, nous avons étudié deux fonctions impliquant une activité neuroendocrine pulsatile - la croissance et la reproduction -, chez les souris *Cry1^{-/-}Cry2^{-/-}*, dépourvues d'horloge circadienne fonctionnelle. Les principaux résultats indiquent, premièrement, que l'horloge circadienne interfère avec la pulsativité ultradienne de GH, et deuxièmement, que l'horloge circadienne est nécessaire au maintien des cycles infradiens liés à la reproduction. Cette étude montre, d'une part, que l'horloge circadienne joue un rôle dans les mécanismes responsables des pulsativités hormonales, et d'autre part, qu'elle peut contrôler des rythmes non-circadiens.

Dans un second temps, afin de comprendre à quel niveau l'horloge agit pour réguler les pulsativités endocrines, nous nous sommes intéressés à l'hypophyse, une glande majeure du système endocrine, qui présente différents types de pulsativités, circadiennes et non circadiennes. L'hypophyse exprime les principaux gènes et protéines horloges avec un rythme journalier. Et, bien que les différentes cellules endocrines qui la composent, aient un fonctionnement rythmique différent, leurs horloges sont en phase. Enfin, l'horloge hypophysaire semble intégrer différents signaux : la lumière et la nourriture. Cette caractérisation sert de base pour de nouvelles études visant à comprendre si l'horloge hypophysaire pourrait aussi coordonner l'activité des cellules endocrines au sein de la glande et ainsi favoriser l'émergence d'une pulsativité globale.

DISCIPLINE : Chronobiologie, Endocrinologie

MOTS-CLES : Horloge circadienne, pulsativités endocrines, hypophyse antérieure, gènes horloges, GH, reproduction, rythmes ultradiens, cycles infradiens.

*Institut de Génomique Fonctionnelle
CNRS UMR 5203, INSERM U661, Université Montpellier 1 et 2
Département d'Endocrinologie
Equipe « Rythmes et réseaux dans l'hypophyse »
141, rue de la Cardonille
34094 MONTPELLIER*