HAL
open science

Rôle des synchronisateurs externes (photopériode et température ambiante) dans l'adaptation aux conditions extrêmes de l'environnement chez deux espèces saisonnières : le dromadaire (Camelus dromaderius) adapté à la chaleur et le hamster d'Europe (Cricetus cricetus) adapté au froid

Hanan Bouaouda

To cite this version:

Hanan Bouaouda. Rôle des synchronisateurs externes (photopériode et température ambiante) dans l'adaptation aux conditions extrêmes de l'environnement chez deux espèces saisonnières : le dromadaire (Camelus dromaderius) adapté à la chaleur et le hamster d'Europe (Cricetus cricetus) adapté au froid. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg; Institut agronomique et vétérinaire Hassan II (Maroc), 2015. Français. NNT : 2015STRAJ020 . tel-01356451

HAL Id: tel-01356451

https://theses.hal.science/tel-01356451v1

Submitted on 25 Aug 2016

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 DE STRASBOURG
FRANCE

INSTITUT AGRONOMIQUE ET VÉTÉRINAIRE HASSAN II
RABAT- MAROC

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

Institut des Neuroscinces Cellulaires et Intégratives de Strasbourg

THÈSE EN COTUTELLE présentée par :

HANAN BOUAOUDA

Soutenue le : **19 Mai 2015**

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

&

Docteur de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat

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

Rôles des synchronisateurs externes (photopériode et température ambiante) dans l'adaptation aux conditions extrêmes de l'environnement chez deux espèces saisonnières : le dromadaire (*Camelus dromedarius*) adapté à la chaleur et le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) adapté au froid

THÈSE dirigée par:

Mr. PEVET Paul	Docteur, Université de Strasbourg
Mr. El ALLALI Khalid	Professeur, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II

RAPPORTEURS:

Mme. FREUND-MERCIER Marie-José	Professeur, Université de Strasbourg
Mr. BENNIS Mohamad	Professeur, Université de Cadi Ayyad, Marrakech
Mr. TLIGUI Noursaid	Professeur, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mr. MENDOZA Jorge	Docteur, Université de Strasbourg
Mr. ERRAMI Mohammed	Professeur, Université Abdelmalek Essaâdi, Tétouan
Mr. ACHAABAN Mohamed-Rachid	Professeur, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II

Par Carl von Linné, 1751

Minuit. Cactus à grandes fleurs.
Une heure. Lacieron de Laponie.
Deux heures. Salsifis jaune.
Trois heures. Grande décride.
Quatre heures. Cripide des toits.
Cinq heures. Emerocalle fauve.
Six heures. Epervière frutiqueuse.
Sept heures. Laitron.
Huit heures. Pilosele. Mouron rouge.
Neuf heures. Souci des champs.
Dix heures. Ficoïde napolitaine.
Onze heures. Ornithogale (Dame-d'Onze-Heures).
Midi. Ficoïde glaciale.
Une heure. Œillet prolifère.
Deux heures. Épervière.
Trois heures. Léontodons.
Quatre heures. Alysse alystoïde.
Cinq heures. Belle de nuit.
Six heures. Géranium triste.
Sept heures. Pavot à tige nue.
Huit heures. Liseron droit.
Neuf heures. Liseron linéaire.
Dix heures. Hipomée pourpre.
Onze heures. Silène fleur de nuit.

*Melle **HANAN BOUAOUDA** est membre de la promotion **« Emmanuel Kant »** du Collège Doctoral Européen de l'Université de Strasbourg. Elle a bénéficié des aides spécifiques du CDE et a suivi un enseignement hebdomadaire sur les affaires européennes dispensées par des spécialistes internationaux.*

Ses travaux de recherche ont été effectués dans le cadre d'une convention de cotutelle avec l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc et l'Université de Strasbourg, France.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au sein des laboratoires suivants :

- Unité d'Anatomie Comparée-CNRST-URAC 49, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat Maroc.
- Département de Neurobiologie des Rythmes de l'Institut de Neurosciences Cellulaire et Intégrative, Université de Strasbourg, France.

Les expérimentations sur le dromadaire ont été réalisées dans :

- Les étables de l'Unité de Physiologie Animale, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.
- Les étables de l'Unité de Parasitologie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc.

Les expérimentations sur le hamster d'Europe ont été réalisées dans :

- Le chronobiotron CNRS-UMS3415, Strasbourg, France.

Ce travail de thèse a été financé par :

- Bourse octroyée par l'Ambassade de France au Maroc.
- Bourse offerte par la Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche du Ministre français de l'agriculture.
- Bourse d'Excellence EIFFEL allouée par le Ministère Français des Affaires Étrangères.
- Bourse de voyage EBRS-Oxford.
- Projet de Recherches en Agronomie et Développement : PRAD 11-09 de 2011 à 2013.
- Projet URAC-49 CNRST Maroc- IAV Hassan II.
- Collège Doctoral Européen de l'Université de Strasbourg, France (Février2014-Juillet 2014).
- CNRS-France (Août 2014-Octobre 2014).
- GDRI-Neurosciences (CNRS-INSERM-CNRST) (Novembre 2014-Décembre 2014).
- Projet PROFERD-Dromadaire : Ministère de l'Agriculture.

A ma très chère maman, à qui je dois beaucoup pour ma présence devant ce jury et à ma très chère maman surtout pour l'amour dont elle a baigné ses 2 enfants

A mon très cher papa dont les conseils et la justesse de pensée m'ont orienté dans ma vie

A mon très cher frère et unique qui a su animé et illuminé ma vie

A mon cher pays….

C'est mon cadeau pour vous

….

REMERCIEMENTS

Je remercie tout particulièrement les membres du jury qui ont accepté et ont pris du temps pour analyser et évaluer mon travail de thèse.

Mes vifs remerciements vont aux ***Pr. Marie-José Freund-Mercier****, le* ***Pr. Errami Mohammed****, le* ***Pr. Bennis Mohamad*** *et le* ***Pr. Tligui Noursaid*** *qui ont eu l'obligeance d'évaluer ce travail de thèse et de nous avoir fait l'honneur de siéger parmi cette commission de thèse. Hommage respectueux.*

Je tiens à remercier particulièrement ***Dr. Etienne Challet,*** *Responsable de l'équipe « Régulation des horloges circadiennes » de m'avoir accueilli dans son équipe. Les discussions scientifiques et le contact humain chaleureux m'ont été d'une grande utilité.*

Mes vifs remerciements s'adressent également au ***Dr. Mireille MASSON-PÉVET*** *pour vos encouragements, vos conseils pertinents, votre sympathie et votre grande gentillesse…. Qu´il me soit permis de vous témoigner ma très haute considération et ma profonde gratitude.*

A ***Mr. LE DOCTEUR PAUL PEVET*** *(DR CNRS, UDS, Strasbourg). Je voudrais vous exprimer tous mes sincères remerciements pour l'enthousiasme avec lequel vous avez guidé cette thèse. Pour votre amabilité et votre disponibilité à servir malgré vos multiples occupations. Votre sympathie et votre sens profond de l´humanité m´ont vivement impressionné. Il m´est particulièrement agréable de vous exprimer ma vive gratitude et ma profonde reconnaissance pour m´avoir accepté comme doctorante et pour vos conseils éclairés qui m´ont guidé et orienté pour mener à bien mon travail de thèse. Merci beaucoup cher Directeur.*

Je tiens à remercier le ***Professeur Khalid El ALLALI*** *pour m'avoir accueilli dans L'Unité d'Anatomie Comparée entre 2008-2012, tout d'abord comme stagiaire et après comme doctorante. Un grand merci pour votre disponibilité incomparable, votre soutien remarquable que vous m'avez apporté. Vous avez d'abord dirigé et défendu mon travail de Doctorat Vétérinaire (2008). Par la suite vous m'avez donné des responsabilités au sein de l'Unité d'Anatomie (participation à l'encadrement des étudiants 2éme et 3éme et 6éme année vétérinaire, gestion des projets scientifiques…) merci pour cette confiance et pour vos qualités humaines. Merci Professeur.*

Un grand Merci à ***Mr. Achaaban Mohamed-Rachid*** *pour les discussions scientifiques passionnées surtout sur la thermorégulation chez le dromadaire qui ont été pour moi une source d'inspiration.*

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

*Un grand Merci au **Dr. Jorge Mendoza**, pour avoir encadré presque à plein temps durant la moitié de la durée de ma thèse. Vous m'avez appris toutes les techniques dont j'avais besoin dans mon travail de thèse (usage du vibratome, cryostat, immunohistochimie, analyse des actogrammes…et la liste est encore longue). Merci d'avoir était toujours à l'écoute et pour tes discussions scientifiques impressionnantes. Merci pour ta grande disponibilité malgré tes occupations et ta bonne humeur.*

*Mes remerciements vont également au **Pr. Mohamed Piro.** Merci pour votre aide précieuse dans la réalisation de ce travail de thèse. Souvent vous m'avez fourni le matériel et les médicaments nécessaires pour la chirurgie d'implantation des iButtons chez les chamelles. Je vous en sais grée.*

*Je pense particulièrement à certaines personnes qui m'ont beaucoup aidé pour la réalisation de ce travail de Thèse : Professeurs Vétérinaires, **Mohamed Oukessou, Ahmed Ouhsine, Noursaid Tligui, Mohamed Bengoumi**. Merci également au **Professeur Khallaayoune Khalid** de m'avoir mis à ma disposition certains locaux de la clinique de parasitologie à l'IAV pour réaliser certaines expérimentations.*

*Je remercier également **Dr. Dominique Ciocca** pour la gestion et l'assistance avec les animaux afin de réalisé les protocoles expérimentaux dans les bonnes conditions. Mes vifs remerciements s'adressent également à l'ensemble des personnels du Chronobiotron **Anita Wulgué, Aurore Senser, Nicolas Lethenet** et plus particulièrement à mon très cher **Daniel Bonn**. Un très très grand merci à toi Daniel, tu étais toujours disponible pour m'accompagner durant tous les rythmes que j'ai effectués sur l'hamster d'Europe, merci pour ton soutien et ton encouragement quand je commence à m'endormir entre 03h00 et 05h00 du matin !!!*

*Un grand Merci au **Dr. Stephanie Monecke** pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta bonne humeur. MERCI d'avoir initié à la pinéalectomie et merci pour ta participation à la réalisation de 120 pinéalectomie réussi chez l''hamster d'Europe c'était un peu chaud mais bravo. Même après ton départ tu as resté disponible via ton email pour toute discussion scientifique, merci beaucoup Stef !*

*Je pense particulièrement à certaines personnes qui, à un moment donné, m'ont aidé et qui peut être sans le savoir ont participé activement à ce travail par les discussions et le contact humain que j'ai trouvé auprès d'eux : Un grand merci à **Ouafa Ait-Hmyed** et **Hanane Touati**. Merci beaucoup Hanane pour ton aide précieuse quand on a effectué 4 jours de suite de rythme pour la manip Rat.*

***Pawan, Firuzeh, Nemanja, Fernando**, I would like to thank you for friendship and good times we spent together. I wish you a continued success.*

*Merci **Cathérine, Nora, Felix** pour votre disponibilités et votre côté humain chaleureux.*

Merci enfin à tous les membres du Département de Neurobiologie des Rythmes à Strasbourg, et de l'Unité d'Anatomie Comparée de Rabat que j'ai peut être omis de citer et qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

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

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles Publiés Dans Un Journal à Comité De Lecture

1. El Allali K , Achaâban MR , **Bouâouda H** , Bothorel B , Piro M , Oukassou M , El Allouchi M , Malan A , Challet E , Ouassat M , Paul Pevet. (**2015**). Desert ambient temperature cycle is involved in circadian and thermal physiology of the camel (*Camelus dromedarius*). *ISOCARD*.

2. **Hanan Bouâouda**, Mohamed R. Achâaban, Mohammed Ouassat, Mohammed Oukassou, Mohamed Piro, Etienne Challet, Khalid El Allali and Paul Pévet. (**2014**). Daily regulation of body temperature rhythm in the Camel (*Camelus dromedarius*) exposed to experimental desert conditions. *Physiological Reports* 2(9), 1-16.

3. K. El Allali, M.R. Acâaaban, B. Bothorel, M. Piro, **H. Bouâouda**, M. El allouchi, M. Ouassat, A. Malan and P. Pévet. **(2013)**. Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol (304), 1044-1052.*

4. Achâaban M.R., Kerbal I., Baiss M., **Bouâouda H**., Ouassat M., Tligui N., Oukessou M. and El Allali K. (**2012**). The cerebral ventricular system of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*): anatomical aspect and CSF sampling techniques. *Journal of forum veterinary, 9th edition 53-57, 22 March.*

Communications orales

1. **H. Bouâouda**. Effet de la déshydratation et du stress thermique sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire « *Camelus dromedarius* ». Doctoriales de l'IAV Hassan II 17-19 Avril 2012, Rabat, Maroc.

2. **H. Bouâouda**. Effet de la déshydratation et du stress thermique sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire « *Camelus dromedarius* » : Vérification de l'hétérothermie. 4 éme école GDRI-Neuro, 18-21 Octobre 2011, Casablanca, Maroc.

Posters

1. **H. Bouâouda,** A. Malan, E. Challet, M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, K. El Allali and P. Pévet. A complex control of thermoregulation with a daily switching of poikilothermic and homeothermic phases in the camel (*Camelus dromedarius*). Neurex Annual Meeting, 25 Octobre 2012, Strasbourg. France.

2. **H. Bouâouda,** M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, M. Piro, A. Malan, P. Pévet et K. El Allali. Identification d'une régulation complexe avec alternance quotidienne de phase de poïkilothermie et d'homéothermie chez le dromadaire "Camelus dromedarius".Doctoriales de l'IAV Hassan II 17-19 Avril 2012, Rabat, Maroc.

3. **H. Bouâouda,** M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, F. Kichou, A. Malan, P. Pévet et K. El Allali. Effet de la déshydratation et du stress thermique sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire « *Camelus dromedarius* » : Confirmation de l'hétérothermie. 4 éme école GDRI-Neuro 18-21 Octobre 2011, Casablanca, Maroc.

4. Marmouzi I., Piro M., **Bouâouda H**., Bouayad H., Ouassat M., Achaaban MR., Ouichou A., et El Allali K. Rythme de la température corporelle chez le chien : démonstration de l'existence d'une horloge circadienne et entrainement par le cycle lumière-obscurité (*Canis lupus familiaris*). 4 éme école GDRI-Neuro, 18-21 Octobre 2011, Casablanca, Maroc.

5. **H. Bouâouda,** M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, F. Kichou, A. Malan, P. Pévet and K. El Allali. Effect of dehydration and heat stress on the circadian body temperature rhythm of camel (*Camelus dromedarius*): Confirmation for the presence of a heterothermy. European Biological Rhythms Society (EBRS), 20-26 Août 2011, Oxford, England.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS I
LISTE DES PUBLICATIONS IV
SOMMAIRE V
LISTE DES ABREVIATIONS IX
LISTE DES TABLEAUX X
LISTE DES FIGURES XI
AVANT-PROPOS 1
INTRODUCTION GÉNÉRALE 6
CHAPITRE I. DE L'HORLOGE CIRCADIENNE A L'INTEGRATION DU SIGNAL PHOTOPERIODIQUE 7
I. Introduction 8
II. L'horloge circadienne chez les mammifères 8
1. Les noyaux suprachiasmatiques : l'horloge biologique principale 8
2. Localisation et organisation neuroanatomique des noyaux suprachiasmatiques 9
2.1. Localisation des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus 9
2.2. Organisation histochimiques des SCN 11
2.3. Bases moléculaires des rythmes circadiens 14
3. La synchronisation journalière des SCN 17
3.1. Réception de l'information : voies afférentes 19
3.1.1. Synchronisation photique 20
3.1.2. Synchronisation non-photique 21
3.2. Distribution du message circadien : voies efférentes 22
3.2.1. Sorties humorales, nerveuses et hormonales des SCN ..... **Erreur ! Signet non défini.**
3.2.1.a. Les voies nerveuses 23
3.2.1.b. Les voies humorales 24
3.2.1.c. Les voies hormonales 24
III. Mélatonine : messager endocrine circadien et saisonnier 25
1. Synthèse de la mélatonine et son métabolisme 25
1.1. Innervation de la glande pinéale impliquée dans la synthèse de la mélatonine 25
1.2. Biosynthèse de la mélatonine 26
1.3. Régulation de la biosynthèse de la mélatonine 28
1.4. Catabolisme de la mélatonine 30
2. Sites d'action et fonctions physiologiques de la mélatonine 31
2.1. Les sites d'action de la mélatonine 31
2.2. Rôles physiologiques de la mélatonine 32
2.2.1. Rôle de la mélatonine dans le système circadien 32
2.2.1.a. Mélatonine endogène et rythmes circadiens 32
2.2.1.b. Mélatonine exogène et rythmes circadiens 34
2.2.2. Rôle de la mélatonine dans le système saisonnier 35
2.2.2.a. La reproduction saisonnière 36
2.2.2.b. Rôle de la mélatonine dans la traduction des effets du signal photopériodique sur la fonction de reproduction 37
IV. Les oscillateurs périphériques 38
V. Homéostasie et rythme circadien : exemple de la régulation de la température corporelle 39

CHAPITRE II. ENTRAINEMENT DE L'HORLOGE CIRCADIENNE CHEZ LE DROMADAIRE 43
I. Introduction 44
II. L'activité locomotrice ne génère pas le rythme de la Tb chez le dromadaire 45
III. Présence d'une horloge endogène chez le dromadaire 46
IV. Démonstration de l'entrainement par le cycle lumière-obscurité et par le cycle de la température ambiante 47
4.1. Entrainement du rythme de température corporelle par le cycle lumière-obscurité . 47
4.2. Entrainement du rythme de température corporelle par le cycle de température ambiante 50
4.2.1. Entrainement du rythme de température corporelle par le cycle de la température ambiante en lumière constante 50
4.2.2. Entrainement de l'horloge circadienne par le cycle de température ambiante en obscurité constante 52
4.2.2.a. Rythme de température corporelle 52
4.2.2.b. Rythme de mélatonine plasmatique 54
V. Peut-on considérer vraiment le rythme de la température corporelle comme une sortie d'horloge fiable pour étudier les propriétés circadiennes de l'horloge biologique ? 57
5.1. Rythme de température corporelle 58
5.2. Rythme de sécrétion de mélatonine 59
CHAPITRE III. OBJECTIFS DU TRAVAIL 63
MATÉRIEL ET MÉTHODES 66
I. Animaux 67
1. Dromadaires "Camelus dromedarius" 67
2. Hamsters d'Europe "Cricetus cricetus" 67
3. Rats Wistar "Rattus norvegicus" 68
II. Prélèvements et suivi des paramètres physiologiques chez le dromadaire 68
1. Prélèvements sanguins et suivi des paramètres physiologiques 68
1.1. Prélèvements sanguins effectués 68
1.1.1. Dosage de la protéinémie 68
1.1.2. Dosage de l'hémoglobine 69
1.1.2.a. Principe 69
1.1.2.b. Technique 69
1.1.3. Dosage de l'hématocrite 69
2. Suivi de la température corporelle et la température ambiante 70
2.1. Suivi de la température corporelle 70
2.1.1. Ibutton® : capteur électronique de la température 70
2.1.1.a. Description de l'Ibutton® 70
2.1.1.b. Programmation des Ibutton® 71
2.1.1.c. Choix du site d'implantation des Ibutton® 71
2.1.1.d. Protocole opératoire 72
2.2. Suivi de la température ambiante : étable expérimentale 73
3. Suivi du poids corporel 73
III. Prélèvements et suivi des paramètres physiologiques chez le hamster d'Europe et le rat 74
1. Prélèvements effectués chez le hamster d'Europe et le rat 74
1.1. Prélèvements de cerveaux 74
1.2. Pinéalectomie chez le hamster d'Europe 75
IV. Immunohistochimie 76
1. Principe 76

2. Immunohistochimie : simple marquage 76
3. Immunohistochimie : double marquage 77
V. Analyses statistiques 78
RÉSULTATS 79
Chapitre IV. IDENTIFICATION D'UNE REGULATION COMPLEXE DU SYSTEME DE THERMOREGULATION CHEZ LE DROMADAIRE « *Camelus dromedarius* » 80
I. Introduction 81
1. Stratégies d'adaptation du monde animal au milieu aride 81
2. Particularités physiologiques du dromadaire en relation avec son adaptation aux conditions du désert 82
2.1. Aspects d'adaptation du dromadaire à la chaleur 82
2.1.1. Comportement adaptatif et particularités de la robe et de la peau du dromadaire 82
2.1.2. La bosse du dromadaire, une adaptation anatomique 83
2.1.3. Refroidissement sélectif du cerveau chez le dromadaire 83
2.2. Aspects d'adaptation du dromadaire à la sous alimentation 84
2.3. Aspects d'adaptation du dromadaire à la déshydratation 85
II. Facteurs de régulation du système de thermorégulation chez le dromadaire 88
1. Effet de la déshydratation et du stress thermique sur le rythme de la Tb chez le dromadaire : état d'hétérothermie (expérience 1) 88
1.1. Procédure expérimentale 88
1.1.1. Animaux 88
1.1.2. Protocol expérimental 88
1.2. Analyses statistiques 89
1.3. Résultats 90
1.3.1. Rythme de la température corporelle 90
1.3.2. Effets de la déshydratation et du stress thermique sur plusieurs paramètres physiologiques chez le dromadaire 98
1.3.2.a. Poids corporel 98
1.3.2.b. Taux des protéines totales plasmatiques 100
1.3.2.c. Taux d'hémoglobine 101
1.3.2.d. Taux d'hématocrite 102
1.3.2.c. Prise alimentaire 103
2. Effet de la diminution progressive de l'alimentation sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire (expérience 2) 104
2.1. Procédure expérimentale 105
2.1.1. Animaux 105
2.1.2. Protocol expérimental 105
2.2. Analyses statistiques 105
2.3. Résultats 106
2.3.1. Rythme de la température corporelle 106
2.3.2. Effets de la diminution progressive de l'alimentation et du stress thermique sur plusieurs paramètres physiologiques chez le dromadaire parfaitement hydraté 112
2.3.2.a. Poids corporel 112
2.3.2.b. Autres paramètres 114
III. Discussion 114
Chapitre V. INTEGRATION DU SIGNAL PHOTOPERIODIQUE CHEZ LE HAMSTER D'EUROPE : MISE EN EVIDENCE D'UNE VOIE INDEPENDANTE DE LA MELATONINE 120
I. Introduction 121

II. Analyses des données 130
III. Nature de l'expression nocturne de c-Fos dans l'ARC 131
3.1. Dispositif expérimental 131
3.2. Résultats 132
IV. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe 136
4.1. Dispositif expérimental 136
4.2. Résultats 137
4.2.1. Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe intacts maintenus en SP 137
4.2.2. Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe intacts maintenus en LP 139
V. Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe pinéalectomisés 142
5.1. Dispositif expérimental 142
5.2. Résultats 143
5.2.1. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en photopériode accélérée courte 143
5.2.2. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en photopériode accélérée longue. 144
VI. Discussion 146
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 159
ANNEXES 199

LISTE DES ABREVIATIONS

AA-NAT : Aryl-alkylamine N-acétyltransférase
AC : Adénylate cyclase
ACh : Acétylcholine
ADN: Acide Désoxyribonucléique
AgRP: Agouti Related Protein
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARC : Noyau arqué
ARNT: Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator
aSP : Photopériode accélérée courte
AVP : Arginine Vasopressin
bHLH/PA: Basic Helix Loop Helix/ PER ARNT SIM
Bmal1: *Brain and Muscle Arnt Like protein1*
CAL: Calbindine
CART : Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CREB : Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (cAMP-response element binding Protein)
CNK : Cyanure de potassium
***Clock*:** *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*
***Ccg* :** Gènes contrôlés par l'horloge
DAAA : Décarboxylase des acides aminés aromatiques
DD : Obscurité constante
Dec: *Human protein Differentially Expressed in Chondrocytes*
DMH : Dorsomédial hypothalamique
dmSCN : Dorsomédiane des SCN
ENK: Enképhalines
GA : Galanine LL : lumière constante
GABA : Gamma-Amino Butyric acid
GHT : Tractus géniculo-hypothalamique
GLU: Glutamate
GnRH : *Gonadotropin Releasing Hormone*
GRP : Neurones libérant la gastrine
Hb : Hémoglobine
HIOMT : Hydroxyindole O-méthyltransférase
Ht : Hématocrite
5-HT: Sérotonine
5-HTP : 5-hydroxy-tryptophane
IGL : Inter-géniculés latéraux.
IpCGR : Cellules ganglionnaire à melanopsine
IML : Intermédiolatérale de la moelle épinière
LH : Hypothalamus latéral
MCH : Hormone concentratrice de la Mélanine
Met-enk: Methionine-enképhaline
MLT : Mélatonine
5-MTP : 5-méthoxytryptophane
$_{M}$SPV : Médiale de la zone sub-paraventriculaire
α MSH : l'alpha-mélanocyte
NA : Noradrénaline
NAS : N acétylsérotonine
NOS : Oxyde nitrique synthase
NPY: Neuropeptide Y
NT : Neurotensine
NTS : Noyau du faisceau solitaire
8-OH-DPAT :8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin
OT: Ocytocine
OVLT : Organum vasclosum de la lamina terminalis
PACAP : Polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire
PAF : Paraformaldéhyde
PB : Tampon phosphate
PBS : Tampon phosphate salin
Per: *Period* PKA : protéine kinase A
PFA : Aire périfornicale
PHI : Peptide histidine isoleucine
PK2 : Prokinéticine type 2
PKC : Protéine kinase C
POA : Aire préoptique
POMC: Pro-Opio-Mélanocortine
PT : Protéines totales
PVN : Paraventriculaires de l'hypothalamus
PVT : Paraventriculaire thalamique
RHT : Tractus rétino-hypothalamique
Rmp : Rotation Par Minute
***Rorα*:** *Retnoid-related Orphan Receptor α*)
SCG : Ganglions cervicaux supérieurs
SCN : Noyaux suprachiasmatiques
SCNce : SCN central
SIM: Simple Minded
So : Supra-optique
SON : Noyaux supraoptique
SP : Photopériode courte
SPV : Sub-paraventriculaire
SS: Somatostatine
Tb : Température corporelle
Tb_{min} : Températures minimales
Tb_{max} : Températures maximales
TGF-α: Transforming Growth Factor alpha
TH: Tyrosine hydroxylase
TRH: Thyréostimuline
TPOH : Tryptophane hydroxylase mitochondriale de type 1
Trp : Tryptophane
VIP : Vasoactive Intestinal Polypetide
vlSCN : Ventrolatérale des SCN
3V : Troisième ventricule

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Les types de rythmes biologiques classés selon leur période **p 2.**

Tableau 2 Analyse du moment de la demi-montée (t1) et de la demi-descente du pic nocturne de la mélatonine sous les conditions de l'expérimentation 5 **p 56.**

Tableau 3 Analyse du moment de la demi-montée (t1) et de la demi-descente du pic nocturne de la mélatonine sous les conditions de l'expérimentation 6 **p 61.**

Tableau 4 La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie double **p 78.**

Tableau 5 Retard de phase (en minutes) entre le moment de transition nuit-jour et le moment du maximum du Tb au cours de l'expérience 1 **p 94.**

Tableau 6 Pourcentage de perte de poids corporel de chaque chamelle après 19 jours de privation hydrique durant l'expérience1 **p 99.**

Tableau 7 Suivi des taux d'hématocrite de chaque chamelle durant les trois phases de l'expérience 1 p **102.**

Tableau 8 Pourcentage de perte de poids corporel de chaque chamelle après 19 jours de diminution progressive de l'alimentation durant l'expérience 2 **p 113.**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Illustration des termes de la chronobiologie pour caractériser un rythme biologique **p 2**.
Figure 2 Schématisation générale des propriétés d'une horloge biologique **p 4**.
Figure 3 Enregistrement du rythme de l'activité générale locomotrice chez des hamsters après destruction bilatérale des SCN **p 9**.
Figure 4 Localisation des SCN chez le hamster doré **p 10**.
Figure 5 Représentation schématique de l'organisation neuronale des SCN du hamster **p 12**.
Figure 6 Représentation schématique des projections réciproques entre les différentes populations neuronales qui s'établissent au sein du SCN du rat **p 13**.
Figure 7 L'horloge biologique moléculaire chez les mammifères **p 16**.
Figure 8 Effet du créneau lumineux sur l'activité locomotrice chez Arvicanthis niloticus **p 18**.
Figure 9 Courbes de réponse de phase pour des stimulations photiques (points blancs) et non photiques (points noirs) **p 18**.
Figure 10 Principales voies afférentes aux SCN **p 19**.
Figure 11 Les efférences majeures des SCN **p 23**.
Figure 12 Représentation en coupe sagittale de la voie nerveuse polyneuronale qui transmet les informations photopériodiques de la rétine à la glande pinéale **p 26**.
Figure 13 Métabolisme des indolamines dans la glande pinéale et voie de biosynthèse de la mélatonine **p 28**.
Figure 14 Transduction du signal noradrénergique induisant la synthèse de mélatonine dans les pinéalocytes **p 29**.
Figure 15 Actogramme représentant l'entrainement du rythme de l'activité locomotrice par l'administration quotidienne de mélatonine exogène **p 35**.
Figure 16 Rythme journalier de la température rectale des chamelles en absence d'activité locomotrice **p 45**.
Figure 17 Rythme moyen de la température rectale des chamelles mantenues dans une expérience mettant en œuvre des conditions constantes **p 46**.
Figure 18 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience démontrant l'entrainement du rythme de la Tb par le cycle LD **p 48**.
Figure 19 Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase II et III de l'expérience démontrant un entrainement du rythme de Tb par le cycle LD **p 49**.
Figure 20 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience démontrabt un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb sous une lumière constante **p 51**.
Figure 21 Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase II, III et IV de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb en LL **p 52**.
Figure 22 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb en DD **p 53**.
Figure 23 Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase III et IV de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb en DD **p 54**.
Figure 24 Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chamelles du groupe III sous les conditions de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge en DD **p 55**.
Figure 25 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience étudiant lequel des deux synchroniseurs cycle LD et Ta est puissant **p 58**.
Figure 26 Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase II, III et IV de l'expérience étudiant leuqel des deux cycles LD et Ta est puissant **p 59**.
Figure 27 Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chamelles du groupe III sous les conditions de l'expérience étudiant leuqel des deux synchroniseurs cycle LD et Ta est puissant **p 60**.

Figure 28 Ibutton® DS1922L fabriqué par Dallas Semiconductor, USA et son lecteur externe **p71**.
Figure 29 Implantation des Ibuttons® dans le flanc gauche d'une chamelle **p 73**.
Figure 30 Schématisation des mensurations barymétriques utilisées pour l'estimation du poids corporel chez le dromadaire **p 74**.
Figure 31 Schématisation du principe d'immunohistochimie **p 76**.
Figure 32 Implications des veines superficielles de la tête du dromadaire dans le refroidissement sélectif du cerveau **p 84**.
Figure 33 Stratégies adoptées par le dromadaire pour supporter la chaleur du désert et la pénurie de l'eau **p 86**.
Figure 34 Comparaison du système de thermorégulation chez le dromadaire avec d'autres mammifères **p 87**.
Figure 35 Evolution du rythme de la température corporelle d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expéri+ence1 **p 91**.
Figure 36 Evolution du rythme moyen de la température corporelle des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1 **p 91**.
Figure 37 Amplitude de la température corporelle des six chamelles et de leur moyenne placées sous les conditions de l'expérience 1 **p 92**.
Figure 38 Evolution du retard de phase du pic du rythme de la Tb par rapport au moment de transition obscurité-lumière au cours de l'expérience 1 **p 93**.
Figure 39 Comparaison de la température corporelle minimale et maximale des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1 **p95**.
Figure 40 Courbes de 24 heures de la température corporelle en fonction de la température ambiante d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience 1 **p97**.
Figure 41 Courbes de 24 heures de la température corporelle en fonction de la température ambiante des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1 **p 98**.
Figure 42 Evolution du poids corporel des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1 **p 99**.
Figure 43 Effet de la déshydratation sur le poids corporels des chamelles durant l'expérience 1 **p 100**.
Figure 44 Effet de la déshydratation sur le taux plasmatique des protéines totales des chamelles durant l'expérience 1 **p 101**.
Figure 45 Effet de la déshydratation sur le taux d'hémoglobine des chamelles durant l'expérience 1 **p 102**.
Figure 46 Effet de la déshydratation sur le taux d'hématocrite des chamelles durant l'expérime 1 **p 103**.
Figure 47 Evolution de la prise alimentaire des six chamelles durant l'expérience 1 **p 104**.
Figure 48 Evolution du rythme de la température corporelle d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience 2 **p 106**.
Figure 49 Evolution du rythme de la température corporelle des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2 **p 107**.
Figure 50 Comparaison de la température corporelle maximale et minimale des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2 **p 108**.
Figure 51 Courbes de 24 heures de la température corporelle en fonction de la température ambiante d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience 2 **p 109**.
Figure 52 Comparaison des rythmes de températures corporelles moyennes des six chamelles, enregistrés durant l'expérience 1 et 2 **p 110**.
Figure 53 Amplitude de la température corporelle de chaque chamelle et des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2 **p 111**.
Figure 54 Evolution du poids corporel des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2 **p 113**.
Figure 55 Effet de la diminution progressive de l'alimentation sur le poids corporel des chamelles durant l'expérience 2 **p 113**.
Figure 56 Superposition du rythme moyen de Tb des 6 chamelles avec le cycle de Ta durant l'expérience 1 **p 115**.

Figure 57 Evolution de la taille des testicules et du poids corporel chez des hamsters d'Europe maintenus en conditions constantes de photopériode longue (LD 16:08) et de température ambiante **p 124.**
Figure 58 Evolution de la taille des testicules et du poids corporel chez un hamster d'Europe intact et un autre pinéalectomisé, tous les deux maintenus sous des conditions constantes de photopériode longue (LD 16:08) et de température ambiante **p 124**.
Figure 59 Entrainement des rythmes circannuels chez des hamsters d'Europe maintenus sous un régime de photopériode accélérée **p 125**.
Figure 60 Représentation schématique des hypothèses 1 et 2 postulées afin d'essayer d'expliquer la voie d'intégration du signal photopériodique en absence de mélatonine **p 126**.
Figure 61 Expression de c-Fos dans les neurones de l'hypothalamus médio basal chez le rat **p 127**.
Figure 62 Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones du noyau arqué **p 129**.
Figure 63 Contrôle de la reproduction par les neurones Kiss-1 du noyau arqué **p 130**.
Figure 64 Coupes frontales de l'hypothalamus de l'hamster d'Europe colorées au crézyl violet **p 130**.
Figure 65 Les conditions alimentaires et les heures de sacrifices des rats Wistar maintenus sous une photopériode LD 12:12 **p 132**.
Figure 66 Expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué chez des rats Wistar **p 133**.
Figure 67 Visualisation de l'immunoréactivité c-Fos dans les neurones de l'ARC des rats Wistar **p 134**.
Figure 68 Co-expression de c-Fos et β-endorphine dans les neurones de l'ARC des rats Wistar **p 136**.
Figure 69 Les conditions lumineuses et les heures de sacrifices des hamsters d'Europe maintenus sous différentes conditions de photopériode **p 137.**
Figure 70 Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe intacts et maintenus sous une photopériode courte LD 10 :14 **p 138**.
Figure 71 Expression de c-Fos dans les neurones du DMH chez des hamsters d'Europe maintenus en SP **p 139**.
Figure 72 Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe intacts maintenus sous une photopériode longue : LD 16 :08 **p 140**.
Figure 73 Expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué chez des hamsters d'Europe maintenus en SP et LP **p 141**.
Figure 74 Les conditions lumineuses et les heures de sacrifices des hamsters d'Europe maintenus sous différentes conditions de photopériode **p 143**.
Figure 75 Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus sous une courte photopériode accélérée **p 144**.
Figure 76 Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus sous une photopériode accélérée longue **p 145**.
Figure 77 Expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en SP et LP **p 146**.
Figure 78 Schématisation des voies prposées pour l'intégration du signal photopériodique dans les neurones du noyau arqué afin de contrôler certaines fonctions physiologiques saisonnières toute en passant par les SCN p 157**.**

AVANT-PROPOS

La Terre, notre vaisseau spatial, tourne autour du soleil en 12 mois (365.25 jours) suivant une orbite elliptique, et sur elle-même (23h56 min) selon un axe incliné de 23.5° par rapport à la perpendiculaire au plan d'écliptique. Sa rotation autour d'elle-même et sa révolution autour du soleil génère respectivement l'alternance régulière des jours et des nuits selon un rythme de 24 heures et la ronde annuelle des saisons. Par conséquent, la photopériode, la température ambiante, l'humidité, les précipitations, la disponibilité alimentaire…présentent des variations cycliques. La plupart des êtres vivants, qu'ils soient sur terre, en mer ou dans l'air, sont périodiquement soumis à des changements journaliers et saisonniers de ces facteurs environnementaux. Pour survivre, les organismes doivent anticiper ces modifications périodiques et prédictibles qui sont beaucoup plus spectaculaires dans les régions tempérées et les zones septentrionales, et y adapter leurs fonctions physiologiques, biologiques et comportementales. Chez les mammifères, les mécanismes fonctionnels impliqués dans les activités biologiques cycliques, qui existent depuis les bases moléculaires de la vie jusqu'aux fonctions physiologiques les plus intégrées, résultent d'un système interne nommé horloge(s) biologique(s). Ce système permet à l'organisme de prédire et de se préparer à l'avance aux variations physiques de l'environnement liées directement au cycle jour/nuit et à l'alternance des saisons. De là surgit l'importance de la synchronisation entre les **rythmes biologiques** et les variations périodiques de l'environnement pour l'intégration de l'être vivant dans un environnement gouverné par les facteurs astronomiques.

En terme simple, un rythme biologique correspond à la variation cyclique d'une fonction spécifique d'un être vivant, dont la période peut s'ajuster sur les facteurs externes. Plus précisément, un **rythme biologique** se définit comme une suite de variations physiologiques statistiquement significatives, déterminant des **oscillations** de forme reproductible en fonction du temps. Il s'agit donc d'un phénomène périodique et prévisible permettant à l'organisme de s'adapter et d'anticiper les changements physiques de l'environnement (Boissin & Canguilhem, 1998).

Les **rythmes biologiques** sont caractérisés par plusieurs paramètres : **1) la période** (c'est l'intervalle de temps séparant deux maxima, nommés **acrophases**, ou deux minima, nommés **bathyphases « Nadir »**), **2) la fréquence** (inverse de la période), **3) la phase** (permet de situer la position de la variable dans le cycle par rapport à une origine de référence), **4) l'amplitude** (différence entre le maxima, ou le minima, et la moyenne) et **5) le niveau moyen**

«*Mesor*» **(Figure1)**. Les rythmes biologiques peuvent être classés en fonction de leur période. On distingue alors, les rythmes **circannuels**, les **rythmes circadiens**, les **rythmes ultradiens** et les **rythmes infradiens** (voir **Tableau 1**). Une autre classification en termes de fréquence, également basée sur la périodicité a été distinguée : des rythmes de hautes fréquences, de moyennes fréquences et de basses fréquences.

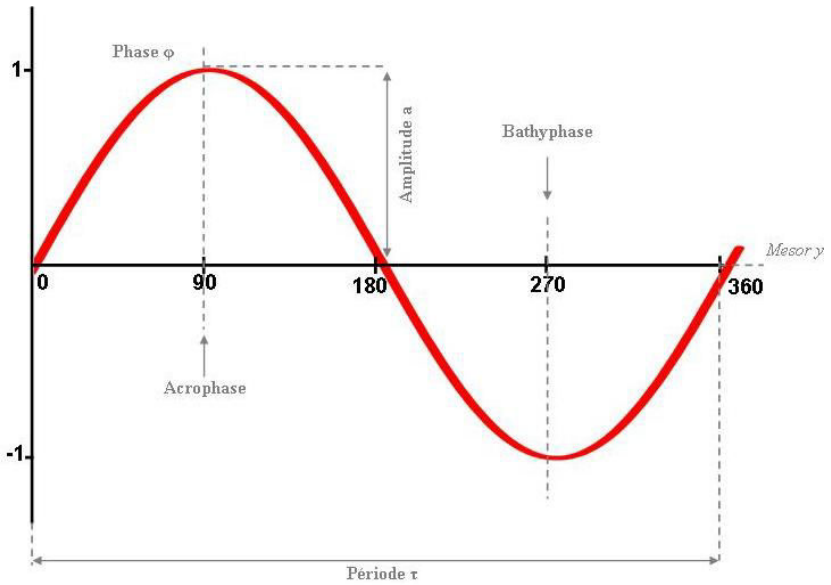

Figure 1 : Illustration des termes de la chronobiologie pour caractériser un rythme biologique.

(Boissin & Canguilhem, 1998)

Tableau 1 : Les types de rythmes biologiques classés selon leur période

	Période	***Exemple***
Circannuel	Une année	Reprodution, migration …
Infradien	> 24 heures	Cycle menstruel de la femme
Circadien	≈ 24 heures	Température corporelle (Tb)
Ultradien	< 20 heures	Rythme cardiaque

(Boissin & Canguilhem, 1998)

Du rythme circadien à l'horloge biologique

L'observation des rythmes biologiques est très ancienne. La première description d'un rythme journalier remonte à 325 avant J.C. grâce au naturaliste grec Androsthène de Thasos qui avait remarqué que les feuilles de Mimosa ou Tamarinier « *Tamarindus indicus* » occupaient des positions différentes la nuit et le jour. Cependant, ce n'est qu'en 1729 que l'astronome, physicien, géologue, mathématicien et botaniste Jean-Jacques d'Ortous de Mairan publia des observations très importantes pour l'évolution de la chronobiologie sur un rythme d'ouverture (le matin) et de repli (le soir) des feuilles de la Sensitive « *Mimosa*

Pudica » indépendant du cycle jour/nuit puisqu'il perdure en obscurité constante (DD). En 1751, le naturaliste suédois Carl von Linné étudia les moments d'ouverture et de reploiement des pétales de diverses espèces de fleurs et conçut une « horloge florale -voir le début du document» en cultivant de manière ordonnée des fleurs qui ouvraient ou fermaient leurs pétales à des moments précis de la journée. Malgré ces observations, les progrès dans le domaine de la chronobiologie furent lents et ce n'est qu'en 1939 que Johnson observa la persistance d'une activité locomotrice rythmique chez la souris maintenue en conditions constantes. Quelques années plus tard la notion d'**endogénie** et d'**horloge biologique** surgit dans le domaine de la chronobiologie. Parmi les rythmes biologiques les plus étudiés, on trouve les rythmes circadiens. Il convient de bien distinguer rythme **circadien** et **nycthéméral** [1]: ce dernier désigne un rythme qui a cours dans des conditions d'alternance jour/nuit, mais qui disparaît en conditions constantes.

Trois propriétés définissent clairement les **rythmes circadiens**[2]: 1- **persistance des oscillations dans des conditions constantes** (généralement en DD ou en lumière constante (LL), à une température ambiante constante et d'autres facteurs fixes exemple des facteurs sociaux), 2- la **compensation thermique** qui signifie que la période est peu affectée par la température (dans les limites physiologiques) et 3- **l'entrainement de l'horloge endogène** par exemple par le cycle lumière/obscurité (Dunlap *et al.*, 2004; Johnson & Egli, 2014). L'existence des rythmes circadiens implique alors l'existence d'une horloge endogène responsable de la genèse de ces rythmes. Les physiologistes définissent un système comme étant une horloge si, et seulement si, il répond à certaines règles (**Figure 2**). Une horloge biologique est un système qui **perçoit** et **intègre** des informations relatives à un ou plusieurs stimuli (synchroniseurs –*zeitgeber*-). Elle est également capable de **générer** et d'une manière endogène (en l'absence de synchroniseurs) des oscillations auto-entretenues selon une période stable nommée « période de libre cours ». Via des voies nerveuses efférentes, l'horloge principale est capable de **distribuer** le signal circadien à de multiples structures périphériques (oscillateurs périphériques) capables elles-mêmes de générer des rythmes ou directement à des effecteurs neuroendocrines qui transforment le signal en une réponse endocrine.

[1] De *nux*, *nuktos* : nuit et *hemera* : jour. Unité de temps de 24 heures comprenant un jour et une nuit
[2] *circa*: autour et *dies:* jour.

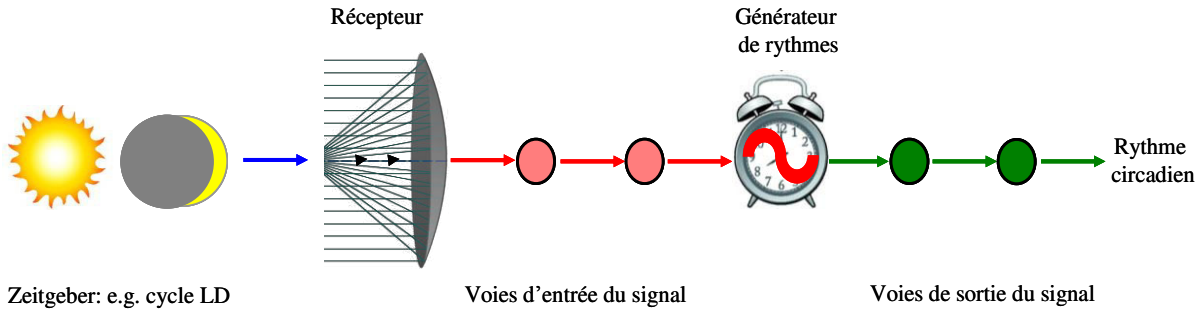

Figure 2 : Schématisation générale des propriétés d'une horloge biologique.

Modifié d'après Roenneberg and Merrow (2003)

Du rythme saisonnier à l'horloge circannuelle

En plus des rythmes circadiens, les organismes vivants expriment plusieurs fonctions physiologiques et comportementales qui varient selon les saisons. Notamment, la reproduction, la migration, la prise alimentaire, l'hibernation, la masse corporelle, la thermorégulation, les comportements sociaux affiliatifs et agonistes, la mue du pelage, la sécrétion des hormones et la concentration des neurotransmetteurs dans le cerveau (Walker *et al.*, 1980; Heldmaier & Steinlechner, 1981; Bartness & Wade, 1985; Buijs *et al.*, 1986; Ferkin & Zucker, 1991; Goldman & Nelson, 1993; Turek & Van Cauter, 1994). Ces fonctions physiologiques, biologiques et comportementales, limitées à une seule période de l'année ne peuvent pas débuter instantanément. Leur déclenchement exige, en effet, une longue préparation endocrinienne, métabolique ou même comportementale, induite par des mécanismes internes, eux-mêmes inféodés aux variations périodiques du milieu. Par conséquent, il est indispensable que les animaux aient la possibilité de s'orienter dans le temps pour pouvoir ainsi déterminer la période propice au cours de laquelle les facteurs environnementaux atteindront un niveau compatible avec l'installation du phénomène physiologique saisonnier. Les changements dans la photopériode sont le marqueur le plus fiable pour déterminer la période de l'année (Gorman et *al.*, 2001).

Trois types de rythmes saisonniers ont été distingués (Zucker et *al.*, 1991). **Le type I** correspond à des rythmes contenant une composante endogène mais qui ne se prolonge pas au-delà d'un seul cycle en absence de facteurs environnementaux. Ils sont communs chez les mammifères vivants dans les zones tempérées, dont la durée de vie est courte, ainsi que chez les mammifères boréals. Leur base neuroendocrine a été élaborée en détail dans plusieurs études (Nelson *et al.*, 1990; Bartness *et al.*, 1993; Bronson & Heidaran, 1994; Turek & Van Cauter, 1994). **Le type II** correspond à des rythmes complètement endogènes, persistant pendant deux ou plusieurs cycles avec une période proche de 12 mois chez des individus

maintenus en conditions constantes. Il s'agit de vrais rythmes circannuels, que l'on retrouve chez les espèces dont la durée de vie est longue comprenant les rongeurs, les carnivores, les ongulés, les chauves-souris et les primates. **Le troisième type** correspond aux rythmes dépourvus de composantes endogènes mais qui reflètent des manifestations périodiques de l'environnement et sont illustrés, par exemple chez l'Homme, par des réactions allergiques saisonnières à la production épisodique du pollen.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Chapitre I : De l'horloge circadienne à l'intégration du signal photopériodique.

Chapitre II : Entrainement de l'horloge circadienne chez le dromadaire « *Camelus dromedarius* ».

Chapitre III : Objectifs du travail.

CHAPITRE I. DE L'HORLOGE CIRCADIENNE A L'INTEGRATION DU SIGNAL PHOTOPERIODIQUE

I. Introduction

II. L'horloge circadienne chez les mammifères

- ✓ Les noyaux suprachiasmatiques : l'horloge biologique principale
- ✓ Localisation et organisation neuroanatomique des noyaux suprachiasmatiques
- ✓ La synchronisation journalière des SCN

III. Mélatonine : messager endocrine circadien et saisonnier

- ✓ Synthèse de la mélatonine et son métabolisme
- ✓ Sites d'action et fonctions physiologiques de la mélatonine

IV. Les oscillateurs périphériques

V. Homéostasie et rythme circadien : exemple régulation de la température corporelle

I. Introduction

L'organisation des processus biologiques, physiologiques et comportementaux en relation étroite avec le cycle lumière/obscurité est une fonction fondamentale de la plupart des êtres vivants. C'est l'alternance lumière/obscurité qui permet la remise à l'heure « astronomique » de l'horloge endogène pour qu'elle fonctionne exactement en harmonie avec le cycle jour/nuit. L'intégration de la photopériode nécessite au préalable une mesure exacte de la durée d'éclairement quotidienne (photophase). En effet, seule une lecture journalière de la photophase sur une période de 24 heures permettra alors de mesurer les variations annuelles de la durée des jours. L'utilisation d'une horloge circadienne synchronisée à 24 heures par le cycle jour/nuit constitue par conséquent la base du système de mesure de la photopériode chez les organismes vivants. L'horloge circadienne est à l'origine des mécanismes physiologiques d'adaptation et d'anticipation en transmettant l'information photopériodique au reste de l'organisme. **L'ensemble des structures impliquées dans la perception, l'intégration, la transmission et la modulation de cette information temporelle journalière constitue le système circadien.**

II. L'horloge circadienne chez les mammifères

1. Les noyaux suprachiasmatiques : l'horloge biologique principale

L'identification de l'horloge biologique principale des mammifères résulte d'une approche lésionnelle. Il y a un peu plus de 40 ans, deux équipes ont trouvé simultanément qu'une ablation d'une structure hypothalamique, les noyaux suprachiasmatiques (SCN), entraîne chez le rat une arythmie de certaines fonctions comportementales ou physiologiques : une perte de la rythmicité de l'activité locomotrice, de la prise de boisson (Stephan & Zucker, 1972) et la perte du contrôle central du rythme de sécrétion de corticostérone (Moore & Eichler, 1972). Suite à ces découvertes princeps, de nombreux auteurs montrèrent chez d'autres espèces que les SCN jouaient un rôle dans la genèse des rythmes circadiens. Plus tard, la greffe de SCN fœtaux chez des animaux préalablement rendus arythmiques par lésions de cette structure (Lehman et *al.*, 1987) a montré que le rythme de l'activité locomotrice et de la prise d'eau étaient rétablis, ce qui a permis de valider le rôle des SCN dans la genèse des rythmes et le contrôle rythmique des fonctions physiologiques (**Figure 3**).

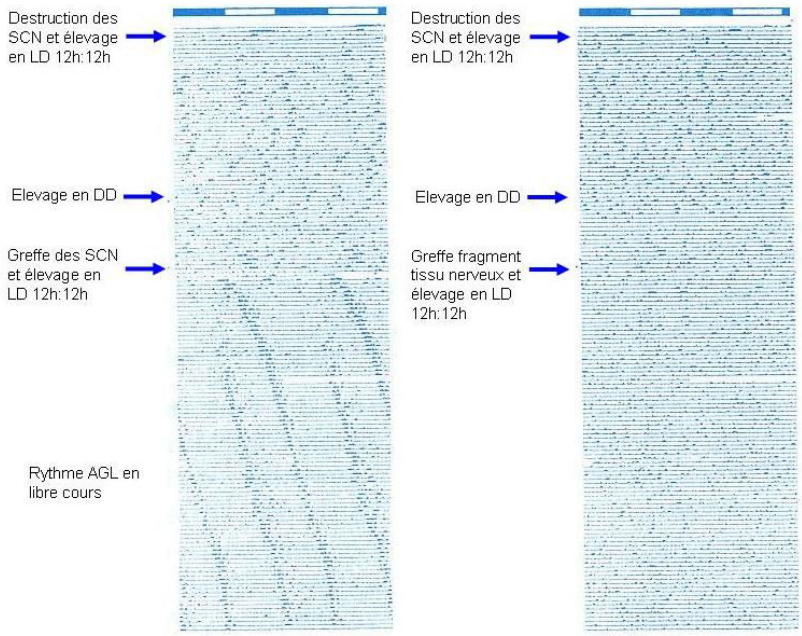

Figure 3 : Enregistrement du rythme de l'activité générale locomotrice chez des hamsters après destruction bilatérale des SCN.

Au début des enregistrements, les animaux sont soumis à des alternances lumière-obscurité (LD), ensuite ils sont élevés à l'obscurité permanente (DD). Dans ces deux conditions, après destruction des SCN, on note sur les deux enregistrements la disparition du rythme circadien de l'activité générale locomotrice. Les auteurs ont ensuite procédé à la greffe d'un fragment des SCN d'origine fœtale (à gauche) ou bien d'un fragment de tissu nerveux prélevé au niveau du cervelet (à droite). Il est constaté que seule la greffe du SCN permet le rétablissement du rythme circadien de l'activité générale locomotrice. Celui-ci n'est néanmoins pas synchronisé sur le rythme des alternances lumière-obscurité. AGL : activité générale locomotrice ; SCN : noyaux suprachiasmatiques.

(Lehman et *al.*, 1987) d'après Boissin et Cangruilhem (1998).

Les premiers travaux réalisés *in vivo* chez le rat ont permis de démontrer que les neurones des SCN présentaient une activité électrique rythmique avec une acrophase diurne (Inouye & Kawamura, 1979). La même étude a montré que cette rythmicité était maintenue lorsque les SCN étaient expérimentalement isolés des structures environnantes. Quelques années plus tard, l'enregistrement de l'activité électrique rythmique des neurones *in vitro* a pu confirmer le caractère intrinsèque des oscillations observées et la nature endogène de l'horloge principale (Green & Gillette, 1982; Groos & Hendriks, 1982).

2. Localisation et organisation neuroanatomique des noyaux suprachiasmatiques

2.1. Localisation des noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus

Le SCN est une structure paire et symétrique, située de part et d'autre du troisième ventricule (3V) (Klein et *al.*, 1991), juste au-dessus du chiasma optique, ce qui lui a valu son nom (Dunlap et *al.*, 2004) **(Figure 4).** Ils s'étendent depuis l'hypothalamus antérieur jusqu'à l'aire rétrochiasmatique (Inouye & Shibata, 1994; Ibata *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2002).

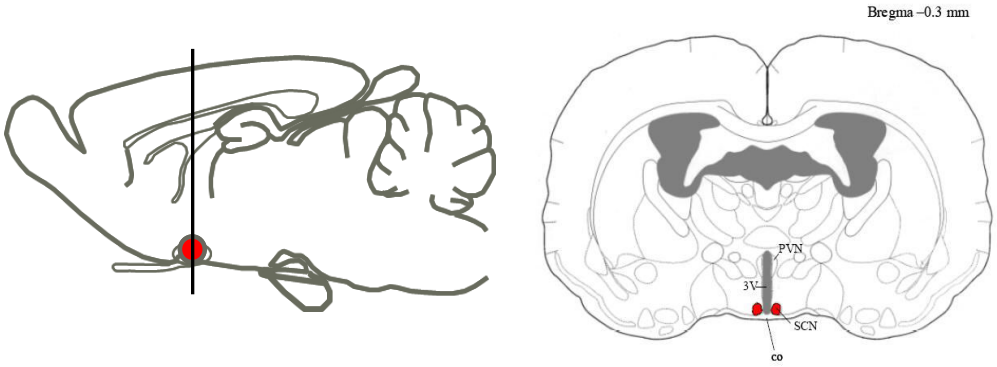

Figure 4 : Localisation des SCN chez le hamster doré.

3V : troisième ventricule ; co : chiasma optique ; PVN : noyaux paraventriculaires hypothalamiques, SCN : noyaux suprachiasmatiques.

Modifié d'après Morin et Wood (2001)

L'organisation globale semble comparable chez les mammifères, qu'ils soient diurnes ou nocturnes, qu'ils soient photopériodiques ou non (Mai *et al.*, 1991; Smale & Boverhof, 1999; Abrahamson & Moore, 2001). Chez le rat (Moore, 1983; van den Pol & Tsujimoto, 1985), le hamster (Card & Moore, 1984), le singe et l'Homme (Moore, 1992), les SCN sont subdivisés en deux régions distinctes en fonction du contenu neuro-chimique de leurs projections afférentes ou efférentes (van den Pol, 1980 ; Leak *et al.*, 1999) : une région ventrolatérale des SCN (vlSCN) et une région dorsomédiane des SCN (dmSCN). Cette nomenclature a été initialement introduite par Miller et ses collaborateurs (1996) pour décrire les SCN chez le hamster **(Figure 5)**.

Par analogie et pour éviter des confusions, la même nomenclature a été utilisée par la suite pour décrire les SCN chez les autres espèces, même si la localisation anatomique précise des deux parties des SCN diffère du modèle hamster (Morin & Allen, 2006). Les SCN de la Souris prennent une position verticale en forme d'une goutte d'eau alors qu'ils sont plus ou moins elliptiques chez le hamster et beaucoup plus aplatis aux pôles chez le rat. Chez ce dernier, l'axe médio-latéral du SCN est plus large que l'axe dorso-ventral comparativement à la souris et au hamster. Une caractéristique essentielle, qui apparait commune au rat, à la souris et au hamster, est la présence d'un sub-noyau SCN central (SCNce) (Morin et *al.*, 2006).

Chez le rat adulte, chaque noyau mesure environ 300 µm suivant les axes médiolatéral et dorsoventral et 700 µm suivant un axe rostro-caudal (Ibata et *al.*, 1999). Ces dimensions ont été estimées chez le hamster doré à 300 µm, 300 µm et 600 µm respectivement (Morin & Wood, 2001). Chez le dromadaire, le SCN est une structure très longue qui s'étend sur 9.55 mm. Il est subdivisé en 3 parties : le SCN rostral, le SCN nu et le SCN rétrochiasmatique (El

Allali, 2009). Le SCN rostral est présenté sous forme de tubercules sous *l'organum vasclosum de la lamina terminalis* (OVLT) et le recessus supra-optique (SoR). Le SCN nu est localisé de part et d'autre du 3V, au dessus du chiasma optique. Le SCN rétrochiasmatique s'étend largement en arrière du chiasma optique. Les SCN contiennent des cellules de petites tailles, denses et organisées en paquets, ce qui les rend facilement décelables à partir de la région hypothalamique antérieure. Chaque SCN contient environ 8000 neurones caractérisés par des dendrites simples et des axones fins (van den Pol, 1980 ; Shirakawa *et al.*, 2001). Les cellules gliales sont abondantes dans la périphérie des SCN (Okamura et *al.*, 1994). L'étude des projections commissurales des SCN a mis en évidence une communication au sein de chaque noyau, entre les deux régions dmSCN et vlSCN, mais aussi entre le SCN droit et gauche (Moore et *al.*, 2002).

2.2. Organisation histochimiques des SCN

Les SCN ne correspondent pas à une structure homogène. L'existence d'une régionalisation se trouve aussi bien sur le plan morphologique que neurochimique. Récemment, nous avons appris beaucoup de choses sur les neurotransmetteurs qui interviennent dans la communication entre les cellules nerveuses au sein des SCN. Trois neurotransmetteurs sont particulièrement abondants dans cette structure : le GABA (Gamma-Amino Butyric acid) qu'est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central, l'AVP (Arginine Vasopressin) et le VIP (Vasoactive Intestinal Polypetide). La région dmSCN contient des neurones qui synthétisent majoritairement l'AVP (Ibata et *al.*, 1999; Moore et *al.*, 2002; Morin et *al.*, 2006; Nascimento et *al.*, 2010). La différence morphologique des SCN entre le rat d'une part et la souris et le hamster d'autre part, est associée à une modification de la distribution des neurones AVP à partir d'une localisation essentiellement dorsomédiale à une position plus ventrale **(Figure 5)** (Morin, 2012). La région vlSCN est constituée principalement de neurones à VIP, de neurones synthétisant le peptide histidine isoleucine (PHI) et de neurones libérant la gastrine (GRP) (Card *et al.*, 1988; Mikkelsen *et al.*, 1991; Smale & Boverhof, 1999; Moore *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2010). Les neurones à somatostatine (SS) sont présents dans la portion intermédiaire des SCN (Card et *al.*, 1988), délimitant ainsi la région vlSCN de la région dmSCN (Ibata et *al.*, 1999). La majorité des fibres à SS projettent vers la région vlSCN où sont situés les neurones à VIP et à GABA, alors que quelques fibres projettent sur des neurones à AVP. Chez les mammifères autres que les rongeurs des organisations histochimiques des SCN légèrement

différentes a été décrites. Par exemple chez le dromadaire, modèle animal utilisé dans le présent travail, plusieurs neuropeptides ont également été identifiés dans les SCN (l'AVP et le VIP), mais la présence des neurones ocytocinergiques et un grand nombre de neurones contenant la tyrosine hydroxylase (TH) est caractéristique (El Allali, 2009). Les neurones à ocytocine (OT) appartiennent au système parvocellulaire connu pour son rôle dans la neuromodulation centrale. Ceci suggère un rôle de l'OT dans la modulation du fonctionnement des SCN, à l'image du VIP (Jacomy et *al.*, 1999). Dans les SCN du dromadaire des afférences nerveuses à neuropeptide Y (NPY), à la sérotonine (5-HT) et la methionine-enképhaline (Met-enk) ont également été identifiées (El Allali, 2009).

D'autres neuropeptides et neurotransmetteurs comme la neurotensine (NT), la thyréostimuline (TRH), les enképhalines (ENK), l'angiotensine II (Block *et al.*, 1988; Abrahamson & Moore, 2001; Thomas *et al.*, 2004), la calcitonine gene-related peptide (Park et *al.*, 1993), la galanine (GA) (Skofitsch & Jacobowitz, 1985; Abrahamson & Moore, 2001), la substance P (Morin *et al.*, 1992; Abrahamson & Moore, 2001; Piggins *et al.*, 2001), le NPY, la 5-HT, la TH et l'oxyde nitrique synthase (NOS) sont également présents mais sans localisation particulière (Reuss, 2003).

Chez le hamster doré et la Souris, la région SCNce exprime une protéine liant le calcium grâce à un motif « EF hand » : la calbindine D_{28k} (CALB) (Silver *et al.*, 1996b; Ikeda & Allen, 2003).

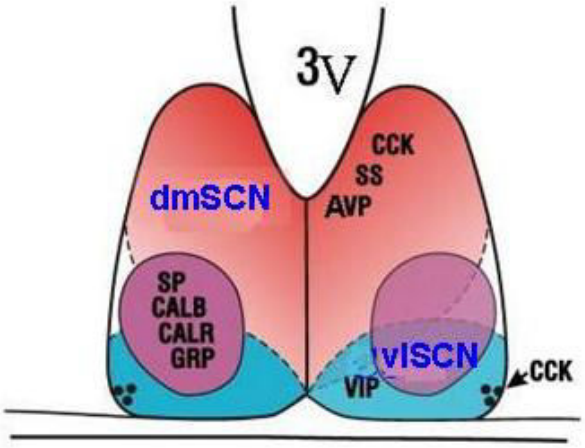

Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation neuronale des SCN du hamster.

3V : troisième ventricule; AVP : vasopressine; SS : somatostatine; CCK : cholecystokinine; SP : substance P; CALB : calbindine; CALR : calretinine; GRP : peptide libérant la gastrine; VIP : vasoactive intestinal polypeptide. Le schéma correspond à la partie mi-caudale des SCN où le SCNce est évident. Les neurones à AVP et CCK occupent le tiers rostral du SCN. Les points noirs en position ventrolatérale indiquent la présence d'une faible population neuronale CCK à cet endroit.

Modifié d'après Morin (2012)

De nombreuses co-localisations de neuropeptides ont également été rapportées et de ce fait l'organisation neuroanatomique des SCN est très complexe. En effet, le VIP et le PHI sont synthétisés à partir du même précurseur protéique, par conséquent ils sont toujours localisés dans les corps cellulaires des mêmes neurones (Card et *al.*, 1988; Romijn et *al.*, 1997; Romijn et *al.*, 1998). Toutefois, le VIP et le GRP ne sont co-localisés que dans certains neurones (Okamura et *al.*, 1986; Romijn et *al.*, 1998), tandis que l'AVP est co-localisée avec le VIP (Romijn et *al.*, 1999), la GA (Gai et *al.*, 1990) et l'enképhaline (Sakanaka et al., 1990). La SS n'est co-localisée ni avec le VIP, ni avec l'AVP (Tanaka et *al.*, 1996).

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le GABA, ce neurotransmetteur inhibiteur est exprimé dans la plupart des neurones des SCN (Moore & Speh, 1993; Nascimento *et al.*, 2010), est donc co-localisé avec tous les neuropeptides précités. A l'opposé du GABA, le glutamate (GLU) est un neurotransmetteur excitateur très répandu dans le système nerveux central. Dans les SCN, des neurones à GLU ont été observés dans la partie dmSCN (Csaki et al., 2000). Il a été montré que ces deux neurotransmetteurs (GABA et GLU) sont mis en jeu dans la régulation, via les SCN, de la sécrétion rythmique de mélatonine (MLT) par la glande pinéale (Perreau-Lenz et *al.*, 2003; Perreau-Lenz et *al.*, 2004a).

Plusieurs projections réciproques s'établissent entre les différentes populations neuronales des SCN et plus précisément entre les deux populations majoritaires (VIP et AVP) **(Figure 6)** (Romijn *et al.*, 1997; Abrahamson & Moore, 2001).

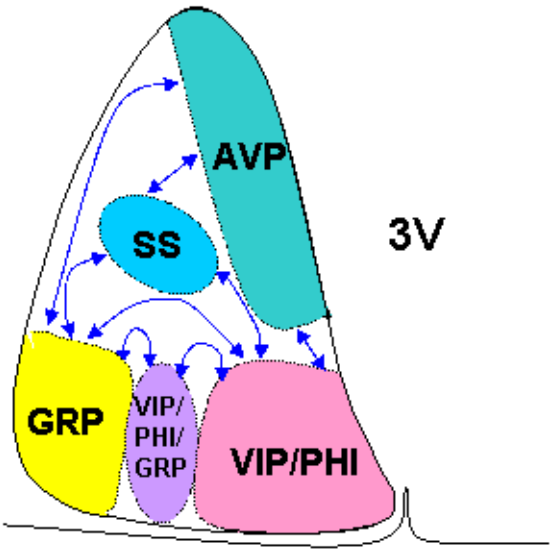

Figure 6 : Représentation schématique des projections réciproques entre les différentes populations neuronales qui s'établissent au sein du SCN du rat.

3V : troisième ventricule ; AVP : vasopressine ; SS : somatostatine ; GRP : peptide libérant la gastrine ; VIP : vasoactive intestinale polypeptide ; PHI : peptide histidine isoleucine.

Modifié d'après Romijn et *al.*, (1997).

Il est également important de rappeler le rôle des principales populations neuronales des SCN, dans la synchronisation de l'horloge, l'élaboration et la distibution du message circadien au niveau central et périphérique. Plusieurs études montrent que les neurones à VIP dans les SCN jouent un rôle majeur dans la régulation des rythmes circadiens. Ces neurones reçoivent des fibres glutamergiques de la rétine et transmettent l'information lumineuse vers d'autres neurones des SCN (Aton et *al.*, 2005) aisni que vers d'autres régions du cerveau par exemple le noyau arqué (Guzman-Ruiz et *al.*, 2014). Ceci suggère l'implication des neurones à VIP dans la synchronization par la lumière. En ce qui concerne le neurotransmiteur AVP, il était caractérisé comme une sortie importante de l'horloge circadien (Reppert et *al.*, 1981). Un rythme circadien de l'AVP dans le liquide céphalo-rachidien a été rapporté chez plusieurs espèces y compris le singe, le rat, la chèvre, le mouton le lapin et le cochon d'Inde (Robinson & Coombes, 1993). Ce rythme est maintenu même après une lésion des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN), ou même après une hypophysectomie ou une pinéalectomie, seulement une lésion complète des SCN est capable d'abolir ce rythme (Schwartz & Reppert, 1985; Jolkkonen *et al.*, 1988). En outre, des études ont montré une augmentation de l'ARNm de l'AVP dans les SCN durant la phase lumineuse alors que l'ARNm de l'AVP dans les PVN et les noyaux supraoptiques (SON) ne montre pas cette variation journalière. De toute évidence, les fluctuations quotidiennes de l'AVP dans le liquide céphalo-rachidien sont le résult du rythme circadien de l'AVP dans les SCN (Buijs et *al*., 2006; Webb et *al*., 2009).

En résumé, la régionalisation anatomique des SCN en deux compartiments ventrolatéral et dorsomédian se retrouve aussi sur le plan fonctionnel et suggère que ces deux régions participent de façon spécifique à la genèse et à la régulation des rythmes circadiens.

2.3. Bases moléculaires des rythmes circadiens

La plupart des études chronobiologiques récentes mettent l'accent sur les bases moléculaires qui génèrent les rythmes dans l'horloge biologique. A l'origine, les chercheurs suggèrent que l'étude des mécanismes moléculaires intervenant dans les rythmes circadiens serait plus aisée à mener sur des formes de vie simple que sur les mammifères. C'est ainsi que des gènes horloges ont été identifiés pour la première fois chez la drosophile (*drosophila melanogaster*), en 1971 par (Konopka & Benzer).

Chez les mammifères, le fonctionnement de l'horloge moléculaire des SCN repose sur l'alternance de l'activation et la répression de la transcription d'une partie du génome par différentes protéines. Ces protéines autorégulées d'une manière rythmique sont codées par des

gènes dits gènes horloges. La machinerie moléculaire de l'horloge principale est organisée en deux boucles interdépendantes de rétrocontrôle, avec cependant des mécanismes beaucoup plus complexes **(Figure 7)** (Reppert & Weaver, 2000; Shearman *et al.*, 2000; Reppert & Weaver, 2001; Okamura *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2008; Mohawk *et al.*, 2012).

La première boucle de régulation positive implique deux gènes horloges : *Clock* (*Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) et *Bmal1* (*Brain and Muscle Arnt Like protein1*). *Clock* fut le premier gène horloge identifié chez un mammifère grâce à l'étude de la souris mutante (Vitaterna et *al.*, 1994). CLOCK et BMAL1 sont de la famille des protéines bHLH/PAS (Basic Helix Loop Helix/ PER ARNT SIM ; ARNT : Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator, SIM : Simple Minded) : elles possèdent le domaine PAS permettant la dimérisation entre protéines et la formation des hétérodimères CLOCK/BMAL1. Elles présentent aussi le domaine bHLH nécessaire pour la liaison du dimère sur la double hélice d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) grâce à l'interaction entre le domaine bHLH protéique et la séquence consensus E-box du promoteur (Antoch et *al.*, 1997). Le dimère CLOCK/BMAL1 **active la transcription rythmique des neuf autres gènes horloges :** les gènes *Per (Period)* (*Per*1, *Per*2**,** *Per*3), *Cryptochrome* (*Cry*1, *Cry*2), *Dec* (*human protein Differentially Expressed in Chondrocytes*) (*Dec1*, *Dec2*), *Rev-erbα* et *Rorα* (*Retnoid-related Orphan Receptor α*) (Gekakis *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999; Preitner *et al.*, 2002; Akashi & Takumi, 2005; Ko & Takahashi, 2006; Takahashi *et al.*, 2008; Mohawk *et al.*, 2012). Le dimère CLOCK/BMAL1 active également la transcription d'autres gènes, appelés « gènes contrôlés par l'horloge, *Ccg* » qui forment la voie de sortie des messages rythmiques. L'exemple classique des *Ccg* est l'AVP (Jin *et al.*, 1999; Tousson & Meissl, 2004). L'expression de *Clock* dans les SCN n'est pas rythmique, ceci est vrai pour son ARNm (Oishi et *al.*, 1998; Shearman et *al.*, 1999) ainsi que pour sa protéine (Maywood et *al.*, 2003). Toutefois, Tournier et ses collaborateurs (2003) ont montré chez le hamster doré que l'expression de *Clock* est rythmique en photopériode courte.

La première boucle de régulation négative implique les gènes *Per*, *Cry* et *Dec*. La transcription des sept gènes (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1*, *Dec2*) est activée par la fixation du dimère CLOCK/BMAL1 sur leur E-box. Les protéines PER et CRY forment des dimères grâce à leur domaine PAS, qui une fois dans le noyau exercent une rétroaction sur le dimère CLOCK/BMAL1, inhibant de ce fait leur propre transcription ainsi que celle de *Bmal1*, de *Rev-erbα* et de *Rorα* (Shearman *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2008; Mohawk *et al.*, 2012). Les DEC protéines inhibent l'effet du dimère CLOCK/BMAL1

d'une part par compétition sur leurs sites de fixation (Honma et *al.*, 2002; Kawamoto et *al.*, 2004), et également par interaction avec BMAL1 pour empêcher sa dimérisation avec CLOCK (Sato et *al.*, 2004a).

La seconde boucle de régulation négative implique *Rev-erbα*, gène appartenant à la famille des « récepteurs nucléaires orphelins ». Dans les SCN, la transcription de *Rev-erbα* est stimulée par CLOCK/BMAL1. Toutefois, contrairement à PER/CRY, REV-ERBα ne contrôle pas sa propre transcription mais il inhibe la transcription de *Bmal1* et *clock* (Preitner *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2002; Crumbley & Burris, 2011).

La seconde boucle de régulation positive est composée des *Rorα (Rorα1* et *Rorα4*) gènes de la famille des « récepteurs nucléaires orphelins », comme *Rev-erbα* leur transcription est activée par CLOCK/BMAL1. A l'opposé de *Rev-erbα*, les *Rorα* stimulent la transcription de *Bmal1* (Emery & Reppert, 2004; Nakajima *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2004b; Akashi & Takumi, 2005; Guillaumond *et al.*, 2005).

Par leur action opposée sur *Bmal1*, les protéines REV-ERBα et RORα stabilisent les oscillations des gènes horloges. Toutefois, les gènes *Rev-erbα* et *Rorα* apparaissaient comme non nécessaires à la genèse des rythmes circadiens aux niveaux des SCN (Liu et *al.*, 2008).

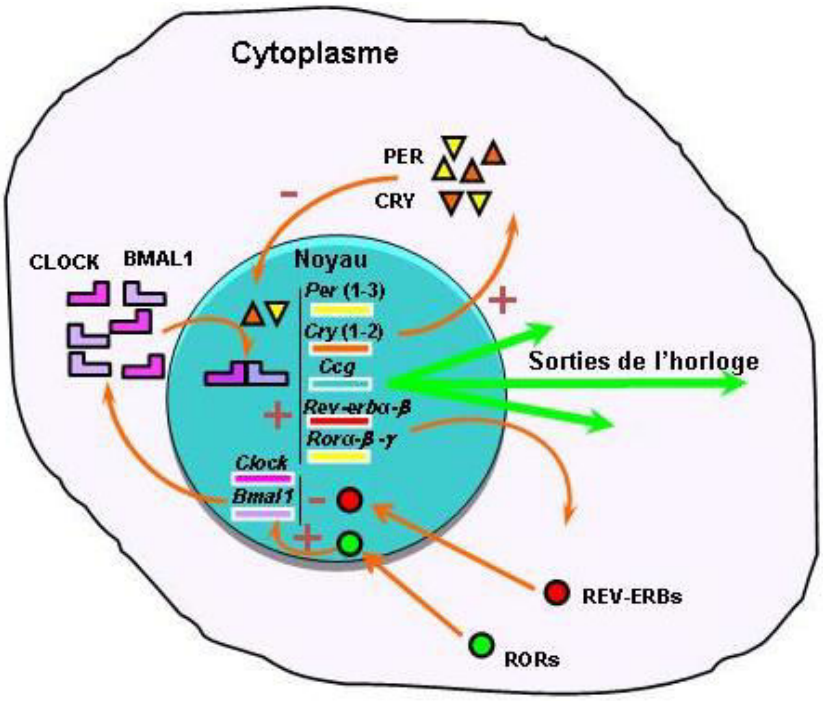

Figure 7 : L'horloge biologique moléculaire chez les mammifères.

Représentation des événements moléculaires dans une cellule. Se référer au texte pour le détail des étapes des boucles moléculaires et pour les abréviations utilisées.

Modifié d'après Kohsaka et Bass (2007) et Mohawk et *al.* (2012)

3. La synchronisation journalière des SCN

Dans des conditions constantes, les rythmes circadiens sont générés par les SCN avec une période proche de 24 heures (libre cours). Toutefois dans le milieu naturel, les rythmes circadiens chez la plupart des êtres vivants ne sont pas en libre cours. L'alternance des cycles journaliers de lumière-obscurité, les variations de la température ambiante, la disponibilité alimentaire, l'hygrométrie,… etc constituent une règle de base et non pas une exception au sein du biotope. La question qui se pose est comment l'horloge biologique principale intègre et s'adapte à ces variations cycliques ? Avant de répondre à cette question, il est nécessaire de rappeler que les variations cycliques d'un synchroniseur donné sont capables d'imposer à l'horloge biologique sa propre période. En effet, l'entrainement par un facteur environnemental (synchroniseur) est réalisé grâce à la modulation de la période de l'horloge biologique pour devenir égale à celle du synchroniseur.

Chez tous les mammifères, l'activité des SCN est entraînée à 24 heures principalement par le cycle journalier de lumière-obscurité (Moore, 1983; Meijer & Rietveld, 1989). Ce cycle lumière-obscurité est considéré comme le synchroniseur le plus puissant. En se basant sur la règle d'Aschoff, l'intensité de la lumière constante peut modifier la période d'un rythme biologique. Cela signifié que ce stimulus est également capable d'affecter la remise à l'heure de l'horloge biologique. En (1954), Pittendrigh démontra que, lorsque les œufs de *Drosophila* sont maintenus en DD, les mouches émergent de la pupe à des moments aléatoires de la journée. Cependant, l'exposition des nymphes à une seule et brève impulsion de lumière induit l'appariation d'un rythme circadien d'éclosion. Pittendrigh (1954), supposa que cet effet résulte de la synchronisation des pupes par ce signal lumineux. Cette idée concordait avec les travaux de Bünning (1936) sur le rôle de la lumière dans le photopériodisme de la plante de l'haricot. Ce concept implique que la lumière est capable de réinitialiser l'horloge circadienne chez les organismes vivants. Cette remise à l'heure est nommée entraînement photique (Roenneberg & Foster, 1997). Toutefois, les SCN ne sont sensibles à l'effet synchroniseur de la lumière que durant la période nocturne, c'est-à-dire pendant la période d'activité chez les espèces nocturnes comme le hamster et pendant la période de repos chez les espèces diurnes comme le rat du Nil (*Arvicanthis niloticus*). La phase de l'horloge peut être avancée (avance de phase) ou retardée (retard de phase) en fonction de l'heure de la stimulation lumineuse, à la fin ou au début de la nuit respectivement **(Figure 8, 9)**.

En plus de la lumière, d'autres facteurs peuvent entraîner l'horloge biologique. Ces synchroniseurs, dits « non-photiques », sont notamment sociaux, environnementaux (e.g. la

température ambiante (El Allali et *al.*, 2013), l'hygrométrie…), comportementaux, nutritionnels (un accès limité à la nourriture (Challet et *al.*, 1997)) et pharmacologiques (e.g. des drogues dites chronobiotiques : MLT, benzodiazépines… (Cutrera et *al.*, 1994)). Certains facteurs non-photiques induisent des avances de phases lorsqu'ils sont appliqués durant le jour subjectif[3] **(Figure 9)** (Turek & Losee-Olson, 1986; Mrosovsky *et al.*, 1992).

Les signaux synchroniseurs photiques et non-photiques parviennent aux SCN par l'intermédiaire d'une multitude de **voies nerveuses afférentes**. L'intégration de ces signaux conduira à la synchronisation de l'horloge.

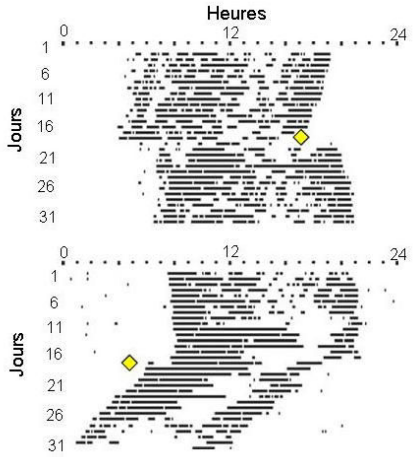

Figure 8 : Effet du créneau lumineux sur l'activité locomotrice chez *Arvicanthis niloticus*.

Les deux actogrammes montrent l'activité de roue de deux rats du Nil maintenus en condition d'obscurité constante (DD). Les deux animaux ont été exposés à un créneau lumineux (1h-400lux, représenté par un losange jaune sur les deux actogrammes). Après 16 jours en DD, le premier Arvicanthis a reçu un créneau de lumière 13 heures après le début de la phase d'activité, qui provoque un retard de 3h de la phase de l'activité locomotrice (actogramme du haut). Après 17 jours en DD, le deuxième Arvicanthis a été exposé à un créneau de lumière 3 heures avant le début de la phase d'activité, qui engendre une avance de phase de presque 2h de l'activité locomotrice.

Modifié d'après Refinetti, (2006)

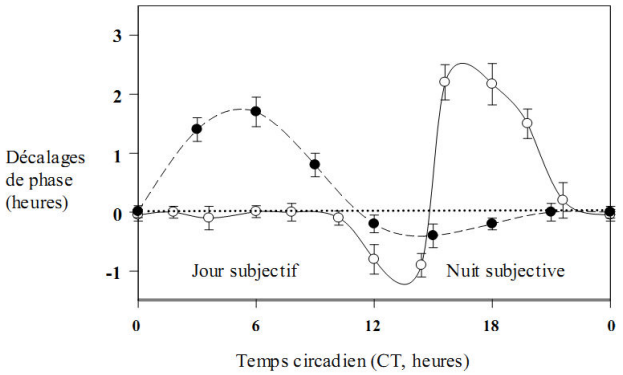

Figure 9 : Courbes de réponse de phase pour des stimulations photiques (points blancs) et non photiques (points noirs).

Modifié d'après Challet et Pevet (2003)

[3] Le jour subjectif : on parle de jour subjectif en conditions de libre cours, il correspond au segment éclairé en présence du synchroniseur cycle lumière-obscurité.

3.1. Réception de l'information : voies afférentes

Afin d'intégrer les différentes informations de l'environnement, les SCN reçoivent de très nombreuses voies nerveuses afférentes (**Figure 10**), véhiculant différents messages dont l'intégration conduira à l'entrainement des rythmes biologiques. Les afférences majeures des SCN sont organisées en trois voies :

- Les **fibres glutamergiques** en provenance de la rétine : **tractus rétino-hypothalamique (RHT).**
- Les **fibres à NPY** : en provenance du **tractus géniculo-hypothalamique (GHT).**
- Les **projections sérotonergiques** directes depuis le **raphé médian** ou indirectes depuis le **raphé dorsal** via les **feuillets inter-géniculés latéraux (IGL).**

Peu d'informations ont été disponibles sur les voies afférentes de la partie dmSCN, mais les voies afférentes sur la partie vlSCN ont été étudiées en détail (Moore et *al.*, 2002). La partie vlSCN semblerait être un relais d'intégration des voies afférentes aux SCN. Les neurones à VIP, majoritaires dans cette partie des SCN, reçoivent des afférences visuelles directes provenant du RHT (fibres glutamergiques) et des afférences indirectes via l'IGL du thalamus contenant le NPY et le GABA (Moore & Eichler, 1972; Card & Moore, 1988; 1989). En outre, Yi et ses collaborateurs (2006) ont trouvé que le noyau arqué ventromédian communique des informations métaboliques périphériques aux SCN via des projections nerveuses qui peuvent contenir également le NPY.

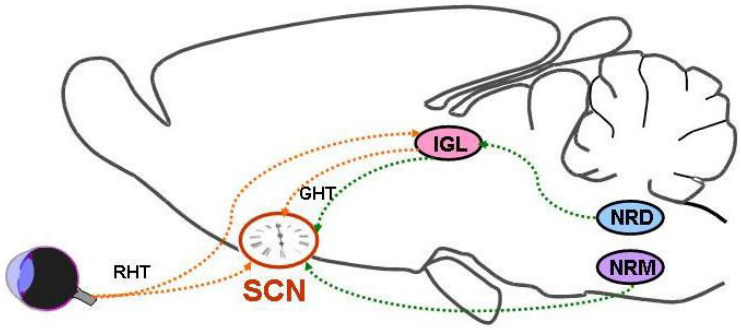

Figure 10 : Principales voies afférentes aux SCN.

NRD : noyau du raphé dorsal ; IGL : feuillets inter-géniculés latéraux ; GHT : tractus géniculo-hypothalamique ; NRM : noyau du raphé médian ; RHT : tractus rétino-hypothalamique ; SCN : noyaux suprachiasmatiques.
Les flèches orange et verte représentent les principales afférences nerveuses responsables de la synchronisation photique et non photique de l'horloge respectivement.

Modifié d'après Refinetti (2006)

3.1.1. Synchronisation photique

En plus de sa fonction essentielle dans la vision, la rétine a un rôle prépondérant dans l'organisation circadienne chez les mammifères, puisqu'elle constitue l'unique source de signaux photiques pour les SCN. Les photons de la lumière activent deux systèmes parallèles : le système visuel de détection de la lumière par les cônes et les bâtonnets, et le système non visuel, impliquant certaines cellules ganglionnaires, celles qui contiennent de la mélanopsine. Dans le système visuel, la lumière est captée par les pigments visuels localisés sur la membrane des disques des segments externes des bâtonnets et des cônes de la rétine où un phénomène de phototransduction survient pour transformer l'énergie photique en information pour le système nerveux, permettant ainsi la formation de l'image et une représentation spatiale de l'environnement. Dans le système non-visuel, les SCN reçoivent l'information temporelle véhiculée par l'alternance lumière/obscurité principalement par deux voies distinctes : **une voie directe, le RHT** et **une voie indirecte, le GHT**. Ces voies sont appelées les **voies photiques** (Morin, 1994; Moore, 1995).

La persistance d'entrainement des rythmes circadiens chez certains patients aveugles et les modèles animaux de dégénérescence rétinienne laisse suggérer qu'un type de cellule oculaire photosensible différent des cônes et des bâtonnets doit être présent dans la rétine (Foster & Hankins, 2002). Une nouvelle molécule appartenant à la famille des opsines a été identifiée dans la peau du xénope, et a ensuite été trouvée dans quelques cellules ganglionnaires de la rétine de souris (Provencio *et al.*, 1998; Provencio *et al.*, 2000; Provencio *et al.*, 2002; Berson, 2003). Le cycle lumière/obscurité est perçu par ce photopigment spécifique, la mélanopsine, exprimé par des cellules ganglionnaires de la rétine appelées ipCGR (Provencio *et al.*, 1998; Panda *et al.*, 2002; Ruby *et al.*, 2002; Semo *et al.*, 2003). En effet, les axones des ipCGR projettent sur les SCN, participant ainsi à la formation du RHT (Hannibal et *al.*, 2002; Hattar et *al.*, 2002).

Deux neurotransmetteurs semblent impliqués dans le relais des informations lumineuses via le RHT : le GLU et le PACAP (polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire) (Hannibal, 2002). Tous les deux sont véhiculés dans le RHT et libérés dans les SCN en réponse à une stimulation lumineuse (Liou *et al.*, 1986; Fukuhara *et al.*, 1997). Le PACAP peut agir en modulant les effets du GLU sur l'horloge (Sehgal, 2004). La présence de leurs récepteurs a été démontrée dans les SCN (Colwell *et al.*, 1990; Mintz *et al.*, 1999; Hannibal, 2002).

Les SCN reçoivent aussi l'information photique par une voie indirecte. En effet, les ipCCG projettent également vers les SCN via le GHT (Meijer & Rietveld, 1989; Pickard, 1994). Ce faisceau de fibres a pour origine les IGL. Les neurones issus des IGL, contenant essentiellement NPY, GABA et également Met-enk (exemple chez le rongeur diurne Le dègue du Chili (Goel et *al*., 1999)) , innervent les SCN en formant le GHT (Card & Moore, 1989). Toutefois, cette voie n'est pas essentielle pour l'entrainement des rythmes par le cycle LD. En effet, la lésion des IGL n'élimine pas l'entrainement par le cycle LD (Pickard *et al.*, 1987; Edelstein & Amir, 1999). Par contre, elle diminue la vitesse d'entrainement par la lumière (Dark & Asdourian, 1975; Harrington & Rusak, 1986). Cette voie aurait donc un rôle modulateur des effets de la lumière sur les SCN (Albers et *al.*, 1991). Les afférences sérotoninergiques constituent la troisième afférence majeure aux SCN. Le NRM est la source principale des projections sérotoninergiques vers les SCN (Azmitia & Segal, 1978; Hay-Schmidt *et al.*, 2003). Une autre voie, également importante pour le système circadien, provient du NRD et arrive aux IGL (Azmitia & Segal, 1978; Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Vrang *et al.*, 2003). Chez le rat, les parties latéraux du NRD reçoivent une innervation provenant des cellules ganglionnaires de la rétine (Shen & Semba, 1994; Fite *et al.*, 1999). Ce résultat suggère que le signal photique pourrait aussi être acheminé vers les SCN indirectement via le NRD latéral. En terme fonctionnel, il a été montré que cette troisième voie indirecte intervient pour moduler *in fine* la synchronisation et le fonctionnement de l'horloge circadienne (Challet & Pevet, 2003).

3.1.2. Synchronisation non-photique

Les effets des facteurs non-photiques sur les rythmes circadiens sont différents de ceux induits par des facteurs photiques. Les facteurs non-photiques sont de nature très diversifiée (facteurs environmentaux «e.g. température ambiante (El Allali et *al.*, 2013)», facteurs comportementaux, substances pharmacologiques ou encore facteurs métaboliques). De point de vue physiologique, certains synchroniseurs non-photiques provoquent des avances de phase lorsqu'ils sont appliqués durant le jour subjectif. Appliqués en milieu de nuit subjective et selon leur nature, ces signaux peuvent induire un retard de phase de faible amplitude (**Figure 9**).

Le système circadien intègre les signaux non-photiques principalement via des fibres sérotoninergiques issues des noyaux du raphé qui véhiculent l'information vers les SCN. Les fibres des NRM innervent directement les SCN, celles des NRD projettent sur les IGL

(Meyer-Bernstein & Morin, 1996; Moga & Moore, 1997) (**Figure 10**). L'implication de la 5-HT dans l'entrainement non-photique a été démontré suite à des lésions spécifiques de fibres en provenance du raphé (Cutrera *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1996; Challet *et al.*, 1997). De même, de nombreuses études montrent bien qu'une lésion bilatérale des IGL affecte les changements de phase des rythmes circadiens, provoqués par les facteurs non-photiques (Janik & Mrosovsky, 1994; Wickland & Turek, 1994; Challet *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996; Schuhler *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 2000). Probablement, l'entrainement non-photique de l'horloge biologique implique simultanément une activation sérotoninergique des IGL et des SCN. Ceci a été démontré par des micro-injections bilatérales de 8-OH-DPAT (8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin), un agoniste sérotoninergique, dans les IGL ou les SCN durant le jour subjectif induisant une avance de phase de l'activité locomotrice chez les hamsters dorés (Challet et *al*., 1998) par l'activation des récepteurs 5-$HT_{1A/7}$. L'ensemble de ces résultats suggèrent aussi un rôle important des IGL dans l'intégration des stimuli non-photiques chez les rongeurs. Les terminaisons sérotoninergiques dans les SCN sont en contact avec des terminaisons NPYergiques (Guy et *al.*, 1987) et des terminaisons GABAergiques (Bosler, 1989). En outre, les projections GABAergiques et sérotoninergiques convergent dans le vlSCN, et particulièrement sur les neurones VIPergiques (Bosler & Beaudet, 1985; Francois-Bellan & Bosler, 1992). Il apparait de cette organisation qu'une interaction fonctionnelle pourrait exister entre les différentes afférences pour moduler l'activité de l'horloge circadienne.

En résumé, la libération rythmique de la 5-HT dans les SCN (maximale au début de la phase nocturne du cycle LD chez les rongeurs nocturnes) (Barassin et *al*., 2002) intervient d'une manière importante dans la synchronisation de l'horloge. Durant la nuit, la 5-HT inhibe la synchronisation par la lumière, et pendant le jour elle intervient dans l'entrainement non-photique de l'horloge. Les IGL et les noyaux des raphés, structures impliquées directement dans la synchronisation des SCN par des facteurs non-photique, interviennent également dans la modulation des effets de la lumière sur l'horloge biologique. Ceci laisse suggérer que ces voies pourraient être impliquées dans les interactions photique versus non-photique.

3.2. Distribution du message circadien : voies efférentes

L'horloge principale est caractérisée par sa capacité à distribuer un message circadien. La connaissance des voies impliquées dans la distribution de ce signal est une condition indispensable pour comprendre comment l'organisme est capable de fonctionner en harmonie avec les variations cycliques de son environnement immédiat.

Un réseau d'efférences neuronales et des signaux neuroendocrines de l'horloge centrale sont impliqués dans la distribution des messages circadiens (Kalsbeek & Buijs, 2002). Actuellement, il est connu que les SCN distribuent le signal circadien par des voies **nerveuses, humorales**, **hormonales et comportementales** (Pévet & Challet, 2011).

3.2.1. Les voies nerveuses

De nombreuses études neuroanatomiques ont permis d'identifier les projections efférentes des SCN (Leak & Moore, 2001). Les SCN projettent dans trois zones principales du cerveau : l'hypothalamus, le thalamus et la zone septale. La partie vlSCN projette principalement dans la région dmSCN et dans l'aire hypothalamique située au voisinage des SCN, particulièrement dans la partie latérale de la zone sub-paraventriculaire ($_{L}$SPV) (Leak *et al.*, 1999; Leak & Moore, 2001). La partie dmSCN envoie des projections nerveuses à différentes zones du cerveau, notamment vers le noyau paraventriculaire thalamique (PVT) (Buijs, 1996), le PVN, la partie médiale de la zone sub-paraventriculaire ($_{M}$SPV), l'aire préoptique (POA) et le noyau dorsomédial hypothalamique (DMH) (Leak *et al.*, 1999; Leak & Moore, 2001) (**Figure 11**). Des projections intra SCN assurent la synchronisation de tous les neurones des SCN. Il a été aussi démontré que les cibles de ces efférences de l'horloge projettent elles-mêmes sur d'autres structures cérébrales comme sur des structures périphériques dans tout l'organisme (Buijs & Kalsbeek, 2001; Kalsbeek & Buijs, 2002).

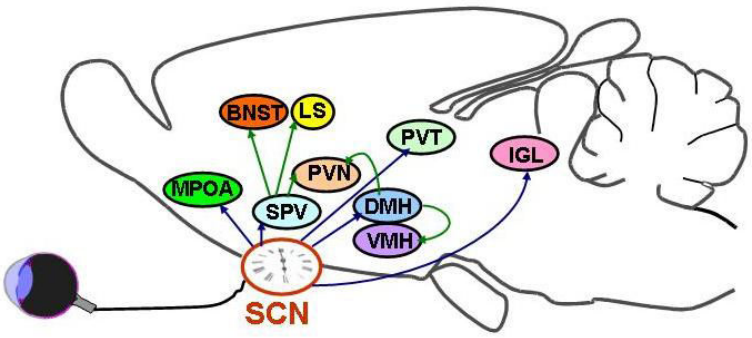

Figure 11 : Les efférences majeures des SCN.

MPOA : aire préoptique médiane ; BNST : noyau du lit de la strie terminale ; LS : septum latéral ; PVT : noyau paraventriculaire thalamique ; IGL : feuillets inter-géniculés latéraux ; SPV : zone subparaventriculaire ; PVN : noyau paraventriculaire hypothalamique ; DMH : noyau dorsomédial hypothalamique ; VMH : noyau ventromédial hypothalamique ; SCN : noyaux suprachiasmatiques.

Modifié d'après Kalsbeek et Buijs (2002)

3.2.2. Les voies humorales

L'existence de facteurs diffusibles a été démontrée grâce à l'approche par greffe de SCN fœtaux. Des rongeurs rendus arythmiques par lésion des SCN restaurent la rythmicité circadienne de leur activité locomotrice lorsqu'ils reçoivent un transplant de SCN fœtal encapsulé dans une membrane perméable et placé dans les ventricules cérébraux (Ralph *et al.*, 1990; Silver *et al.*, 1996a; LeSauter & Silver, 1998; Tousson & Meissl, 2004). La taille des pores de la membrane (5-120 nm) ne permet pas l'établissement de contacts synaptiques entre le greffon et les structures cérébrales de l'hôte. Cela prouve que ces noyaux, par simple diffusion de substances, sont capables de distribuer un message circadien afin de rétablir le rythme de l'activité locomotrice. Cependant, une greffe des SCN fœtaux est incapable de rétablir les réponses photopériodiques de la fonction de reproduction (Lehman et *al.*, 1987) comme les rythmes de sécrétion de l'hormone lutéinisante, de la MLT ou encore de la corticostérone (Meyer-Bernstein et *al.*, 1999). Il apparait donc que ces facteurs diffusibles ne sont pas suffisants pour induire l'expression des rythmes circadiens dans toutes les structures. La nature des facteurs diffusibles semble proche de celle du TGF-α (Transforming Growth Factor alpha) et de la PK2 (Prokinéticine type 2) (Cheng et *al.*, 2002). Néanmoins, la nature exacte de ce(s) facteur(s) humoraux et les neurones concernés comme les structures cibles ne sont pas encore parfaitement déterminés, mais la zone SPV semble être un site d'action privilégié (Kramer et *al.*, 2003).

3.2.3. Les voies hormonales

Le message circadien élaboré par les SCN est distribué à tout l'organisme, du moins aux structures cibles capables de le lire (structures contenant des récepteurs adéquats), entre autres par voie hormonale via la circulation sanguine générale. Pour contrôler la libération rythmique de la corticostérone par exemple, les SCN impliquent des voies nerveuses et hormonales pour piloter la sécrétion circadienne des glucocorticoïdes (Dickmeis, 2009).

Le rythme de sécrétion de la MLT dépend exclusivement de l'horloge circadienne principale contrairement à la corticostérone dont la régulation de la synthèse n'est pas exclusivement dépendante de l'horloge (stress, système immunitaire, réponse inflammatoire, etc). En effet, les signaux de l'horloge sont transférés à la glande pinéale par l'intermédiaire d'une voie polyneuronale se terminant par des fibres sympathiques. Dans la glande pinéale, le message nerveux est traduit en un message hormonal : libération rythmique de MLT. La MLT

est donc une sortie endocrine de l'horloge centrale qui distribue un message circadien à tout l'organisme via la circulation sanguine générale.

III. Mélatonine : messager endocrine circadien et saisonnier

La découverte de la MLT est relativement récente, elle date du milieu du 20^{éme} siècle. Dans les années 50, le dermatologue Lerner Aaron cherchait l'hormone responsable de l'éclaircissement de la peau chez l'Homme atteint de vitiligo (dermatose caractérisée par une dépigmentation par plaque). C'est en explorant la littérature scientifique antérieure que Lerner trouva un article de McCord et Allen (1917) montrant que des extraits de la glande pinéale de bœuf provoquaient un éclaircissement de la peau chez la grenouille (*Rana pippens*). Après de nombreuses expériences, Lerner et ces collaborateurs (1958) parviennent à élucider la formule chimique du composé actif (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) présent dans les extraits de la glande pinéale, et baptisèrent l'hormone MLT.

1. Synthèse de la mélatonine et son métabolisme

1.1. Innervation de la glande pinéale impliquée dans la synthèse de la mélatonine

La MLT est une hormone sécrétée la nuit par la glande pinéale. Aussi petite qu'un pois et de la forme d'une pomme de pin chez l'Homme, d'où elle tire son nom « *Corpus pinealis* », la glande pinéale a la capacité de produire un signal mélatoninergique, qui suit exclusivement l'environnement lumineux, donnant ainsi une perception précise du temps (Perreau-Lenz et *al.*, 2004b). La glande pinéale est innervée par des fibres nerveuses de diverses origines. Cependant, sa principale innervation vient du système nerveux autonome sympathique. Une voie polyneuronale issue des SCN liant le système circadien à la glande pinéale a été mise en évidence (Perreau-Lenz et *al.*, 2003). L'horloge centrale transmet l'information, vraisemblablement via des fibres GABAergiques (Kalsbeek et *al.*, 1999), aux PVN qui constituent ainsi le premier relais de cette voie polyneuronale. Ces neurones projettent ensuite vers les neurones préganglionnaires de la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière (IML) au niveau des segments thoraciques T1 à T3. Enfin, les neurones de l'IML projettent à leur tour sur les neurones des ganglions cervicaux supérieurs (SCG). A partir de ces SCG, des fibres sympathiques projettent sur la glande pinéale et la libération nocturne de noradrénaline (NA) induit une augmentation rapide de la synthèse de MLT (**Figure 12**) (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Bien que la NA joue un rôle indispensable dans la synthèse de la MLT,

d'autres neurotransmetteurs ou neuropeptides tels que l'acétylcholine (ACh), le VIP, le NPY, l'AVP ou encore le PACAP interviennent dans sa régulation, par des modalités encore très peu connues (Schaad *et al.*, 1995; Schomerus *et al.*, 1995; Letz *et al.*, 1997).

La synthèse de MLT par la glande pinéale est dépendante des variations journalières et saisonnières de l'environnement lumineux. En effet, la durée de sa sécrétion est proportionnelle à la longueur de la nuit, qui change au cours de l'année. La sécrétion de la MLT, par son expression rythmique, constitue ainsi à la fois une sortie circadienne et une sortie saisonnière de l'horloge (Pévet, 2003b).

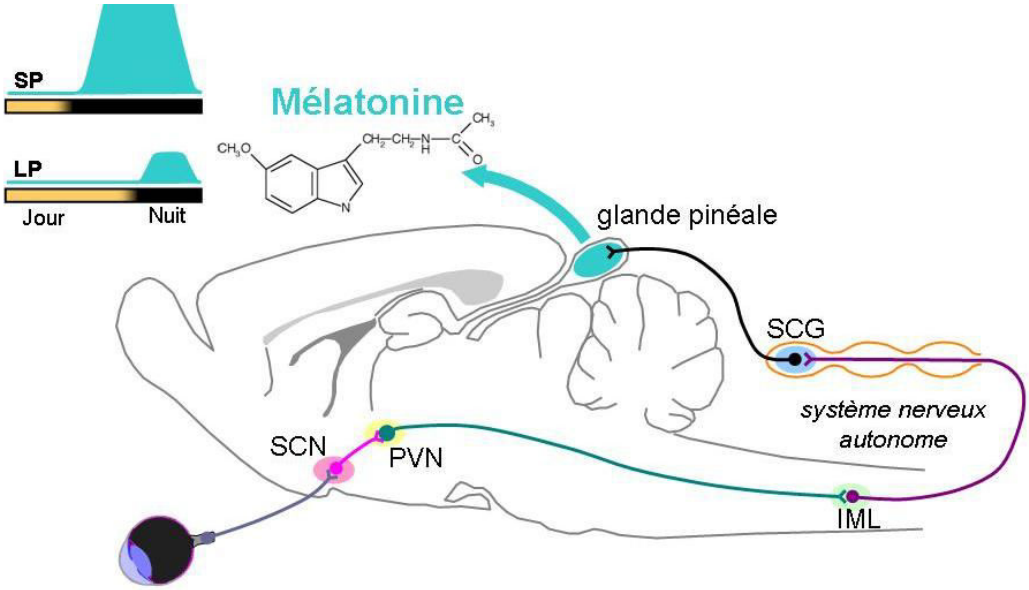

Figure 12 : Représentation en coupe sagittale de la voie nerveuse polyneuronale qui transmet les informations photopériodiques de la rétine à la glande pinéale.

SCN : noyaux suprachiasmatiques ; PVN : noyau paraventriculaire hypothalamique ; IML : colonne intermédiolatérale de la moelle épinière ; SCG : ganglions cervicaux supérieurs ; PG : glande pinéale ; NA : noradrénaline ; Les barres noires et jaunes correspondent aux phases obscure et lumineuse respectivement du cycle lumière-obscurité (LP : long photoperiod ; SP : short photoperiod).

Modifié d'après Bittman (1984)

1.2. Biosynthèse de la mélatonine

La voie de biosynthèse de la MLT implique des étapes enzymatiques successives, comme illustré dans la **Figure 13**. L'acide aminé essentiel, le tryptophane (Trp), présent dans la circulation sanguine générale, constitue le point de départ dans cette cascade de synthèse (Balemans, 1979). En effet, les pinéalocytes captent le Trp circulant (Wurtman & Anton-Tay, 1969), qui sera hydroxylé en 5-hydroxy-tryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase mitochondriale de type 1 (TPOH-1) (Sakowski et *al.*, 2006). Le 5-HTP est ensuite transformé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (DAAA) en 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine). Alternativement, le 5-HTP peut également être méthylé par l'hydroxyindole

O-méthyltransférase (HIOMT) en 5-méthoxytryptophane (5-MTP). Dans les pinéalocytes, la concentration de la 5-HT oscille sur 24-h avec un niveau maximal au cours de la journée et un minimum durant la nuit (Snyder *et al.*, 1967; Mefford *et al.*, 1983). Ce rythme est en opposition avec celui de la MLT, montrant que la 5-HT est principalement utilisée comme substrat pour la synthèse de MLT (Mefford et *al*., 1983). Finalement, la 5-HT peut également être libérée par la glande pinéale (Walker & Aloyo, 1985; Miguez *et al.*, 1997). La 5-HT peut ensuite être métabolisée selon diverses voies qui sont décrites dans la **Figure 13**. Parmi ces voies, il y a une qui est impliquée dans la synthèse de la MLT. La conversion de la 5HT en MLT se fait en deux étapes successives (Simonneaux & Ribelayga, 2003) : premièrement, une **acétylation** de la 5-HT en N-acétylsérotonine (NAS) par l'aryl-alkylamine N-acétyltransférase (AA-NAT). Dans la glande pinéale, cette enzyme présente des variations dépendantes du cycle LD avec un pic nocturne. Deuxiémement, la NAS est méthylée en N-acétyl-5-méthoxytryptamine, ou MLT, par l'HIOMT. Il convient de noter que l'HIOMT est impliquée dans la synthèse de 4 autres indolamines (Axelrod & Weissbach, 1961) (voir **Figure 13**). L'activité de l'HIOMT est plus stable sur une période de 24-h que l'AA-NAT. Cette enzyme n'est pas limitante dans la synthèse de la MLT ; toutefois, son activité varie en fonction de la photopériode. En effet, elle est plus importante en SP qu'en LP ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans les variations saisonnières de l'amplitude du pic de MLT (Ribelayga *et al.*, 1999a; Ribelayga *et al.*, 1999b; Simonneaux & Ribelayga, 2003). La MLT est directement libérée après sa synthèse sans stockage, puisque sa structure lipophile lui permet de traverser librement les membranes cellulaires.

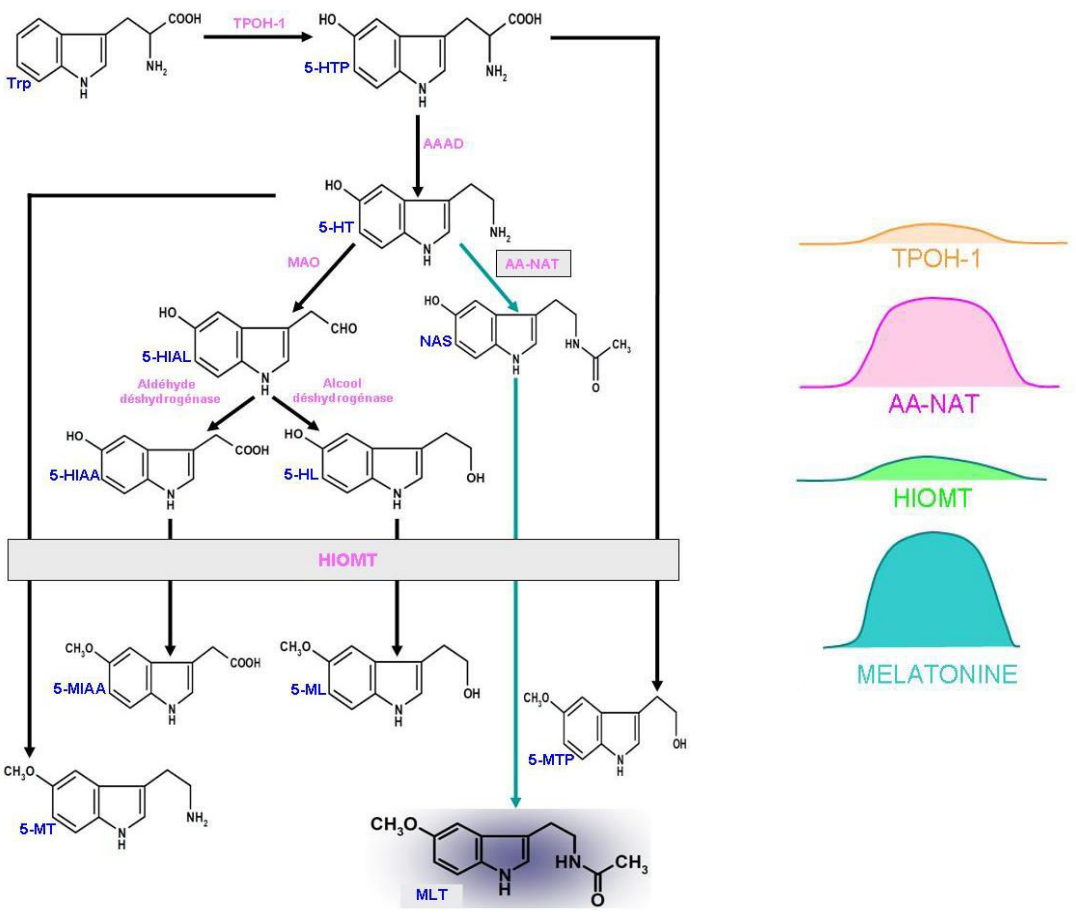

Figure 13 : Métabolisme des indolamines dans la glande pinéale et voie de biosynthèse de la mélatonine.

Trp : tryptophane ; 5- HTP : 5-hydroxytryptophane ; 5-HT : sérotonine ; NAS : N-acétylsérotonine ; 5-HIAL : 5-hydroxyindole-acétaldéhyde ; 5-HIAA : acide 5-hydroxyindole acétique ; 5-HL : 5-hydroxytryptophol ; 5-MIAA : acide 5-méthoxyindole acétique ; 5-ML : 5-méthoxytryptophol ; 5-MTP : 5-méthoxytryptophane ; 5-MT : 5-méthoxytryptamine ; MLT : mélatonine. TPOH-1 : Tryptophane hydroxylase type 1 ; DAAA : Décarboxylase des acides aminés aromatiques ; MAO : Monoamine oxydase ; AA-NAT : Aryl-alkylamine N-acétyl transférase ; HIOMT : Hydroxyindole O-méthyltransférase.

Modifié d'après Balemans (1979)

1.3. Régulation de la biosynthèse de la mélatonine

Dans la glande pinéale, le message nerveux généré par les SCN et entrainé à 24 heures par l'alternance du cycle jour-nuit (Pévet, 2002; Simonneaux & Ribelayga, 2003; Pévet, 2006), est traduit à la suite d'une cascade d'événements biochimiques en un message hormonal : la sécrétion rythmique de MLT (Klein & Moore, 1979). La voie nerveuse conduisant l'information de la rétine à la glande pinéale est inactivée par la lumière. La NA, qui est le principal neurotransmetteur issu de la projection des SCG sur la glande pinéale (Buijs, 1996; Moore, 1996), n'est donc libérée dans les pinéalocytes que durant la phase nocturne (Drijfhout et *al*., 1996; Moore, 1996). La libération nocturne de NA active les récepteurs β-1 adrénergiques présents sur les pinéalocytes. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G_s

(protéine G stimulatrice sensible à la toxine cholérique) qui active l'adénylate cyclase (AC), augmentant ainsi le taux cytosolique de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), ce qui va activer la protéine kinase A (PKA) (Roseboom & Klein, 1995). Une augmentation importante de l'activité de l'AC et consécutivement une augmentation de la concentration en AMPc intra-pinéalocytes, sont indispensables pour la stimulation de l'AA-NAT et la synthèse de MLT (Simonneaux & Ribelayga, 2003). La fixation de la NA uniquement sur les récepteurs α-1 adrénergiques n'a pas d'effet sur les concentrations intracellulaires d'AMPc. Cependant, elle potentialise l'effet de la NA sur les récepteurs β-1 par des mécanismes impliquant le calcium intracellulaire et la protéine kinase C (PKC) (Vanecek *et al.*, 1985; Schomerus *et al.*, 1995) (**Figure 14**). La voie NA→ β-1/ α-1→AC→AMPc→PKA est conservée chez tous les mammifères (Stehle *et al.*, 2001; Simonneaux & Ribelayga, 2003; Schomerus & Korf, 2005). Toutefois, la régulation de l'activation de l'AA-NAT et de la synthèse de la MLT présente des variations d'une espèce à l'autre. En effet, chez les ongulés et les primates, l'induction de la synthèse de MLT est très rapide (moins d'une heure après le début de la nuit) (Hedlund *et al.*, 1977; Namboodiri *et al.*, 1985), alors qu'elle est relativement lente chez les rongeurs (Schottner et *al.*, 2011).

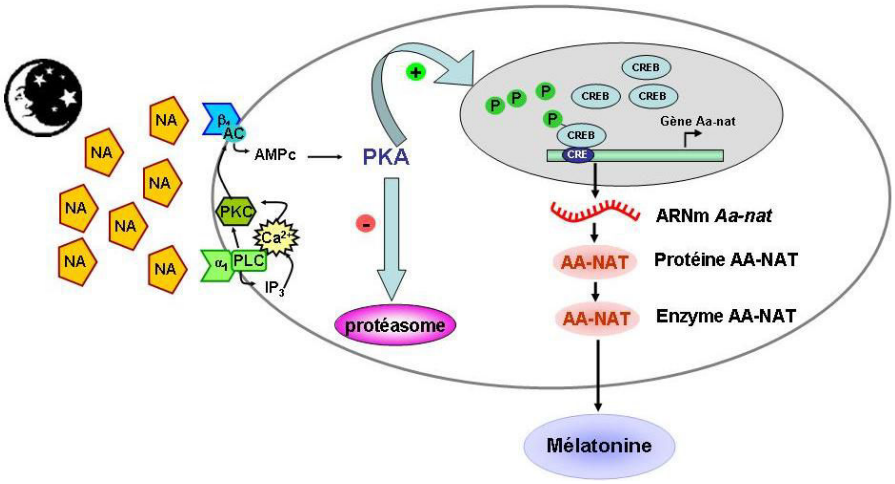

Figure 14 : Transduction du signal noradrénergique induisant la synthèse de mélatonine dans les pinéalocytes.

α1 : récepteur adrénergique de type α1 ; β1 : récepteur adrénergique de type β1 ; AA-NAT : l'aryl-alkylamine N-acétyltransférase ; AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; Ca^{2+} : ion calcium ; CRE : élément de réponse à l'AMPc ; CERB : protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc ; IP_3: inositol trisphosphate ; NA : noradrénaline ; P : phosphate ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C ; PLC : phospholipase C.

Modifié d'après Axelrod (1983)

Chez les ongulés, l'expression du gène *Aa-nat* varie très peu entre le jour et la nuit, avec un niveau continuellement élevé de son ARNm (Coon et *al.*, 1995; Craft et *al.*, 1999). En

revanche, l'activité de l'AA-NAT diffère considérablement entre le jour et la nuit, suggérant une régulation de type **post-transcriptionnel** (Klein et *al.*, 1997). L'enzyme AA-NAT est continuellement synthétisée mais aussi régulièrement dégradée par le protéasome. Au début de la nuit, la libération de NA inhibe la protéolyse par des mécanismes dépendants de la voie AMPc-PKA. La phosphorylation de l'AA-NAT par la PKA lui assure une protection de la dégradation par le protéasome (Ganguly et *al.*, 2001). Par conséquent, le niveau intracellulaire de la protéine AA-NAT augmente assurant la production d'une enzyme AA-NAT active et par la suite la synthèse de la MLT survient. En fin de nuit, l'arrêt de la synthèse de la MLT résulte de l'arrêt de la libération de NA qui entraine une diminution de l'AMPc. Ainsi, la protéine AA-NAT est dégradée par le protéasome (Gastel et *al.*, 1998; Schomerus et *al.*, 2000; Stehle et *al.*, 2001). Cette régulation post-transcriptionnelle a aussi été démontrée chez le dromadaire. En effet, dans la glande pinéale de cet artiodactyle, le gène *Aa-nat* est continuellement exprimé, et sa transcription ne dépendrait pas de la décharge nocturne de NA. Toutefois, celle-ci serait responsable de l'inhibition de la protéolyse et donc de l'activation de l'AA-NAT, ce qui engendre une augmentation de la synthèse de la MLT (El Allali et *al.*, 2008).

Chez les rongeurs, les mécanismes impliqués dans l'activation de l'AA-NAT sont différents de ceux décrits chez les ongulés. En effet, l'activation de l'AA-NAT et de la synthèse de la MLT dépendent de mécanismes **transcriptionnels** résultant de grandes variations dans la quantité d'ARNm synthétisée entre le jour et la nuit dans la glande pinéale (Klein & Weller, 1970; Borjigin *et al.*, 1995; Roseboom *et al.*, 1996). La transcription du gène *Aa-nat*, la synthèse ainsi que l'activation de l'enzyme AA-NAT dépendent de la PKA, activée par la libération nocturne de la NA (Roseboom *et al.*, 1996; Roseboom *et al.*, 1998; Gauer *et al.*, 1999; Garidou *et al.*, 2002; Garidou *et al.*, 2003a; Garidou *et al.*, 2003b). Cette kinase phosphoryle le facteur de transcription CREB (protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc) qui se fixera sur le site de l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) du promoteur de l'*Aa-nat,* permettant la transcription de ce gène (Roseboom & Klein, 1995; Baler *et al.*, 1997).

1.4. Catabolisme de la mélatonine

La MLT est rapidement catabolisée par le foie et les reins, d'où une demi-vie très courte (20 à 30 min) dans le sang. Elle est hydroxylée en 6-hydroxy-mélatonine (Yu et *al.*, 1993) qui est ensuite excrétée sous forme sulfatée ou glucuronidée (Kopin et *al.*, 1961; Skene et *al.*, 2006). Le métabolite majeur de la MLT, la 6-sulphatoxy-mélatonine, est couramment mesuré

dans les urines, aussi bien chez l'Homme que chez les rongeurs. Elle constitue un excellent marqueur de la sécrétion de la MLT par la glande pinéale, aussi bien sur le plan quantitatif que sur le plan qualitatif (Rajaratnam & Arendt, 2001; Skene & Arendt, 2006; Ritzenthaler *et al.*, 2009). Dans le cerveau, la MLT est catabolisée en N-acétyl-5-méthoxykénurénamine (Hirata et *al.*, 1974).

2. Sites d'action et fonctions physiologiques de la mélatonine

2.1. Les sites d'action de la mélatonine

La MLT synthétisée par la glande pinéale, libérée dans la circulation sanguine générale et dans le liquide céphalo-rachidien, peut donc agir aussi bien sur tous les organes périphériques que sur plusieurs structures centrales, du moins celles qui sont capables de lire ce message hormonal (structures qui contiennent des récepteurs spécifiques pour la MLT).

Les récepteurs de la MLT ont été identifiés et localisés grâce à l'utilisation d'un radioligand spécifique : la 2-[^{125}I]-mélatonine (I-MLT) (Vakkuri et *al.*, 1984; Vanecek et *al.*, 1987). Actuellement, 3 types de récepteurs de haute affinité (constante de dissociation inférieure à 200 pM) ont été clonés :

- **MT1** (Reppert et *al.*, 1994) : largement présent dans le système nerveux central des vertébrés. D'une espèce à l'autre, la distribution de ce type de récepteurs varie considérablement.
- **MT2** (Reppert et *al.*, 1995a) : localisé principalement dans la rétine mais aussi dans les SCN (Hunt et *al.*, 2001). Ces récepteurs ne sont pas fonctionnels chez certaines espèces (hamsters dorés et hamsters sibériens (Weaver et *al.*, 1996)).
- **$\mathbf{Mel_{1c}}$** (Ebisawa et *al.*, 1994): présent seulement chez les vertébrés non-mammaliens (Reppert et *al.*, 1995b).

En outre, un autre type de récepteurs de faible affinité (constante de dissociation entre 0,9 et 10 nM) (Duncan et *al.*, 1988) a également été décrit et nommé MT3 (Dubocovich et *al.*, 1998). Le clonage de ce récepteur a montré qu'il s'agissait de la quinone réductase 2, enzyme impliquée dans la détoxification (Nosjean et *al.*, 2000).

La localisation des récepteurs MT1 et MT2 a été décrite dans plusieurs structures cérébrales (SCN, cortex, hippocampe, IGL, PVT, PVN…) aussi bien que périphériques (rein, adipocytes, surrénales, vaisseaux sanguins…), (Viswanathan *et al.*, 1990; Masson-Pévet *et al.*, 1994a; Pévet, 2002; Poirel *et al.*, 2003) mais comme mentionné ci-dessus la distribution de ces récepteurs varie considérablement d'une espèce à l'autre.

Toutefois, ces récepteurs à haute affinité pour la MLT ont été retrouvés dans deux structures cérébrales, les SCN et la *pars tuberalis* de l'adénohypophyse chez quasiment tous les mammifères (Masson-Pévet & Gauer, 1994; Morgan *et al.*, 1994; Masson-Pévet *et al.*, 1996). Ceci suggère en particulier que la MLT pourrait réguler l'activité de l'horloge biologique endogène et moduler à la fois les fonctions circadiennes et saisonnières.

2.2. Rôles physiologiques de la mélatonine

Plusieurs rôles ont été attribués à la MLT y compris la synchronisation des fonctions circadiennes et saisonnières (Pévet, 2003b). Dans certaines conditions, la MLT joue un rôle dans l'entrainement de l'horloge circadienne principale (SCN) (Gillette & McArthur, 1996; Pévet, 2003b). De nombreux autres effets ont été décrits pour la MLT. Néanmoins, plusieurs d'entre eux restent encore à valider sur le plan physiologique. A des doses pharmacologiques (doses non physiologiques), cette hormone présente une action anti-oxydante (Reiter, 2003) en inhibant l'activité des enzymes pro-oxydantes comme l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique et en agissant également comme un chélateur de radicaux libres par son activation des enzymes telles que la superoxyde dismutase qui sont impliquées dans la dégradation des radicaux libres (Reiter et *al.*, 1995; Wetterberg, 1999). Un rôle immunostimulateur et anti-tumoral de la MLT doit aussi être considéré. *In vitro*, elle stimule l'activité des lymphocytes T de type CD4 *helper* ainsi que des cellules *natural killer*. La MLT augmenterait également les productions d'interleukine 2 et d'interféron γ (Cardinali & Pévet, 1998). A des doses physiologiques, la MLT peut ralentir la croissance de tumeurs (Bartsch et *al.*, 2000).

2.2.1. Rôle de la mélatonine dans le système circadien

2.2.1.a. Mélatonine endogène et rythmes circadiens

Comme évoqué précédemment, des récepteurs à la MLT ont été trouvés en grand nombre chez plusieurs mammifères, y compris l'Homme, dans les SCN (Vanecek *et al.*, 1987; Masson-Pévet *et al.*, 1994a). La synthèse rythmique de MLT est contrôlée par les SCN et constitue une sortie de l'horloge circadienne. Il existe donc, sur le plan fonctionnel, des interactions très fortes entre le système circadien et la MLT. Néanmoins, la MLT ne semble pas être directement impliquée dans la genèse des rythmes circadiens. En effet, l'ablation de la glande pinéale, qui abolit le rythme de MLT dans le plasma (Lewy et *al.*, 1980), n'affecte pas la période du rythme de l'activité locomotrice (Cheung & McCormack, 1982; Redman & Francis, 1998). En outre chez le tatou « *Dasypus novemcinctus* », un mammifère

naturellement dépourvu de glande pinéale, plusieurs rythmes circadiens sont exprimés régulièrement (Harlow et *al*., 1982). Pour une fonction donnée, même sans présence de MLT, le signal circadien peut toujours être distribué par d'autres efférences (nerveuses ou endocrines) de l'horloge, ce qui expliquerait le peu de modifications dans l'organisation circadienne survenant suite à une pinéalectomie (Buijs & Kalsbeek, 2001; Kramer *et al.*, 2001). Pourtant, les changements rythmiques de la concentration de MLT circulante, dépendants de la durée de la nuit, jouent un rôle essentiels dans l'organisation circadienne (Cassone, 1998; Stehle *et al.*, 2002; Pévet, 2003a). Suite à une pinéalectomie, la désynchronisation de plusieurs fonctions physiologiques a été décrite. Plusieurs études conduites chez les poissons (Sanchez-Vazquez et *al*., 2000), les lézards (Underwood, 1983; Bartell *et al.*, 2004) et les oiseaux (Oshima *et al.*, 1989; Heigl & Gwinner, 1999), montrent que l'ablation de la glande pinéale perturbe la rythmicité des fonctions comportementales sans les abolir. Chez des rats pinéalectomisés, le réentrainement du rythme d'activité locomotrice est modifié après un déphasage du cycle LD (Redman & Armstrong, 1988). En outre, la pinéalectomie induit une diminution de la fréquence de décharge des neurones des SCN (Rusak & Yu, 1993), supposant tout de même un rôle pour la MLT endogène. La MLT intervient également dans d'autres fonctions : par exemple, la réponse des cellules adipocytaires à l'insuline est modifiée après une pinéalectomie (Lima et *al.*, 1998). La glande pinéale peut être considérée comme un élément important du système circadien chez certains vertébrés (Menaker et *al.*, 1997; Underwood, 2001), mais elle ne pourrait pas remplacer les SCN dans sa fonction d'horloge biologique centrale capable de générer des rythmes circadiens.

En termes circadiens, le signal mélatoninergique sous le contrôle des SCN pourrait imposer la rythmicité circadienne à l'ensemble des structures possédant des récepteurs à la MLT (Pévet, 2002). Au niveau de la PT, la MLT contrôle directement l'expression circadienne des gènes horloges (von Gall et *al.*, 2005), notamment *Per1* (Messager et *al.*, 1999; Messager et *al.*, 2000) et *Cry1* (Dardente et *al.*, 2003). En effet, l'ablation de la glande pinéale abolit l'expression rythmique de ces gènes (Messager et *al.*, 2001) et l'administration de MLT engendre leur induction dans la PT (Dardente et *al.*, 2003). Cette régulation par la MLT de l'expression circadienne des gènes horloges dans la PT (structure dépourvue de connections nerveuses avec les SCN), laisse suggérer que le signal mélatoninergique pourrait éventuellement entrainer des oscillateurs périphériques présentant des récepteurs à MLT. Récemment, Torres-Farfan et ses collaborateurs (2011) ont montré, dans des cultures de surrénales fœtales, que la MLT induit un changement de phase dans le cycle de 24h

d'expression des gènes *Bmal1* et *Per2*. Ce résultat démontre que le pouvoir synchroniseur de la MLT sur les oscillateurs périphériques est possible et ouvre de nouvelles perspectives pour le futur.

La présence de récepteurs MT1 et MT2 dans les SCN implique aussi que la MLT utilisé comme drogue à la capacité d'agir même sur le fonctionnement de l'horloge centrale.

2.2.1.b. Mélatonine exogène et rythmes circadiens

Administrée quotidiennement au début de la nuit subjective à des doses pharmacologiques, la MLT exogène entraine à 24 heures les rythmes circadiens de Tb, d'activité locomotrice et de prise de boisson chez des rongeurs maintenus en DD (Redman *et al.*, 1983; Redman & Armstrong, 1988; Pitrosky *et al.*, 1999; Slotten *et al.*, 2002a). Toutefois, la MLT n'a d'effet sur l'entrainement des rythmes que dans une fenêtre temporelle étroite. Plus précisément, l'entrainement de l'horloge est visible uniquement lorsque le moment de l'administration de MLT coïncide avec le début de l'activité pour les espèces nocturnes (**Figure 15A**) et la fin de l'activité pour les espèces diurnes (**Figures 15B**). Cette action synchronisatrice de la MLT passe par un effet direct sur les SCN. En effet, *in vitro* la MLT provoque une avance de phase du rythme de l'activité électrique des SCN et inhibe la fréquence de décharge ainsi que l'excitabilité des neurones des SCN (Shibata *et al.*, 1989; Stehle *et al.*, 1989; McArthur *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997; McArthur *et al.*, 1997; van den Top *et al.*, 2001). En (1987) puis en (1988) Cassone et ses collaborateurs ont également rapporté une diminution du métabolisme énergétique des SCN après une injection sous cutanée de la MLT.

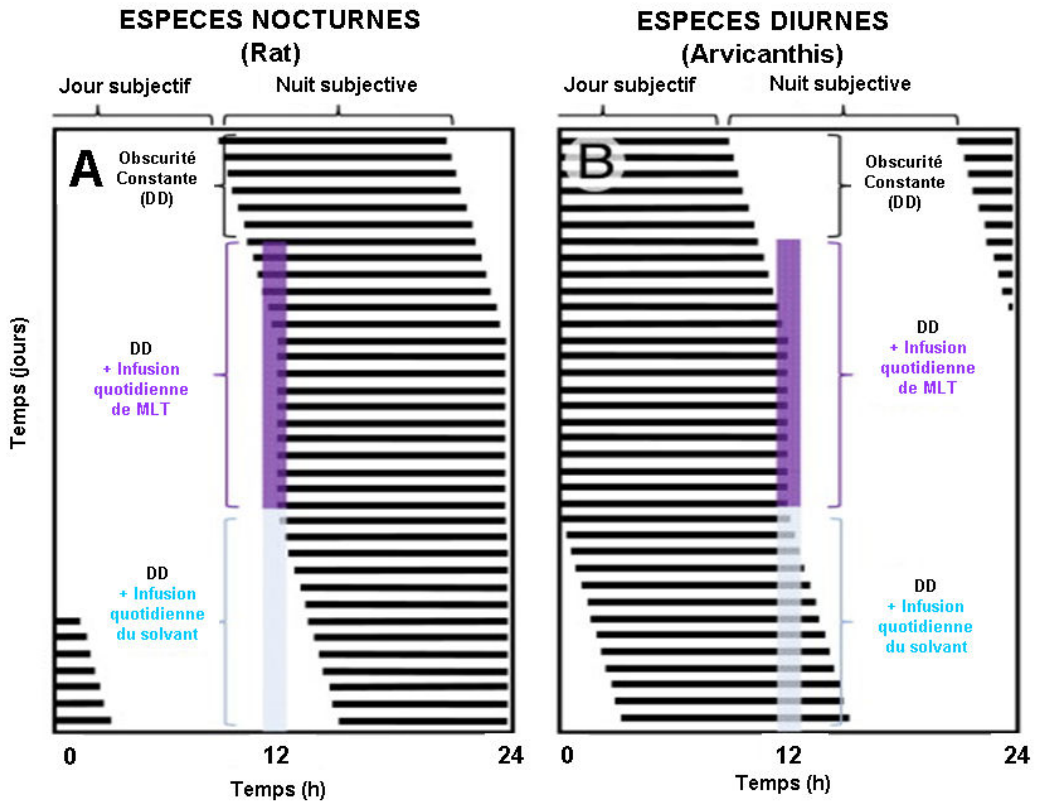

Figure 15 : Actogramme représentant l'entrainement du rythme de l'activité locomotrice par l'administration quotidienne de mélatonine exogène.

Chez le rat (espèce nocturne) (A) placé en obscurité constante (DD), l'administration quotidienne de MLT entraine le rythme d'activité locomotrice quand l'infusion coïncide avec le début de l'activité. Chez une espèce diurne (Arvicanthis) placée en DD, l'effet de la MLT s'observe quand l'administration de l'hormone coïncide avec la fin de l'activité. Dans les deux expériences, le libre cours reprend quand l'administration de MLT est arrêtée.

Modifié d'après Pévet et Challet (2011)

Ces résultats montrent que **la MLT exogène est capable de synchroniser les rythmes circadiens, c'est une hormone dite chronobiotique** (Pévet *et al.*, 2002; Arendt & Skene, 2005). La MLT est également capable d'imposer une période différente de 24-h démontrant ainsi sa puissance comme synchroniseur non photique (Pitrosky et *al.*, 1999; Slotten et *al.*, 2002b). C'est cette dernière observation qui ouvre de grands perspectives sur le plan clinique car il devient envisageable, grâce à la MLT, de pouvoir agir sur les rythmes circadiens. Chez l'Homme, ses propriétés de resynchronisation sont utilisées pour aider à traiter les troubles issus d'une désorganisation temporelle comme chez certains aveugles, ou bien lors de vols transméridiens (*jet-lag*) ou de travail posté (Claustrat *et al.*, 1996; Arendt *et al.*, 1997).

2.2.2. Rôle de la mélatonine dans le système saisonnier

Pour survivre, les êtres vivants doivent s'adapter et anticiper les changements physiques de l'environnement. En effet, la plupart des animaux à reproduction saisonnière utilisent principalement les changements graduels de la durée du jour (photopériode) au cours de

l'année pour se repérer et ainsi anticiper les variations environnementales grâce au système de mesure du temps qu'est le rythme de sécrétion de MLT contrôlé par les SCN (Pévet, 1988; Malpaux *et al.*, 1999; Malpaux *et al.*, 2001; Pévet, 2003b).

2.2.2.a. La reproduction saisonnière

La saison de reproduction varie énormément d'une espèce à une autre voire même d'une race à l'autre et d'une latitude à l'autre. Chez les mammifères, il est possible de discerner deux types de réponses photopériodiques : les espèces, dont l'activité sexuelle est stimulée par une photopériode courte ou décroissante (e.g. mouton dans les régions tempérés, dromadaire) et les espèces chez lesquelles cette activation est liée à une photopériode longue ou croissante (e.g. hamster doré, hamster d'Europe). Si cette notion simple est vraie sur un plan descriptif, il semble que les mécanismes impliqués dans les variations photopériodiques soient beaucoup plus complexes. En effet, dans chaque cas il existe une photopériode critique en dessous ou au dessus de laquelle les animaux sont sexuellement inactifs ou actifs. La valeur de la photopériode critique est propre à chaque espèce.

Chez le hamster doré, cette photopériode critique correspond à un temps d'éclairement égal à 12h30 par jour (Elliott et *al.*, 1972). En dessous de cette valeur, l'organisme interprète le signal lumineux comme une photopériode courte (SP) et il en résulte un arrêt de l'activité sexuelle se manifestant par une diminution de la biosynthèse des hormones gonadiques et une régression des gonades suivie par l'appariation des périodes d'hibernation (Darrow et *al.*, 1988).

Chez les dromadaires mâle et femelle, l'activité sexuelle se produit en générale durant la période où les températures sont basses et les pluies abondantes (Yasin & Wahid, 1957; Musa & Abusineina, 1978; Chen & Yuen, 1979; Skidmore, 2011). Ainsi dans le contexte marocain, la saison de reproduction correspond à la période allant de mi-novembre à mi-avril (80% à 90% des saillies) (Sghiri & Driancourt, 1999). Elle s'étend du mois de mars au mois d'août au Soudan et de novembre au mois d'avril en Arabie Saoudite (Tibary & Anouassi, 1996). Toutefois aux Emirats Arabes Unis, Tibary et Anouassi (1997) ont rapporté que certaines chamelles présentent une activité ovarienne durant toute l'année.

Les facteurs environnementaux contrôlant la saisonnalité de reproduction chez le dromadaire ne sont pas encore définis. Certaines variations de l'environnement telles que les précipitations, la Ta et l'humidité ont été suggérées comme étant des facteurs qui pouvaient être impliqués. Toutefois, il a été démontré que le dromadaire est capable de mesurer et

d'intégrer les variations photopériodiques (El Allali et *al.*, 2005). Chez cette espèce saisonnière, on ne sait pas encore si la réponse photopériodique dépendrait d'une photopériode critique.

2.2.2.b. Rôle de la mélatonine dans la traduction des effets du signal photopériodique sur la fonction de reproduction

La durée du pic nocturne de MLT représente globalement la longueur de la nuit qui varie selon les saisons (Karsch, 1986; Pévet, 2003b). Ainsi, la MLT constitue le relais endocrine qui permet d'intégrer les variations photopériodiques et donc de synchroniser l'axe sexuel avec les variations photopériodiques annuelles. L'implication du rythme circadien de la sécrétion de la MLT dans la traduction des effets du signal photopériodique sur la synchronisation de la reproduction a été formellement établie chez de nombreuses espèces, par différentes approches telles que la pinéalectomie, les injections de MLT exogène, ou encore l'utilisation d'implants de MLT assurant une administration chronique de cette hormone.

La MLT contrôle directement l'axe de reproduction, puisqu'une pinéalectomie annule l'effet de la photopériode sur l'activité sexuelle et la sécrétion de la prolactine (PRL) chez la brebis (Bittman et *al.*, 1983a). De plus, l'administration de MLT à des brebis pinéalectomisées (Bittman et *al.*, 1983b) ou inhibées par des jours longs (Malpaux et *al.*, 1993), selon un profil mimant la sécrétion en jours courts, induit une stimulation de l'activité sexuelle.

Chez les chamelles, après la parturition, la reprise de l'activité ovarienne varie en fonction de la disponibilité alimentaire et du type de l'élevage. Ainsi, des durées de 25 à 45 jours sont observées chez des femelles en lactation et en stabulation (Zhao et *al.*, 2001). En moyenne, un intervalle de 4,5 à 10 mois est noté pour l'apparition des premières chaleurs après la mise-bas. Toutefois, il est intéressant de noter que l'administration continue de MLT par des implants sous cutanés permet de stimuler l'activité sexuelle et la croissance folliculaire chez des chamelles allaitantes deux mois avant leur saison de reproduction naturelle (après 7 semaines un follicule ovulatoire (≥ 1cm) a été observé chez 83,3% des chamelles receveuses d'implants de MLT) (Dholpuria et *al.*, 2012). Cette méthode est utilisée essentiellement en élevage des ovins et des caprins pour favoriser la reproduction en contre-saison (Guillaume *et al.*, 1995; Chemineau *et al.*, 1996).

Chez le hamster syrien, (*Mesocricetus auratus*) reproducteur lors de jours longs, la pinéalectomie inhibe l'atrophie des gonades induite par une SP. Des infusions de MLT exogène d'une durée équivalente à un signal de type SP (6h) à des hamsters syriens préalablement pinéalectomisés et entrainés par une LP provoquent une décroissance de la taille des testicules, tandis que des infusions dont la durée correspond à un signal de type LP (16h) n'induisent aucun effet. (Bartness et *al.*, 1993). Des injections de MLT effectuées en fin de jour à des hamsters syriens non pinéalectomisés et placés en LP, permettant de prolonger la durée totale du signal mélatoninergique, provoquent la régression testiculaire (Tamarkin *et al.*, 1976; Tamarkin *et al.*, 1977; Gauer *et al.*, 1994). Cependant, des injections réalisées en début de jour n'ont pas d'effet, ce qui incite à se demander si la durée du signal mélatoninergique est importante ou bien s'il y a existence d'un rythme de sensibilité à la MLT (la présence de MLT à un moment précis du cycle LD est déterminante). Ce rythme de sensibilité à la MLT ne dépend pas directement de l'horloge centrale puisque les effets de la MLT exogène persistent après lésion des SCN. Il a été mis en évidence que ce rythme est entraîné par la MLT elle-même (Pitrosky *et al.*, 1995; Pévet *et al.*, 1999). En effet, chez des hamsters syriens pinéalectomisés et placés en LP ou SP, l'administration quotidienne de deux infusions consécutives de MLT exogène en sous-cutané pendant 2h30 et séparées par une période de 3h entraîne en 8 semaines une atrophie testiculaire similaire à celle observée chez des animaux maintenus en SP, quel que soit le moment des infusions. Toutefois, ce n'est pas le cas lorsque les deux infusions sont séparées de 5h30 (Pitrosky et *al.*, 1995). Selon ce protocole, le premier signal d'infusion permet d'entrainer le rythme de sensibilité à la MLT et l'involution des testicules est observée quand le second signal d'infusion coïncide d'une manière temporelle avec cette période de sensibilité. Ces résultats montrent bien que la présence du signal mélatoninergique à des moments précis du cycle LD semble être l'élément déterminant dans la reproduction saisonnière, au moins chez le hamster syrien.

Selon les espèces, la MLT agirait sur différentes cibles hypothalamiques dont le but est de contrôler la fonction de reproduction saisonnière, toute en intégrant les variations photopériodiques traduites sur l'année sidérale.

IV. Les oscillateurs périphériques

Depuis la fin des années 1990, le clonage des différents gènes composant la machinerie moléculaire de l'horloge centrale a pu montrer chez les mammifères que ces gènes s'expriment dans plusieurs autres structures centrales et périphériques. La première

démonstration directe de la présence d'un oscillateur dans un tissu isolé chez les mammifères a été obtenue sur des explants de la rétine de hamsters doré (Tosini & Menaker, 1996). Bien qu'elles sont isolées, l'activité des rétines, en particulier la synthèse et la libération de MLT, est rythmique en culture et entrainable par la lumière (Tosini & Menaker, 1996; 1998). Tous les gènes horloges décrits dans les SCN sont présents dans la rétine avec cependant des différences dans les profils d'expression (Miyamoto & Sancar, 1998; Tosini & Fukuhara, 2002). Tous ces résultats démontrent formellement que la rétine possède son propre oscillateur circadien moléculaire.

A côté des structures centrales, d'autres résultats mettent en évidence l'existence d'une expression rythmique des gènes horloges dans la majorité des tissus périphériques dont le foie, le tissu adipeux, le cœur, les muscles, les reins et la peau (Balsalobre *et al.*, 1998; Storch *et al.*, 2002; Oishi *et al.*, 2003; Noshiro *et al.*, 2005; Sandu *et al.*, 2012). Ces structures qui présentent des oscillations journalières des gènes horloges en dehors des SCN ont été nommées **oscillateurs périphériques**, en opposition à l'horloge centrale localisée dans les SCN.

Il a été montré que les SCN ont un rôle de chef d'orchestre, synchronisant les différentes horloges périphériques (Yoo et *al.*, 2004). En effet, en culture l'activité oscillatoire des tissus périphériques ne persiste que quelques jours alors que celle des SCN persiste jusqu'à plusieurs mois (Balsalobre et *al.*, 1998; Yamazaki et *al.*, 2000). En outre, en l'absence des SCN, l'expression génique circadienne est très perturbée dans les tissus périphériques (Sakamoto et *al.*, 1998) montrant ainsi que les oscillateurs périphériques oscillent sous l'influence de l'horloge centrale des SCN (Balsalobre, 2002). Néanmoins, les oscillateurs périphériques peuvent aussi être synchronisés par des signaux circadiens efferents exemple, la prise alimentaire (Challet, 2007).

V. Homéostasie et rythme circadien : exemple de la régulation de la température corporelle

Le concept d'homéostasie semble être le concept le plus important en physiologie. Le terme d'homéostasie fut introduit en biologie par Claude Bernard au début du 20^{éme} siècle et fut par la suite repris par l'américain Walter Bradford Cannon qui définit l'homéostasie comme étant « *l'ensemble des processus organiques qui agissent pour maintenir l'état stationnaire de l'organisme, dans sa morphologie et dans ses conditions intérieures, en dépit des perturbations extérieures* » (Durand, 1979). D'une manière plus simple, l'homéostasie

correspond à la capacité de l'organisme de maintenir un état de stabilité relative des différentes composantes de son milieu interne, et ce, malgré les changements constants de l'environnement externe. Dans le corps, l'homéostasie s'applique à de nombreux processus physiologiques tels que la régulation de l'osmolarité, la natrémie, la glycémie, la pression artérielle. La thermorégulation consiste en un ensemble de mécanismes endogènes (physiologiques, morphologiques et comportementaux) capables de maintenir une température particulière en dépit des variations environnementales. La régulation de la Tb constitue la forme la plus perfectionnée du concept d'homéostasie. Cette régulation peut s'observer chez la grande majorité des êtres vivants (Bicego et *al*., 2007). Dans les paragraphes précédents, nous avons rapporté que, dans des conditions environnementales constantes, les variables physiologiques ne sont pas maintenues constantes mais sont exprimées selon un rythme circadien régulier. La rythmicité circadienne contredit clairement le concept de la fixité du milieu intérieur. Durant les 20 dernières années, plusieurs chercheurs se sont intéressés systématiquement à l'étude de l'intégration homéostatique et les processus circadiens dans la physiologie régulatrice. En ce qui concerne la régulation de la Tb, les thermo-physiologistes et les chrono-biologistes ont ignoré les travaux les uns des autres pendant plusieurs siècles. Claude Bernard définit la vie comme un conflit entre un organisme et son milieu immédiat, reposant sur une série de réactions chimiques catalysées par des enzymes. La cinétique de ces réactions chimiques dépend de la température. Sur notre planète, la température ambiante présente de grands écarts aux différentes latitudes : en allant des régions polaires vers les déserts tropicaux, les températures varient de très loin en-dessous de zéro à 50 °C ou plus. De plus, à la même latitude, les températures ambiantes montrent également des variations journalières et saisonnières. Ceci montre clairement que les organismes vivants doivent développer des mécanismes afin de s'adapter aux changements thermiques de l'environnement. Cette adaptation peut être réalisée selon deux voies : *via* l'augmentation de la tolérance aux variations de la température ou encore par une régulation active de la Tb. La plupart des organismes ne possèdent pas la faculté de réguler activement leur Tb ou ils la régulent dans certaines limites, mais ils sont parfaitement adaptés aux variations thermiques de l'environnement. Par exemple, de nombreux poissons de l'Antarctique passent leur vie avec une Tb proche de la température de congélation (Montgomery & Macdonald, 1990) et certaines archéobactéries survivent et se développent à des températures qui peuvent dépasser 120°C (Kashefi & Lovley, 2003). Comme exemple d'adaptation, certains vertébrés inférieurs (poissons, reptiles, amphibiens) ne se laissent pas geler durant l'hiver puisqu'ils possèdent dans leur sang des protéines antigel (Fletcher et *al*.,

2001). Le rythme de la Tb présente de grandes variations interspécifiques (régulation thermique différentielle). Il est donc nécessaire dans le domaine de la chronobiologie de distinguer les espèces **endothermes** des espèces **ectothermes** (Refinetti & Menaker, 1992). Les espèces **homéothermes** sont des organismes dont le milieu intérieur conserve une Tb constante, indépendamment du milieu extérieur, et on parle d'homéostasie thermique. La plupart de ces espèces sont des **endothermes** c'est-à-dire que leur chaleur est le résultat du métabolisme et donc provient du milieu interne. C'est le cas de la plupart des mammifères et de certains oiseaux. Dans cette catégorie, la rythmicité de la Tb est stable, de nature endogène et apparemment indépendante des variations de la Ta et des autres facteurs de l'environnement. Ces espèces peuvent exercer leurs activités usuelles dans un intervalle important de variation de la température externe. Les espèces **poïkilothermes** sont des animaux ayant une Tb qui varie en fonction de la température externe. La pluparts de ces espèces sont des **ectothermes**, c'est-à-dire que les oscillations de la Tb sont principalement générées par des changements du gradient thermique imposés par la Ta. Ces espèces ont des stratégies comportementales qui leur permettent de réguler leur température, comme par exemple le serpent qui s'expose au soleil. En plus de ces catégories de thermorégulation, on trouve quelques exceptions. A titre d'exemple, les colibris et les chauves-souris sont des **endothermes-poïkilothermes** capables de suspendre leur thermorégulation pendant les périodes nocturnes et hivernales. A l'inverse, les poissons sont le plus souvent des **ectothermes-homéothermes** : leur Tb varie très peu car elle se trouve régulée par la stabilité thermique de leur milieu de vie marin. Finalement les espèces **hétérothermes** sont des **homéothermes** qui, sous certains conditions physiologiques particulières, deviennent **poïkilothermes** voire **ectothermes** : c'est le cas du dromadaire déshydraté et placé sous un stress thermique. Le dromadaire est un **homéotherme non strict** (Schmidt-Nielsen, 1964b). Il est connu depuis longtemps que cet animal présente un état de parfaite **homéothermie** quand il est hydraté. Par contre, dans un état de déshydratation et sous un stress thermique, l'amplitude du rythme de sa Tb devient très importante (6-8 °C, entre le matin et le soir), et suit celle de la Ta, traduisant ainsi un état de **poïkilothermie**. Selon la disponibilité de l'eau et la Ta, le système de thermorégulation chez le dromadaire bascule entre l'homéothermie et la poïkilothermie : il s'agit donc d'un **hétérotherme**. Ce processus d'adaptation à la déshydratation permet au dromadaire de réduire ses dépenses énergétiques et d'économiser ses pertes hydriques (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957; Schmidt-Nielsen, 1964b; Schmidt-Nielsen et *al.*, 1967).

De point de vue thermophysiologique et chronobiologique, la Tb est contrôlée par deux systèmes : l'un homéostasique et l'autre circadien. Le concept de la régulation circadienne de la Tb a été longtemps contesté. Le contrôle du rythme de la Tb par les SCN a été difficile à établir. Plusieurs auteurs suggéraient que la génération du rythme de la Tb était la conséquence d'une production cyclique de la chaleur métabolique résultant des autres rythmes, en particulier celui de l'activité locomotrice. Evidement, chez un animal ayant une activité locomotrice nocturne, sa Tb est plus élevée la nuit lorsqu'il est actif, et basse le jour à cause du repos. Toutefois, des lésions partielles des SCN provoquant des arythmies de l'activité locomotrice, n'entrainent pas obligatoirement des arythmies de la Tb (Satinoff & Prosser, 1988; Refinetti *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que le rythme de la Tb n'est pas une conséquence du rythme de l'activité locomotrice. Cependant, une lésion totale des SCN abolit ces deux rythmes, démontrant ainsi que le rythme de la Tb est également sous le contrôle des SCN (Eastman *et al.*, 1984; Refinetti *et al.*, 1994; Osborne & Refinetti, 1995).

A côté des SCN, une autre structure hypothalamique, la POA, semble être impliquée dans le contrôle de la thermorégulation (Satinoff *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1998). Comme c'est rapporté plus haut (paragraphe 3.2.1.a), cette structure cérébrale reçoit des afférences provenant des SCN (Watts *et al.*, 1987; Kalsbeek *et al.*, 1993). En effet, une lésion de la POA provoque une augmentation de l'amplitude du rythme de la Tb (Osborne & Refinetti, 1995). Ce résultat démontre bien que la POA est fortement impliquée dans le contrôle homéostatique de la Tb.

CHAPITRE II. ENTRAINEMENT DE L'HORLOGE CIRCADIENNE CHEZ LE DROMADAIRE

I. Introduction

II. L'activité locomotrice ne génère pas le rythme de la Tb

III. Présence d'une horloge circadienne endogène chez le dromadaire

IV. Démonstration de l'entrainement par le cycle LD et par le cycle de la Ta

V. Peut-on considérer le rythme de la Tb comme une sortie fiable de l'horloge pour étudier les propriètés circadiennes de l'horloge biologique ?

Après mon Doctorat Vétérinaire (obtenu en 2008), j'ai participé activement en tant que stagiaire aux expérimentations menées dans le cadre de la préparation du doctorat du Pr. El Allali khalid soutenu en 2009 et dont les résultats ont fait l'objet de cette publication : « *K. El Allali, M.R. Achaaban, B. Bothorel, M. Piro,* ***H. Bouâouda****, M. El allouchi, M. Ouassat, A. Malan and P. Pévet. (2013). Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol (304), 1044-1052* ». Comme je suis auteur de ce travail qui a permis de poser les questions constituant la base d'une partie de mon projet de thèse, j'ai développé dans cette partie d'introduction les résultats obtenus.

I. Introduction

Dans les zones arides et désertiques, les êtres vivants sont exposés à des conditions environnementales extrêmes. Dans ce contexte en plus des changements de la photopériode, la Ta présente des variations très importantes aussi bien à l'échelle journalière que saisonnière. Ceci nous a incités à réfléchir si les fluctuations cycliques de la Ta pourraient contribuer à la synchronisation des rythmes circadiens spécialement chez le dromadaire. Dans notre étude (El Allali et *al.*, 2013), nous avons sélectionné le rythme de Tb ainsi que le rythme de sécrétion de MLT comme sorties de l'horloge. Le rythme de Tb a été largement étudié en chronobiologie (Refinetti & Menaker, 1992; Refinetti, 2010a). Il est généralement utilisé avec d'autres rythmes pour les études de la synchronisation et la désynchronisation de l'horloge endogène (Kelly, 2006). Ce rythme présente ainsi un intérêt à la fois pour les chrono-biologistes, afin d'étudier les propriétés de l'horloge biologique et les thermo-physiologistes, afin de déceler les mécanismes de régulation thermique et le maintien de l'homéostasie. Actuellement, il est admis par consensus l'utilisation du terme « température corporelle » pour toute température relever dans un site anatomique où la température est proche de la température profonde du corps (intracardiaque). Habituellement, celle de la cavité intra abdominale est la plus utilisée (Refinetti, 2010a).

L'objectif majeur de cette étude était de démontrer l'existence d'une horloge circadienne endogène chez les dromadaires puis d'étudier les mécanismes d'entrainement par les facteurs environnementaux ; le cycle LD et les cycles de Ta. A travers ces expérimentations, nous voulions également vérifier si le rythme de Tb peut être considéré comme une sortie fiable de l'horloge pour étudier les propriétés circadiennes de l'horloge principale.

II. L'activité locomotrice ne génère pas le rythme de la Tb chez le dromadaire

Afin d'étudier le lien potentiel de causalité entre le rythme d'activité locomotrice et le rythme de Tb, le rythme journalier de Tb a été étudié chez 6 chamelles maintenues sous des conditions environnementales naturelles et dont l'activité locomotrice était totalement restreinte pendant 3 jours consécutifs (expérience 1). Les mesures de Tb ont été effectuées toutes les 2 heures avec un thermomètre digital d'une échelle de lecture allant de 32°C à 42°C et d'une sensibilité de 0.1°C. Les relevés de Ta ont été réalisés par 3 thermomètres à mercure 'France Styl Thermo' avec une sensibilité de 0.1°C, placés dans 3 différents endroits dans l'étable. La lecture de la température a été réalisée toute les 2 heures, simultanément avec la prise de la température rectale.

Le résultat obtenu montre l'existence d'un rythme journalier de la température rectale (**Figure 16**), caractérisé par une moyenne de 37.91 ± 0.27°C, une amplitude 2.50 ± 0.43°C, une acrophase à 18h00 (18.0 ± 0.43) et une période exacte de 24-h. Le rythme de la température rectale présente des valeurs minimales observées au début du jour, dans les environs de 08h00 du matin. Une augmentation progressive de la température rectale est notée au cours de la journée pour atteindre les niveaux les plus élevées au début de la soirée vers 18h00. Durant la nuit, cette température commence à descendre pour atteindre les niveaux les plus faibles, observés au début de la matinée. En examinant les courbes de la température rectale et de Ta (**Figure 16**), un déphasage entre les deux rythmes a été noté.

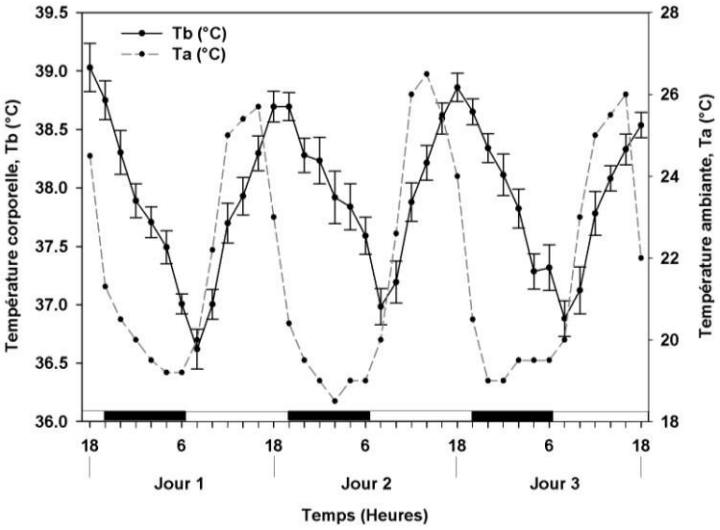

Figure 16 : Rythme journalier de la température rectale des chamelles en absence d'activité locomotrice.

Les chamelles ont été placées dans des conditions environnementales naturelles (photopériode et température ambiante) et dont l'activité locomotrice a été complètement restreinte (décubitus sternal). La courbe de la température rectale est représentée par une ligne continue. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne de 6 chamelles ±SEM. La courbe de la température ambiante est représentée par une ligne pointillée. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité.

El Allali et *al.*(2013)

En effet, la température rectale commence sa phase descendante 4h après celle de Ta. Pendant que la Ta diminue rapidement au début de la nuit, pour qu'ensuite se stabilise dans un

intervalle à faible variation 19 à 20.5°C durant 10 à 12 heures, la température rectale diminue progressivement jusqu'au matin. Sans nier les effets potentialisateurs de l'activité physique, les résultats obtenus montrent que le rythme de Tb chez le dromadaire n'est pas généré par les variations cycliques de la chaleur métabolique, dégagée par un rythme de l'activité locomotrice et qu'un rythme journalier existe bien.

III. Présence d'une horloge endogène chez le dromadaire

La nature circadienne du rythme de Tb chez le dromadaire a été démontrée sous des conditions constantes et en utilisant un thermomètre digital (**Figure 17**). Les résultats obtenus montrent que sous une photopériode naturelle et une Ta fixe (phase I), un rythme journalier de température rectale existe avec une période de 24-h et que ce rythme persiste avec une période de 24.5-h, quand les animaux ont été placés sous les conditions constantes de la phase II. La persistance de ce rythme sous les conditions constantes de photopériode (DD) et de Ta (22°C), démontre la nature circadienne de ce rythme et donc l'existence d'une horloge biologique endogène chez le dromadaire.

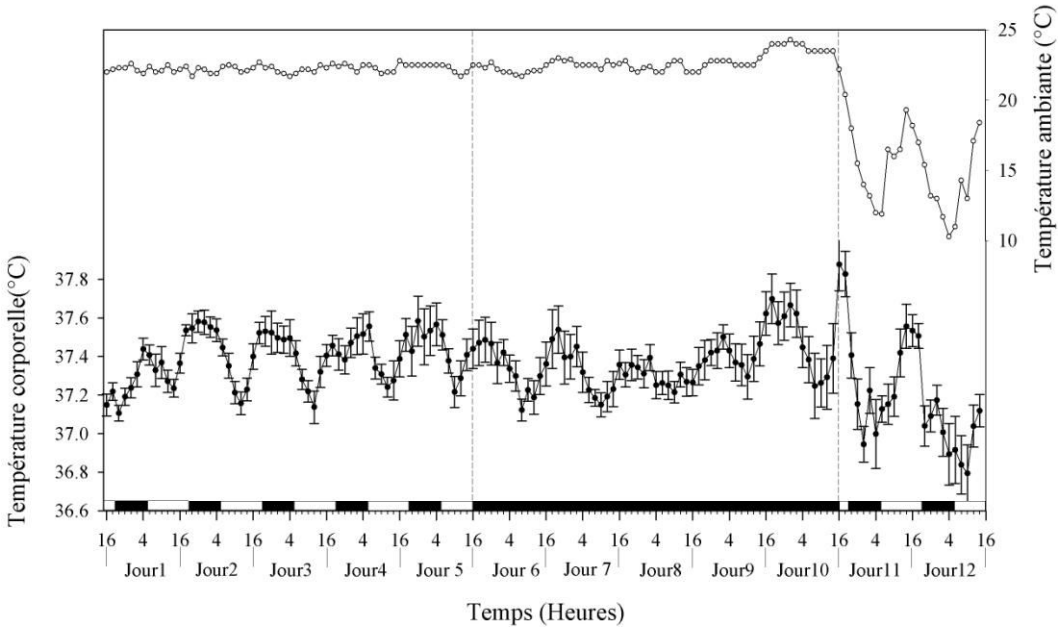

Figure 17 : Rythme moyen de la température rectale des chamelles mantenues dans une expérience mettant en œuvre des conditions constantes.

Les chamelles ont été placées sous les différentes conditions des 3 phases de cette expérience. Phase I : photopériode naturelle et température ambiante fixe, phase II : conditions constantes, phase III : remise des animaux à l'extérieur sous les conditions naturelles de l'environnement. La courbe de la température rectale est représentée par une ligne à cercle plein. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des huit chamelles ± SEM. La courbe de la température ambiante est représentée par une ligne à cercle vide. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus, montrent les moments de changement des conditions expérimentales. Durant la phase I, la période : 24.0 ± 0.01h, acrophase : 0 :12 ± 17 min, l'amplitude : 0.86 ± 0.16°C et la moyenne : 37.39 ± 0.13°C. Sous les conditions constantes de la phase II : la période : 24.5 ± 0.05h, acrophase : 21 :24 ± 36 min, l'amplitude : 1.21 ± 0.16°C et la moyenne : 37.37 ± 0.12°C.

El Allali et *al.*(2013)

En remettant les chamelles à l'extérieur, sous les conditions naturelles de photopériode et de Ta (phase III), le rythme de la température rectale récupère sa période de 24-h. L'amplitude du rythme de la température rectale augmente de 1.21± 0.16°C (phase II) à 2.50± 0.35°C (phase III). Ceci a permis de suggèrer que la Ta peut également affecter directement l'amplitude du rythme circadien de la température rectale.

Plusieurs études antérieures ont démontré l'existence d'un rythme journalier de Tb chez le dromadaire (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957; Schmidt-Nielsen, 1964b). Cet animal possède un système de thermorégulation très flexible, basculant entre l'homéothermie et la poïkilothermie en fonction de la disponibilité de l'eau et les conditions climatiques de son environnement immédiat. Toutefois, chez le dromadaire la nature du rythme de Tb n'était pas connue. Les résultats d'El Allali et *al.* (2013), démontrent que le rythme journalier de Tb chez le dromadaire, persiste sous les conditions constantes de température ambiante et de photopériode (LL et DD) avec une période proche de 24-h. Donc chez le dromadaire, comme chez les autres mammifères y compris l'Homme (Aschoff *et al.*, 1967; Wever, 1980; Satinoff *et al.*, 1982; Pickard *et al.*, 1984; Kuwabara *et al.*, 1986; Piccione *et al.*, 2002) le rythme de Tb est un rythme circadien généré par l'horloge biologique centrale.

IV. Démonstration de l'entrainement par le cycle lumière-obscurité et par le cycle de la température ambiante

4.1. Entrainement du rythme de température corporelle par le cycle lumière-obscurité

Après avoir démontré l'existence d'une horloge biologique endogène chez le dromadaire, l'étape suivante était de vérifier l'existence d'un entrainement du rythme de Tb chez cet animal par un facteur exogène, dans ce cas le cycle LD. Cette démonstration se base sur la mise en évidence d'un changement progressif de la phase du rythme induit par une avance de 6 heures sur le cycle LD. L'évolution du rythme de Tb enregistré par les capteurs Ibutton® en fonction du temps durant la phase I, II et III de cette expérience est représentée dans la **Figure 18**.

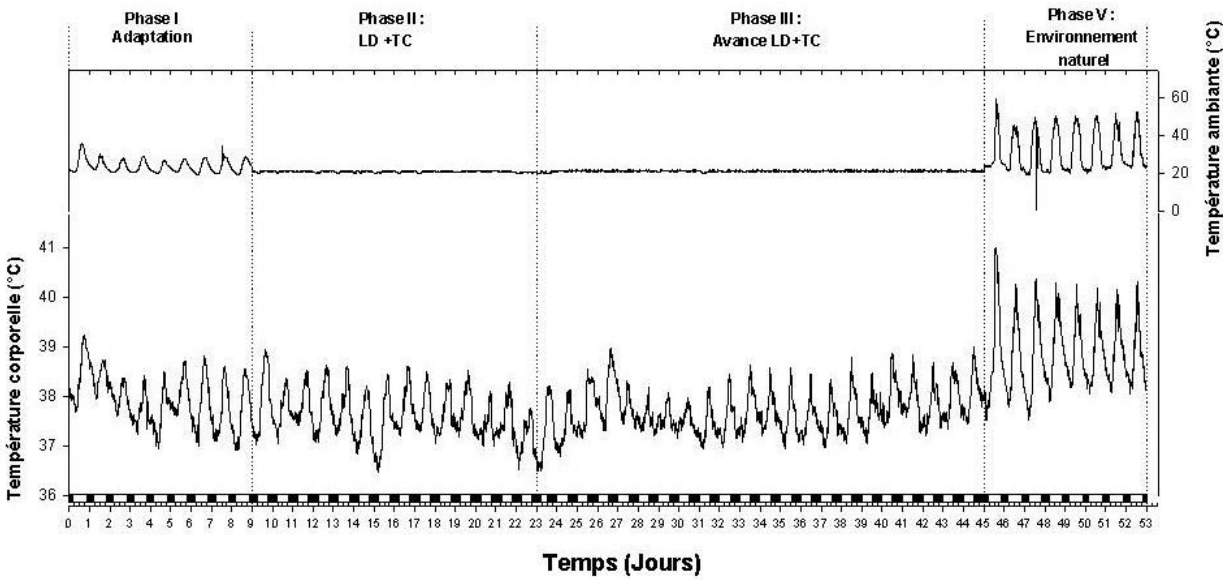

Figure 18 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience démontrant l'entrainement du rythme de la Tb par le cycle LD.

Les chamelles ont été placées sous les différentes conditions des 4 phases de cette expérience. Phase I : adaptation des chamelles à l'étable, phase II : cycle artificielle lumière-obscurité et température constante, phase III : avance de phase de 6 heures sur le cycle lumière-obscurité et température ambiante constante et phase IV : animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des sept chamelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 53 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus, montrent les moments de changement des conditions expérimentales.

El Allali et *al.*(2013)

L'application pendant la phase II et III, d'une photopériode artificielle (LD 12:12) et une Ta constante a permis de confirmer encore une fois que le rythme de Tb chez le dromadaire n'est pas généré par les variations de Ta. Toutefois, l'amplitude du rythme de Tb est plus importante durant la phase IV. Ceci suggère encore une fois que la Ta peut affecter directement l'amplitude du rythme de Tb. Durant la phase I, l'amplitude était de 0.71±0.24°C, elle était de 0.63±0.08°C durant la phase II, de 0.73±0.08°C durant la phase III, pour passer à 3.55±0.28°C sous les conditions environnementales naturelles de la phase IV. La moyenne était de 37.78±0.28°C, 37.59±0.24, 37.86±0.25 et 38.86±0.13°C, respectivement pour les phases I, II, III et IV. La moyenne devient plus élevée quand les chamelles ont été placées à l'extérieur et soumises aux conditions naturelles de l'environnement avec des températures plus élevées d'été (mois de juillet).

Les courbes de 24h, calculées pendant les 5 derniers jours de la phase II et la phase III, en moyennant pour les 7 chamelles les Tb enregistrées à un moment "x" de la journée sont représentées dans la **Figure 19**. Les courbes montrent que l'application d'un cycle artificiel de photopériode (LD 12:12) et une Ta fixe (phase II), induit une acrophase du rythme de Tb juste avant (2 heures) la transition lumière-obscurité. L'avance de phase de 6 heures sur le début de

la période obscure du cycle LD durant la phase III, entraine une avance de phase de 4 heures (le pic apparait avant la transition du cycle LD). Cette avance est estimée sur la courbe moyenne de la **Figure 19**.

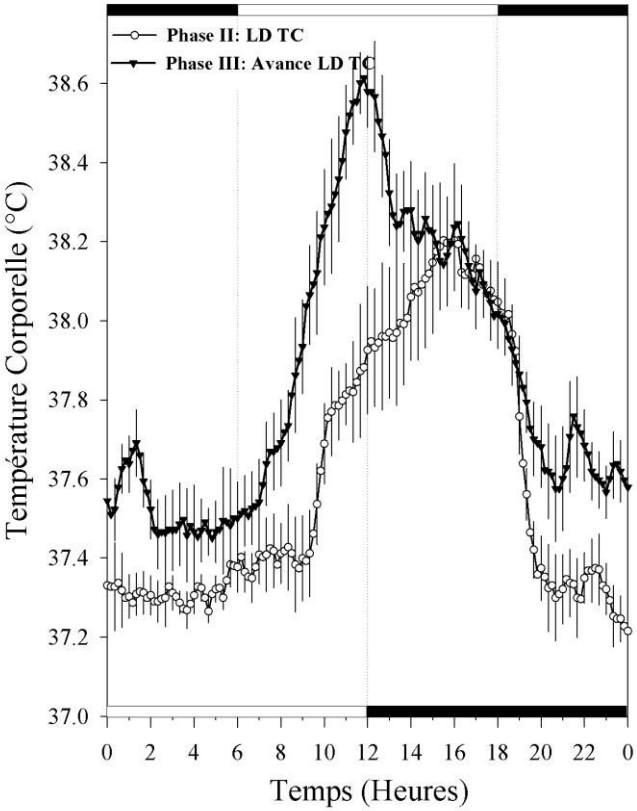

Figure 19 : Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase II et III de l'expérience démontrant un entrainement du rythme de Tb par le cycle LD

Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures enregistrées à un moment (x) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chamelles pour ce point (x) ±SEM. Les barres noires et blanches en haut et en bas correspondent à la durée de la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité durant la phase II et III respectivement. Les traits discontinus, montrent les moments de début de la phase obscure.

El Allali et *al.*(2013)

Les résultats montrent que l'avance de phase de 6h, réalisée sur la phase obscure entraine une avance de phase du rythme de Tb. Le rythme nécessite 10 jours pour se synchroniser à la nouvelle phase du cycle LD.

Le calcul de la période par les périodogrammes montre que durant les 4 phases expérimentales la période est de 24.0h. Ces résultats démontrent que le cycle LD est un facteur d'entrainement du rythme de Tb chez le dromadaire en entrainant l'horloge à une période de 24-h. Chez les mammifères, les variations journalières du cycle lumière-obscurité sont connues pour être un synchroniseur puissant (*zeitgber*) capable d'entrainer l'horloge biologique à 24-h indépendamment des saisons ou des latitudes. C'est également le cas, chez le dromadaire. En effet, nous avons montré que l'application d'une avance ou un retard de phase du cycle lumière-obscurité, entraine le rythme de Tb et le rythme de MLT qui se synchronisent sur le nouvel horaire du cycle comme classiquement rapporté dans la littérature (Honma *et al.*, 1987; Benstaali *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2007).

4.2. Entrainement du rythme de température corporelle par le cycle de température ambiante

L'existence d'une horloge biologique endogène et l'entrainement du rythme de Tb par le cycle LD ayant été démontrés, les investigations suivantes ont porté sur l'étude du rôle éventuel de la Ta comme synchroniseur de l'horloge circadienne chez le dromadaire. Pour répondre à cette question, un protocole expérimental basé sur la suppression du cycle LD et l'instauration d'un cycle artificielle de Ta a été adopté.

4.2.1. Entrainement du rythme de température corporelle par le cycle de la température ambiante en lumière constante

Pour répondre à cette question, les variations journalières de Tb ont été suivies en utilisant le capteur électronique Ibutton® chez des chamelles placées sous différentes conditions expérimentales. Le rythme moyen de Tb des chamelles est présenté dans la **Figure 20**.

Durant la phase I et sous les conditions constantes de lumière et de Ta (22°C), un rythme journalier de Tb persiste toujours avec une période de 23.8±0.05h. Ceci confirme bien les résultats précédents démontrant que ce rythme journalier de Tb est de nature endogène. En maintenant les mêmes conditions de LL et en appliquant un cycle artificiel de Ta avec un maximum de chaleur pendant la 2ème moitié du jour subjectif, un rythme régulier de Tb existe avec une période calculée de 24-h. Après l'inversion du cycle de Ta dans la phase III, le cycle de Tb persiste avec la même période de 24-h. Dans la phase IV, le retour au cycle de Ta initial (phase II), permet au rythme de la Tb de retrouver sa phase initiale en gardant la même période de 24-h.

Les enregistrements de Tb présentés dans la **Figure 20**, montrent que la moyenne et l'amplitude varient faiblement durant les différentes phases de l'expérience 4.

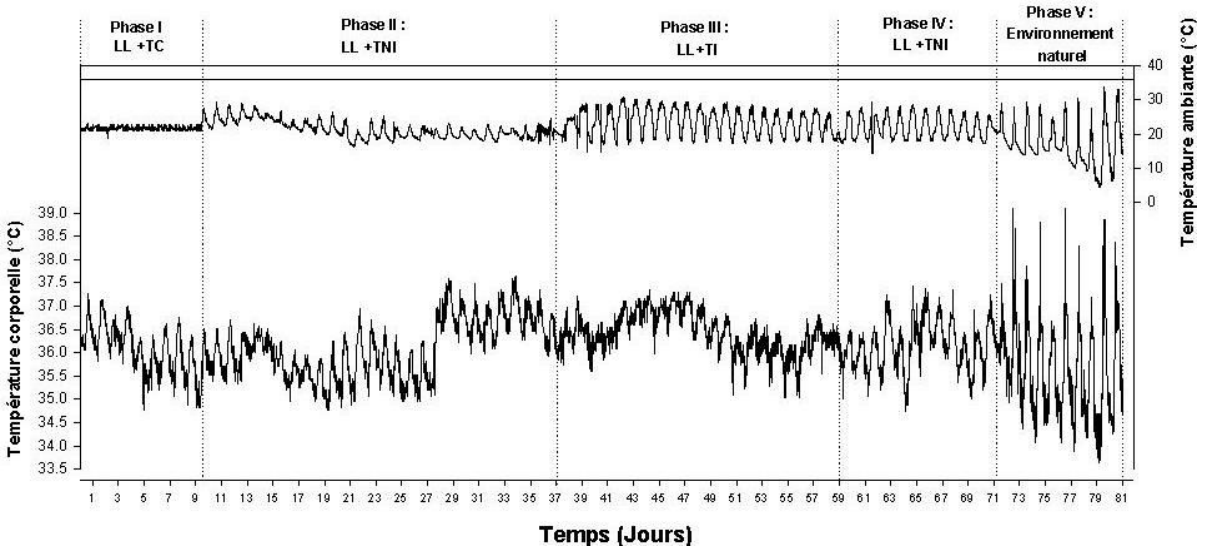

Figure 20 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb sous une lumière constante.

Les chamelles ont été placées sous les différentes conditions des 5 phases de cette expérience. Phase I : lumière constante et température ambiante fixe (LL TC), phase II : lumière constante et cycle de température ambiante normal, avec un pic de chaleur le jour (LL TNI), phase III : lumière constante et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur la nuit (LL TI), phase IV : lumière constante et retour au cycle normal de température ambiante, avec un pic de chaleur le jour (LL TNI) et phase V: animaux à l'extérieur de l'étable sous des conditions naturelles. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des sept chamelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 81 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Le rectangle blanc en haut de la figure correspond à une photopériode constante LL. Les traits discontinus, montrent les moments de changement des conditions expérimentales.

El Allali et *al.*(2013)

L'amplitude était de 0.20±0.04°C pour un écart de Ta de 1.60°C (phase II), de 0.34±0.07°C pour un écart de Ta de 4.45°C (phase III), de 0.51±0.09°C pour un écart de Ta de 4.28°C (phase IV) et de 1.45±0.21°C pour un écart de Ta de 9.07°C (phase V). Ces résultats, confirment encore une fois que la Ta affecte directement l'amplitude du rythme de Tb.

Les courbes de 24 h, calculées pendant les 5 derniers jours de la phase II, la phase III et la phase IV en moyennant pour les 7 chamelles les Tb enregistrées à un moment x de la journée sont représentées dans la **Figure 21**. L'application pendant la phase I, d'un régime LL et une Ta fixe a confirmé l'existence d'un rythme endogène de Tb. L'instauration d'un cycle artificielle de Ta avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour subjectif pendant la phase II engendre une acrophase à 16 :28±1 :00h. L'inversion de ce cycle de Ta (phase III), avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié de la nuit subjectif, provoque une inversion du rythme de Tb et induit une avance de phase de l'acrophase qui survient à 09 :19±1 :28h. En plaçant les chamelles de nouveau sous les mêmes conditions que celles de la phase II (un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour subjectif), le rythme de Tb est réentrané à sa phase initiale (acrophase à 17 :45±0 :25h). Ces résultats démontrent donc chez le dromadaire l'existence d'une avance de phase du rythme de Tb suite à l'inversion du cycle de Ta.

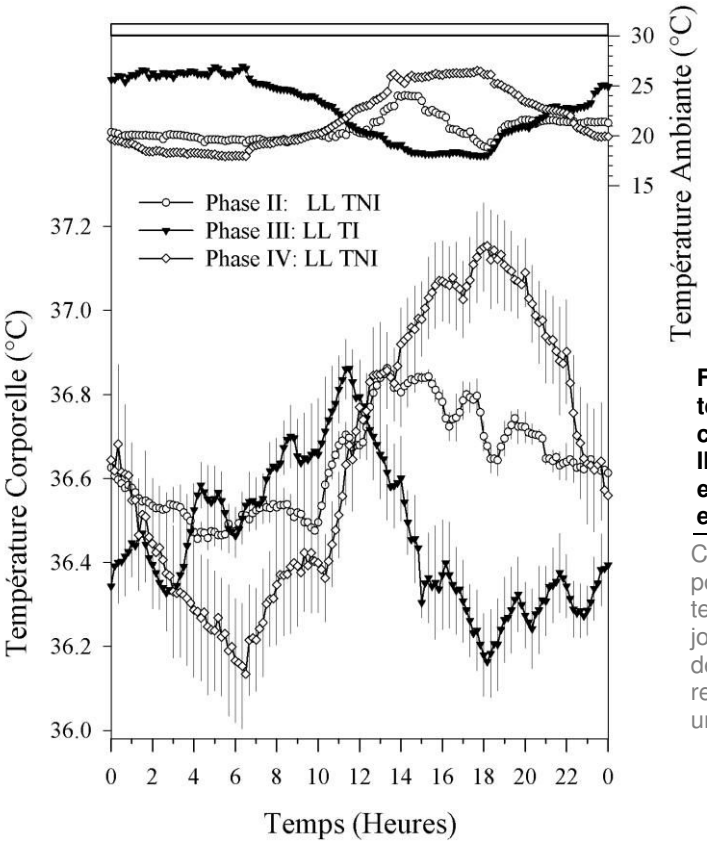

Figure 21 : Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase II, III et IV de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb en LL

Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures enregistrées à un moment (x) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chamelles pour ce point (x)±SEM. Le rectangle blanc en haut de la figure correspond à une photopériode constante LL.

El Allali et *al.*(2013)

En résumé, les résultats (**Figures 20** et **21**) montrent un effet notable du cycle de Ta sur le rythme de Tb. Il est capable d'affecter l'amplitude, la phase et la période du rythme étudié. Le cycle de Ta pourrait donc constituer un facteur d'entrainement du rythme. Cependant, cette conclusion n'est pas définitive car le résultat observé pourrait être tout simplement une réponse passive sous forme d'un transfert de chaleur avec l'environnement. Pour monter un véritable entrainement de l'horloge biologique, l'étude en parallèle d'autres paramètres ciradiens est nécessaire.

4.2.2. Entrainement de l'horloge circadienne par le cycle de température ambiante en obscurité constante

4.2.2.a. Rythme de température corporelle

Le même protocole expérimental a été repris mais cette fois-ci sous des conditions de DD. En effet, en plus du rythme de Tb, ce protocole permet d'étudier une autre sortie de l'horloge connue pour être indépendante de la Ta, il s'agit du rythme de sécrétion de MLT. Les résultats obtenus montrent que sous une photopériode artificielle LD 12:12 et sous une Ta constante (22°C) pendant la phase I, un rythme de Tb existe (**Figure 22**) avec une période du rythme moyen égale à 24-h. Ce rythme est caractérisé par un niveau moyen de 36.33±0.13°C avec

une amplitude très faible de 0.34±0.09°C. Durant la deuxième phase de cette expérience, la persistance de ce rythme sous les conditions constantes de photopériode DD et de Ta (22°C), avec une période égale à 24.2h démontre que le rythme de Tb est de nature endogène. En phase III, en maintenant les mêmes conditions de DD et en appliquant un cycle de Ta avec un maximum de chaleur pendant la 2ème moitié du jour subjectif, un rythme de Tb régulier se met en place avec une période égale à 24-h. Durant cette phase, la moyenne du rythme est de 36.19±0.06°C et l'amplitude est de 0.81±0.22°C. Après l'inversion du cycle de Ta pendant la phase IV, le rythme de Tb persiste avec la même période de 24-h avec une moyenne de 36.25±0.14°C et une amplitude de 0.76±0.15°C.

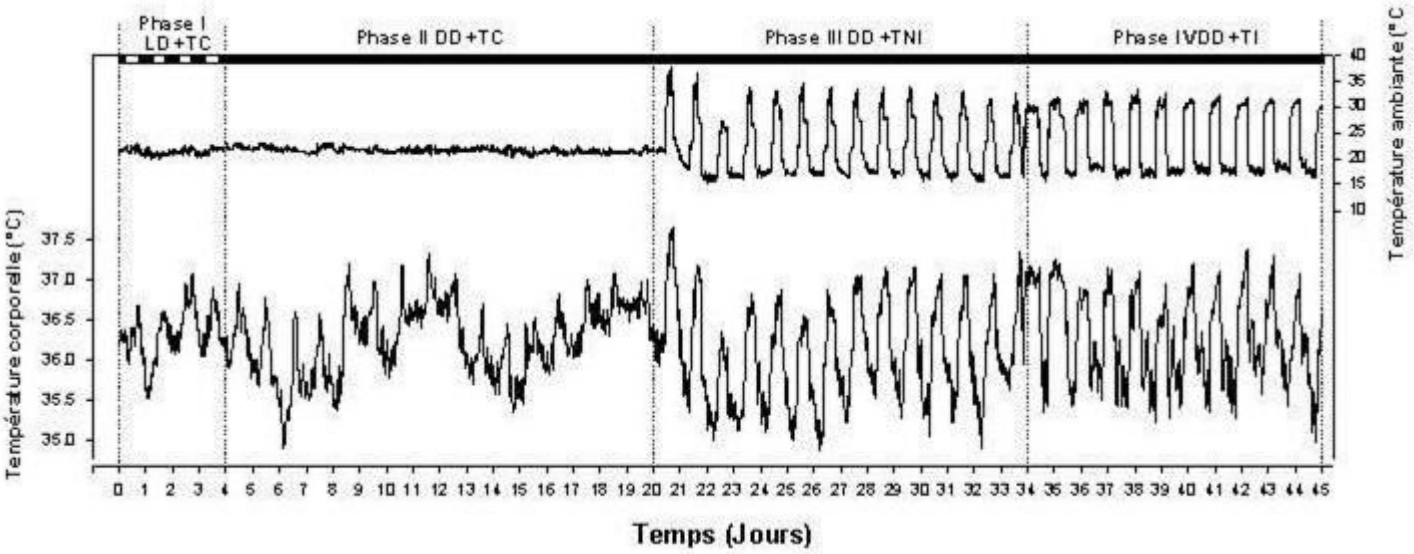

Figure 22 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb en DD.

Les chamelles ont été placées sous différentes conditions des 4 phases de cette expérience. Phase I : cycle lumière-obscurité et température ambiante constante (LD TC), phase II : obscurité constante et cycle de température ambiante fixe (DD TC), phase III : obscurité constante et cycle de température ambiante, avec un pic de chaleur durant le jour (DD TNI) et .phase IV: Obscurité constante et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la nuit (DD TI). Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des sept chamelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 45 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Les rectangles noirs et blancs en haut de la figure, correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité. Le rectangle noir et long marque l'absence de ce cycle et l'instauration d'une obscurité constante. Les traits discontinus, montrent les moments de changement des conditions expérimentales.

El Allali et *al.*(2013)

L'application d'un cycle de Ta durant les phases III et IV engendre une augmentation de l'amplitude du rythme de Tb. Les conditions de température adoptées durant la phase III, permettent au rythme endogène de se synchroniser en 3 jours et d'avoir une forme et une amplitude plus régulière. L'inversion du cycle de Ta (phase IV) avec une phase opposée à celle du rythme endogène, nécessite un temps plus long (8 à 9 jours) pour obtenir la synchronisation du rythme. D'après la **Figure 23**, l'application d'un cycle artificielle de Ta avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour subjectif (phase III), induit une acrophase

du rythme de Tb à 15 :57±0 :30h. L'inversion de ce cycle de Ta, avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié de la nuit subjective, provoque une inversion du rythme de Tb avec une acrophase à 02 :36±1 :08h.

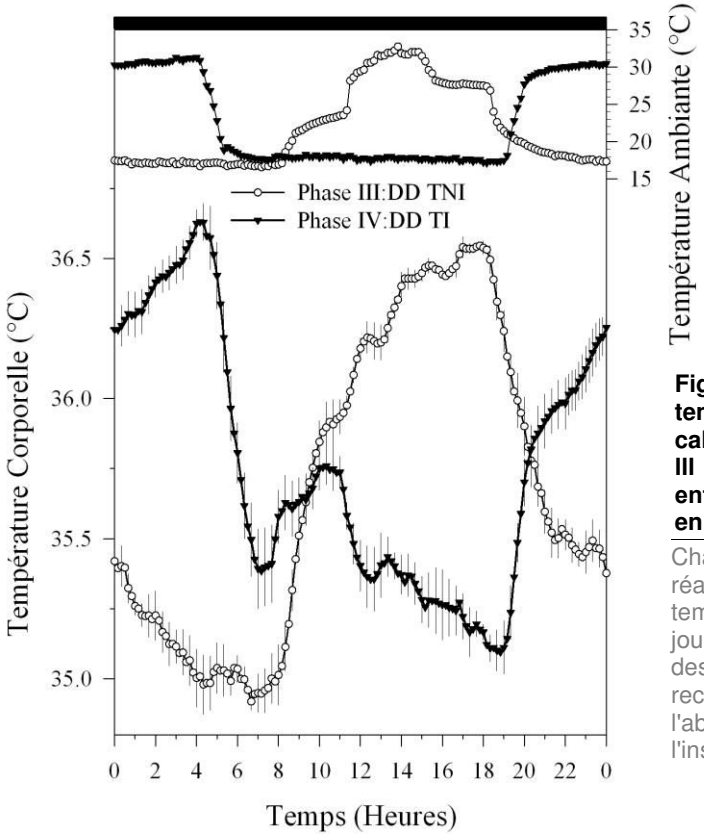

Figure 23 : Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase III et IV de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge et du rythme de Tb en DD

Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures enregistrées à un moment (x) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chamelles pour ce point (x) ±SEM. Le rectangle noir en haut de la figure marque l'absence du cycle lumière-obscurité et l'instauration d'une obscurité constante.

El Allali et *al.*(2013)

Ces résultats démontrent que dans les conditions de DD, le cycle de Ta entraine le rythme de Tb en lui imposant sa période de 24-h. Seuls les résultats du rythme de MLT peuvent indiquer s'il s'agit d'une réponse passive ou d'un véritable entrainement de l'horloge circadienne.

4.2.2.b. Rythme de mélatonine plasmatique

Cette étude a été réalisée sous les conditions de DD comme indiqué plus haut. Le profil individuel de la sécrétion de MLT a été étudié sur une période de 24 heures simultanément avec la Tb relevée via le capteur électronique Ibutton®, chez les chamelles en fonction des conditions expérimentales des deux phases III et IV (**Figure 24**). Les résultats montrent la présence de grandes variations interindividuelles de la phase du rythme de MLT (**Figure 24**). En dépit de cette différence, un pic nocturne de MLT est observé sous les conditions constantes de Ta. Durant la phase III, l'application d'un cycle artificielle de Ta avec un maximum de chaleur pendant la 2ème moitié du jour subjectif permet de conserver la même

phase du rythme de MLT que celle observée sous les conditions constantes de la phase II. Ceci est en accord avec les résultats de Tb, puisque le rythme de MLT présente pratiquement la même phase entre les conditions expérimentales de la phase II et III. L'inversion du cycle de Ta, avec un pic de chaleur pendant la 2ème moitié de la nuit subjective, engendre une avance de phase de la demi-montée et la demi-descente du pic de MLT chez six chamelles sur sept. Chez la chamelle C4, uniquement le moment de la demie montée du pic de MLT qui est significativement décalé ($F_{1,16}$ *=6.7, P= 0.020*) (**Tableau 2**). En général, le rythme de 24h de MLT sous des conditions de DD montre un pic quand le cycle de Ta est en bathyphase.

Ces données obtenues démontrent que chez le dromadaire, le cycle journalier de Ta entraine le rythme de MLT. Ceci constitue donc une preuve que le cycle de Ta en absence du cycle lumière-obscurité est un véritable *zeitgeber* de l'horloge circadienne.

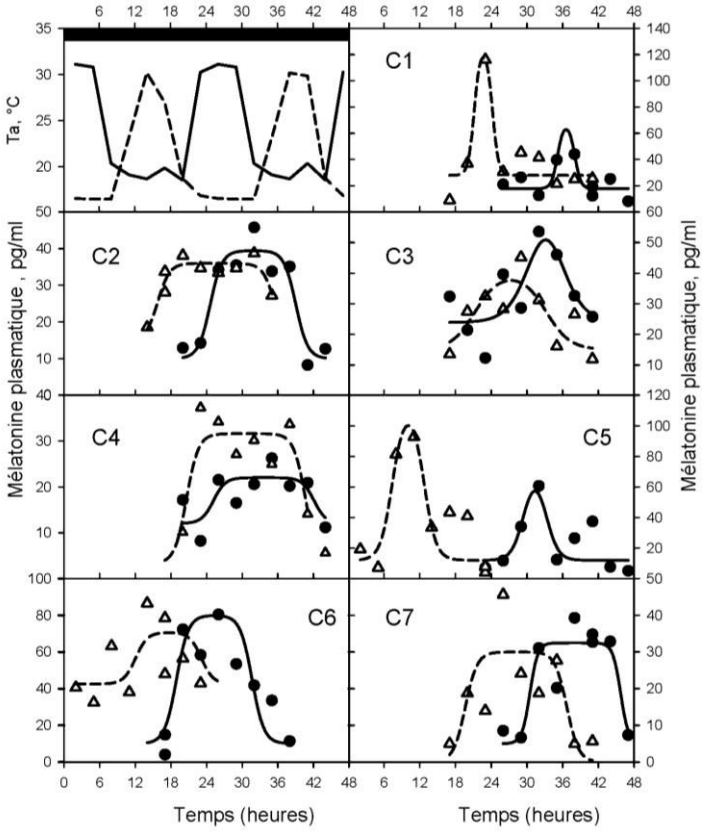

Figure 24 : Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chamelles du groupe III sous les conditions de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge en DD

Les courbes moyennes de 24h du cycle de la température ambiante sont présentées en haut et à gauche de la figure : cycle de température ambiante normal, avec un pic de chaleur durant la 2éme moitié du jour subjectif (DDTNI) (ligne continue) et cycle de température ambiante avec une avance de phase de 11h (DDTI) (ligne discontinue). Les courbes représentant le profil individuel de sécrétion de la mélatonine de chaque chamelle ont été approchées et superposées à la courbe générée par une équation à un pic logistique. Les cercles noirs avec la ligne continue représentent le rythme de mélatonine quand les chamelles ont été maintenues sous les conditions DDTNI et les triangles blancs avec la ligne discontinue représentent le rythme de mélatonine quand les chamelles ont été placées sous les conditions DDTI. Le rectangle noir en haut de la figure marque l'absence du cycle lumière-obscurité et l'instauration d'une obscurité constante.

El Allali et *al.*(2013)

Tableau 2 : Analyse du moment de la demi-montée (t1) et de la demi-descente du pic nocturne de la mélatonine sous les conditions de l'expérience démontrant un entrainement de l'horloge en DD

Animal	Phase III		Phase IV		Différence	
	t1	*t2*	*t1*	*t2*	*F(2,14)*	*p*
Chamelle 1	21.1±1.0	0.2±2.9	11.1±0.3	14.1±0.3	50.2	<0.0001
Chamelle 2	0.0±1.4	15.8±1.3	4.0±1.4	11.6±1.4	49.4	<0.0001
Chamelle 3	7.1±1.6	11.2±1.6	21.3±1.6	9.2±1.6	7.9	0.005
Chamelle 4	20.6±1.1	16.7±1.0	1.2±1.7	18.1±1.8	3.3	0.068*
Chamelle 5	6.9±1.0	13.4±0.9	5.5±0.9	9.2±1.0	5.2	0.021
Chamelle 6	12.1±2.4	23.1±2.1	18.9±1.0	7.7±0.9	5.5	0.018
Chamelle 7	19.7±1.3	12.7±1.5	6.5±1.3	21.7±1.2	18.4	0.0001

Analyse du moment de la demie montée (t1) et de la demie descente (t2) du pic de la mélatonine plasmatique (h±SE) sous les conditions d'obscurité constante, lors de l'application d'un cycle artificielle de la température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour subjectif (phase III) et après l'inversion de ce cycle de température (phase IV) chez les 7 chamelles du groupe III (étude longitudinale).

El Allali et *al.*(2013)

La Tb dépend essentiellement de la **production de chaleur métabolique**, la **charge thermique** (rayonnement, conduction, convection), la **perte d'eau par évaporation** et la **conductance thermique** (coefficient de transfert de chaleur). La probabilité que la production cyclique de la chaleur métabolique résultante d'une activité locomotrice rythmique pourrait masquer le rythme de Tb est infiniment faible, d'autant plus que les résultats démontrent l'absence d'un effet de masquage de Tb par une activité locomotrice rythmique. En outre, à l'exception des phases où les animaux ont été placés dans un environnement naturel, l'activité locomotrice des chamelles a été restreinte ce qui exclue toute dépense énergétique importante. A des températures faibles (≈ 17°C), le dromadaire ne ressent pas des frissons puisqu'il possède une fourrure épaisse dont la conductance est 200 fois plus petite que celle d'une souris. Le rayonnement de la charge thermique implique que le maximum de Tb soit voisin de celui de la Ta. La **Figure 23** montre que durant la phase III, l'application d'un cycle artificielle de Ta avec un maximum de chaleur pendant la 2^{éme} moitié du jour subjectif, le pic du rythme de Tb est nettement décalé vers la droite par rapport à celui de Ta. Dans la **Figure 16**, ce décalage est encore plus grand. En ce qui concerne la perte d'eau par évaporation (paramètre non mesurer durant cette étude), Schmidt-Nielsen et ses collaborateurs (1967) affirme qu'elle réside constante et faible à des Ta inférieures à 36°C. Finalement, la seule possibilité qui reste serait la charge thermique en raison des changements de la conductance thermique. Dans la **Figure 23**, le courbe de Tb montre 3 niveaux : une première étape de diminution de la conductance au-dessous de Tb=35.6°C, une deuxième étape correspondant à une augmentation de la conductance au-dessus de Tb=37.0°C et une troisième étape où la conductance montre une variation linière entre ces deux derniers seuils. Ceci prouve

nettement que le rythme de Tb chez le dromadaire ne résulte pas d'une réponse passive sous forme d'un transfert de chaleur avec l'environnement. Cette observation a été confirmée par l'étude en parallèle du rythme de la MLT démontrant que c'est bien l'horloge circadienne qu'est responsable. La présente étude semble être la première démonstration que le cycle journalier de Ta peut être utilisé comme un facteur synchroniseur chez les mammifères. Chez les ectothermes, le cycle journalier de Ta est connu pour être le *zeitgber* le plus puissant (Rensing & Ruoff, 2002; Glaser & Stanewsky, 2005). Cependant, chez les vertébrés endothermiques, en particulier chez les mammifères, quelques études antérieures ont conclu que certains rythmes biologiques ne sont pas synchronisés par les cycles journaliers de Ta (Hoffman, 1969; Buhr *et al.*, 2010). En outre, dans certains cas le cycle journalier de Ta est connu comme un très faible *zeitgeber* incapable d'entrainer constamment les rythmes circadiens. Par exemple, l'entrainement de l'activité locomotrice par les cycles journaliers de Ta a été observé chez 45% des cas chez le singe-écureuil (Aschoff & Tokura, 1986), chez 2 ouistiti commun (*Callithrix j jacchus*) sur 6 (Palkova et *al*., 1999), chez 3 écureuils indien de palme (*Funambulus de palmarum*) sur 7 (Rajaratnam & Redman, 1998) et chez 60% à 80% des cas chez la souris (Refinetti, 2010b). L'effet du masquage par la Ta a été rapporté dans quelques études (Aschoff & Tokura, 1986; Rajaratnam & Redman, 1998; Palkova *et al.*, 1999; Refinetti, 2010b). Ces résultats concluant que le cycle journalier de Ta est un véritable synchroniseur de l'horloge circadienne ne seriont pas valables que pour le dromadaire. Récemment, des études comparatives réalisées dans notre laboratoire à Rabat chez des espèces exposées à des fortes fluctuations de Ta dans leurs biotopes naturels comme la chèvre, montrent que ce phénomène existe chez d'autres mammifères.

V. Peut-on considérer vraiment le rythme de la température corporelle comme une sortie d'horloge fiable pour étudier les propriétés circadiennes de l'horloge biologique ?

La mise en évidence de l'existence d'un deuxième *zeitgeber* à côté du cycle LD, impose une question sur les réactions physiologiques si les deux synchroniseurs : le cycle LD et le cycle de Ta, étaient appliqués ensemble soit en phase ou en opposition de phase. L'objectif de ce travail a donc été de vérifier si en présence du cycle LD, un cycle journalier de la Ta est capable d'entrainer l'horloge circadienne. Les deux paramètres dépendant de l'horloge circadienne, le rythme de Tb et le rythme de MLT ont été suivis chez des chamelles maintenues sous les différebtes conditions expérimentales de photopériode et de Ta.

5.1. Rythme de température corporelle

La photopériode artificielle LD 12:12 et un cycle de Ta mimant les variations extérieure de l'environnement, avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour (phase I), induit une forme régulière et classique du rythme de Tb caractérisé par un niveau moyen de 35.90±0.23°C et une amplitude de 0.64±0.10°C (**Figure 25**). Après l'inversion du cycle de Ta (pic de chaleur durant la 2ème moitié de la nuit), le rythme de Tb présente une avance de phase de presque de 8 heures. Le niveau moyen du rythme durant cette phase II était de 36.07±0.29°C et l'amplitude était toujours de 0.64±0.15°C.

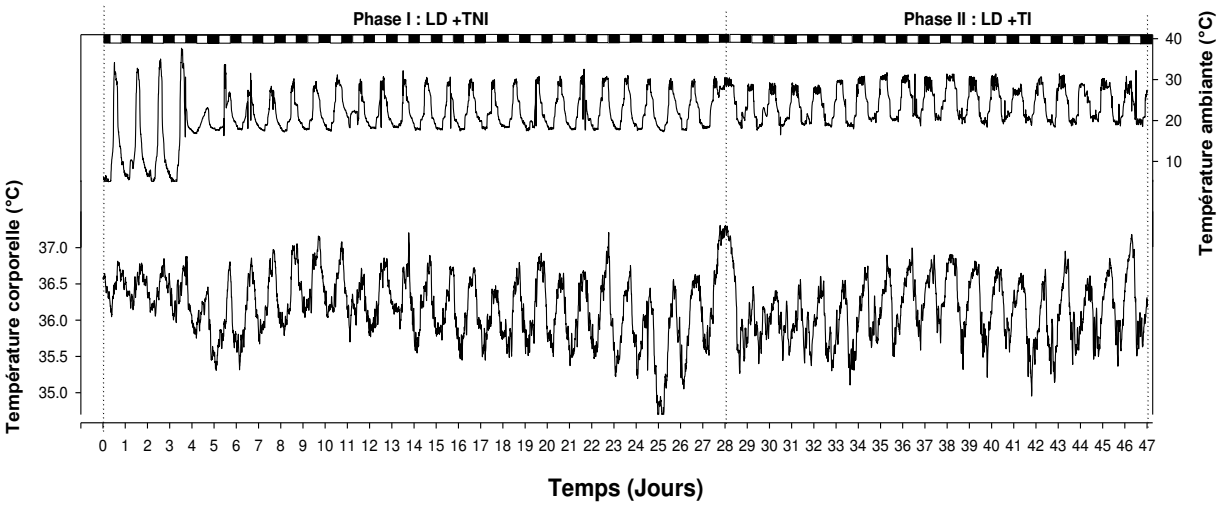

Figure 25 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des chamelles durant l'expérience étudiant lequel des deux synchroniseurs cycle LD et Ta est puissant.

Les chamelles ont été placées sous les différentes conditions des 2 phases de cette expérience. Phase I : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante normal, avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour (LD TNI), phase II : cycle lumière-obscurité et cycle de température ambiante inversé, avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié de la nuit (LD TI). Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des sept chamelles. La température a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 47 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Les rectangles noirs et blancs en haut de la figure, correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus, montrent les moments de changement des conditions expérimentales.

El Allali et *al.*(2013)

En outre, les courbes moyennes de 24h pour les 7 chamelles calculées pendant les 5 derniers jours de la phase I et II (**Figure 26**), montrent que même en présence d'un cycle artificielle LD 12:12, l'inversion du cycle de la Ta provoque une inversion du rythme de Tb. Cette inversion du rythme se réalise dans 12 à 13 jours. Durant la phase II, lorsque les animaux ont été soumis à un cycle de Ta avec un pic durant la 2ème moitié de la nuit, en plus du grand pic du rythme qui montre une acrophase à 07:09h, une légère augmentation a été observée à la fin de l'après-midi au moment où le pic initial, relevé dans la phase I survient (**Figure 26**).

Ces résultats suggèrent que le cycle de Ta est un synchroniseur plus puissant que le cycle LD, puisqu'en présence de ce dernier LD 12:12 l'inversion du cycle de Ta est capable d'avancer considérablement la phase du rythme de Tb. Toutefois, cette conclusion n'est valable que si le cycle de Ta agit simultanément sur une autre sortie de l'horloge biologique, par exemple le rythme de sécrétion de MLT.

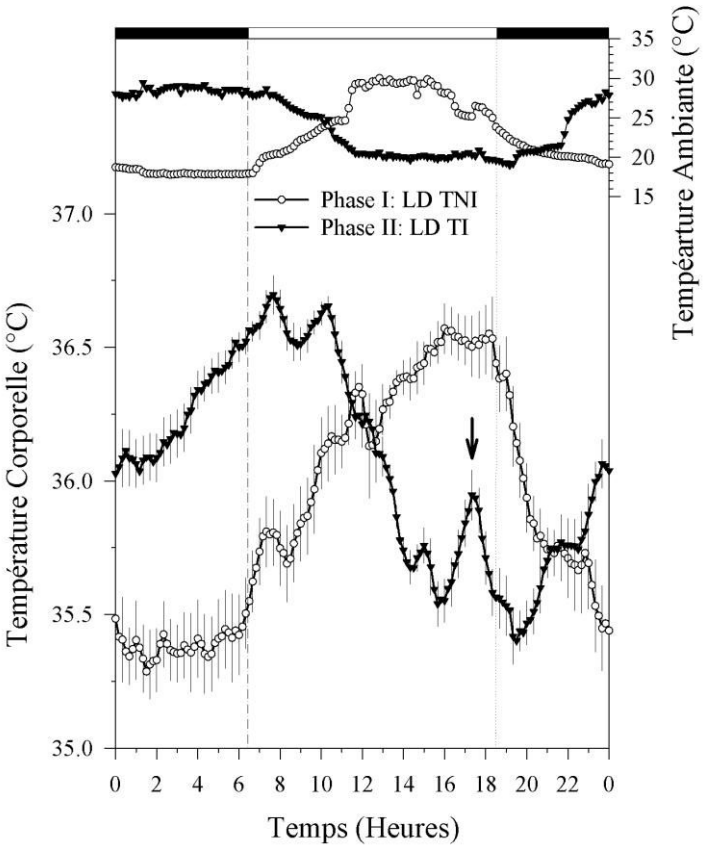

Figure 26 : Courbes moyennes de 24h de la température corporelle des chamelles calculées sur les 5 derniers jours de la phase II, III et IV de l'expérience étudiant leuqel des deux cycles LD et Ta est puissant.

Chaque point de la courbe est obtenu en réalisant pour chaque chamelle, la moyenne des températures enregistrées à un moment (x) de la journée et en moyennant par la suite l'ensemble des 7 chamelles pour ce point (x) ±SEM. Les rectangles noirs et blancs en haut de la figure correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité. Les traits discontinus, montrent les moments de début de la phase obscure.

El Allali et *al.*(2013)

5.2. Rythme de sécrétion de mélatonine

L'étude du profil de MLT durant cette expérience montre que pendant la phase I, la MLT est sécrétée la nuit avec une augmentation rapide au passage lumière-obscurité et atteint son maximum de sécrétion au milieu de la nuit. En présence du cycle LD 12:12, l'application d'un cycle inversé de Ta avec un maximum de chaleur pendant la 2ème moitié de la nuit (phase II), le profil de sécrétion de MLT ne change pas (élévation rapide et immédiate après le passage lumière-obscurité pour atteindre un pic au milieu de la nuit (**Figure 27**)). Le rythme de MLT n'est pas donc affecté par l'inversion du cycle de Ta. Une légère avance de phase du rythme de MLT est toutefois observée chez les chamelles C2, C3 et C5 (**Tableau 3**). Ces résultats

démontrent qu'en présence du cycle LD, le cycle de Ta est incapable d'entrainer le rythme de sécrétion de MLT.

En conclusion, les résultats démontrent que le cycle de Ta agit comme un *zeitgber* en entrainant le rythme de Tb sous les conditions de LL et de DD et également le rythme de MLT. Toutefois, en présence du cycle LD, ce synchroniseur n'est pas capable d'entrainer l'horloge circadienne. Il est donc probable que l'inversion du rythme de Tb observée dans ces conditions relève d'un effet de la Ta sur le système de thermorégulation du dromadaire n'impliquant pas l'horloge circadienne.

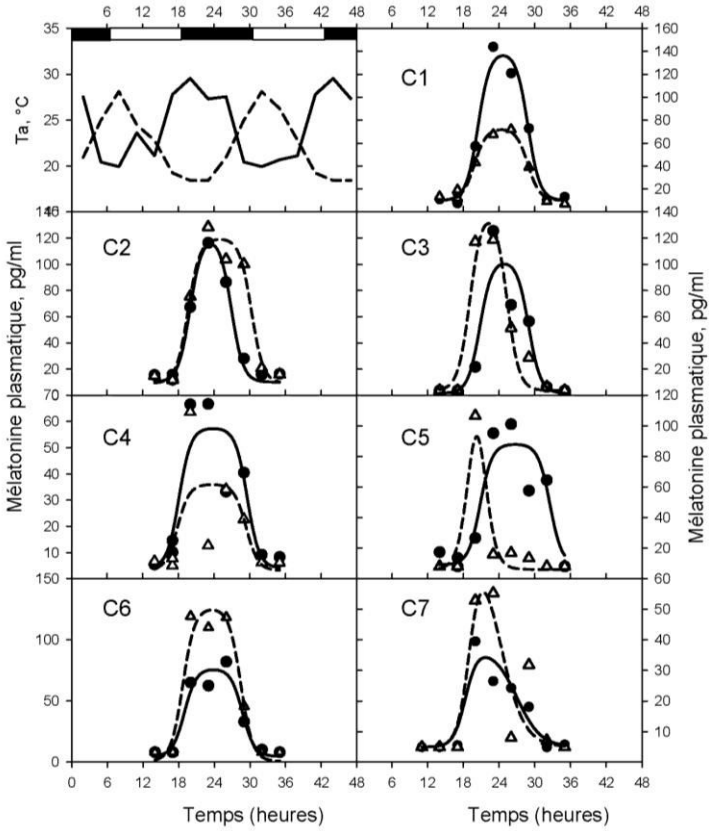

Figure 27 : Rythme individuel de la mélatonine chez les 7 chamelles du groupe III sous les conditions de l'expérience étudiant leuqel des deux synchroniseurs cycle LD et Ta est puissant

Les courbes moyennes de 24h du cycle de la température ambiante sont présentées en haut et à gauche de la figure : cycle de température ambiante normal, avec un pic de chaleur durant la 2éme moitié du jour (LDTNI) (ligne continue) et cycle de température ambiante avec une avance de phase de 11h (LDTI) (ligne discontinue). Les courbes représentant le profil individuel de sécrétion de la mélatonine de chaque chamelle ont été approchées et superposées à la courbe générée par une équation à un pic logistique. Les cercles noirs avec la ligne continue représentent le rythme de mélatonine quand les chamelles ont été maintenues sous les conditions LDTNI et les triangles blancs avec la ligne discontinue représentent le rythme de mélatonine quand les chamelles ont été placées sous les conditions LDTI. Les rectangles noirs et blancs en haut de la figure correspondent à la succession des phases obscures et lumineuses du cycle lumière-obscurité.

El Allali et *al.*(2013)

Tableau 3 : Analyse du moment de la demi-montée (t1) et de la demi-descente du pic nocturne de la mélatonine sous les conditions de l'expérience étudiant lequel des synchroniseurs cycle LD et Ta est puissant.

Animaux	Phase I		Phase II		Différence	
	t1	*t2*	*t1*	*t2*	*F(2,14)*	*p*
Chamelle 1	20.5±0.2	4.8±0.2	19.9±0.4	4.8±0.4	1.1	NS
Chamelle 2	20.1±0.2	2.7±0.3	19.6±0.2	6.3±0.3	47.3	<0.0001
Chamelle 3	20.9±0.7	4.7±0.6	18.7±0.6	1.9±0.6	6.9	0.008
Chamelle 4	18.1±0.9	5.6±1.0	17.7±1.3	5.8±1.8	0.1	NS
Chamelle 5	20.8±0.7	8.5±0.7	19.2±0.5	21.3±0.6	53.1	<0.0001
Chamelle 6	19.0±0.6	4.7±0.6	18.7±0.3	4.5±0.3	0.2	NS
Chamelle 7	18.5±1.2	2.4±1.5	19.1±0.6	0.1±0.8	1.1	NS

Analyse du moment de la demie montée (t1) et de la demie descente (t2) du pic de la mélatonine plasmatique (h±SE) sous les conditions LD 12h : 12h, lors de l'application d'un cycle artificielle de la température ambiante avec un pic de chaleur durant la 2ème moitié du jour (phase I) et après l'inversion de ce cycle de température (phase II) chez les 7 chamelles du groupe III (étude longitudinale).

El Allali et *al.*(2013)

Le rythme de Tb est une sortie de l'horloge qui est souvent utilisé pour étudier les propriétés de l'horloge circadienne. Dans des études cliniques, où les techniques invasives sont parfois difficiles à envisager, le rythme de Tb est largement utilisé comme paramètre de contrôle (Uchiyama *et al.*, 1995; Arendt, 2005; Markwald *et al.*, 2010; Darwent *et al.*, 2011; Heikens *et al.*, 2011). Ce rythme est donc généralement considéré comme une sortie fiable de l'horloge principale. Les résultats obtenus par El Allali et *al.*(2013) montrent que le cycle de Ta est capable d'entrainer le rythme de Tb même en présence du cycle LD. Toutefois, sous les mêmes conditions photopériodiques le cycle journalier de Ta n'est pas capable d'entrainer le rythme de MLT chez toutes les chamelles. Par conséquent, dans ces conditions, le cycle journalier de Ta n'est pas considéré comme un facteur synchroniseur fort de l'horloge circadienne. Un cycle journalier de Ta avec une amplitude élevée (mimant les conditions désertiques) pourrait avoir un effet significatif. Dans les conditions expérimentales de cette étude, l'entrainement du rythme de Tb par le cycle journalier de Ta ressemble plutôt à une réponse passive sous forme d'un transfert de chaleur avec l'environnement indépendamment de l'horloge circadienne. Cette interprétation est renforcée par l'apparaition à côté du grand pic du rythme de Tb, un deuxième pic accessoire qui apparait à la fin de la période de lumière lorsque le cycle Ta est en opposition de phase avec le cycle LD (**Figure 26**).Ce deuxième pic du rythme de Tb peut être considéré comme le résultat d'un signal de l'horloge biologique masqué par l'effet direct de la Ta. Il est clair que le rythme de Tb ne peut pas être toujours considéré comme une sortie fiable de l'horloge circadienne lorsque les dromadaires sont exposés simultanément aux cycles de Ta et LD. La question est de savoir si cette observation est limitée au dromadaire ? A défaut des études spécifiques chez les mammifères et même chez les rongeurs classiques de laboratoires, il est difficile actuellement de répondre à cette

question. Cela démontre les limites de l'utilisation du rythme de Tb pour suivre les activités de l'horloge. Par conséquent, le suivi en parallèle de plusieurs sorties de l'horloge (au moins 2) pour étudier les mécanismes circadiens de l'horloge devrait être systématiquement effectué.

CHAPITRE III. OBJECTIFS DU TRAVAIL

I. Rôle des cycles de température ambiante dans la synchronisation du système circadien et saisonnier chez le dromadaire.

II. Vérification de l'existence d'un état d'hétérothermie chez le dromadaire sujet à la déshydratation et au stress thermique.

III. Indentification d'une (ou des) structure (s)cérébrale (s) impliquée (s) dans l'intégration du signal photopériodique en absence de MLT chez le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) et compréhension des mécanismes par lesquels cette intégration est réalisée.

La présente thèse est le fruit de la continuation d'un projet de recherche initié en 2002 en collaboration entre l'Unité d'Anatomie Comparée de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (URAC N°49, CNRST) de Rabat (Maroc) et l'Institut des Neurosciences Cellulaires er Intégratives (UPR 3212, CNRS-Université de Strasbourg, Strasbourg, France). Cette coopération qui porte sur la neurobiologie des adaptations des animaux désertiques a été soutenue par le Ministère Marocain de l'Agriculture et le Ministère Français des affaires étrangères dans le cadre du Programme de Recherche Agronomique pour le Développement (PRAD : 2003-2005 ; 2007-2010 et 2011-2014). Ce projet s'interésse entre autres au développement de l'élevage des camelins au Maroc et s'intègre dans les grands axes d'action du plan « Maroc vert ».

L'objectif principal de cette coopération est d'apporter les éléments scientifiques nécessaires pour améliorer la reproduction saisonnière du dromadaire qui est jusqu'ici très aléatoire. Le développement de l'élevage camelin, en particulier l'amélioration de ses performances, est limité par le manque d'informations et la mauvaise connaissance de la biologie de cet animal. En dehors de ce projet de recherche fondamental, les approches menées jusqu'à présent pour tenter d'améliorer les performances se sont intéressées à des aspects très techniques sans tenir compte réellement des particularités physiologiques de cette espèce notamment en matière d'adaptations aux températures contrastées et aux manques de l'eau, typiques au milieu désertique. En outre, beaucoup d'incertitudes scientifiques parsèment les connaissances de base de l'adaptation du dromadaire à son environnement et aussi certaines grandes fonctions physiologiques directement liées à l'élevage notamment la reproduction. La plupart des auteurs considèrent que le contrôle de la saisonnalité de reproduction chez le dromadaire est comme chez les autres mammifères domestiques (e.g. jument, brebis, chèvre…), sous la dépendance de la photopériode. Dans le cadre de cette collaboration et au cours des années précédentes, les résultats de notre laboratoire démontrent que la Tb des chamelles parfaitement hydratées est un rythme circadien généré par une horloge endogène et synchronisé exactement à 24-h par le cycle LD (entrainement photique). Nous avons également prouvé que le cycle journalier de Ta (entrainement non-photique) est capable du moins dans certaines conditions expérimentales, d'entrainer l'horloge circadienne (El Allali et *al.*, 2013). La Ta est donc aussi un bon candidat pour la synchronisation saisonnière de la fonction de reproduction. Il est connu que le dromadaire est un animal du désert qui est soumis dans son biotope naturel à de grandes variations de Ta, à des états oscillants entre l'homéothermie et la poïkilothermie selon la disponibilité de l'eau de boisson. Par conséquent, il est important de comprendre les mécanismes impliqués dans l'entrainement

de l'horloge circadienne par les cycles journaliers de Ta. L'étude du fonctionnement de l'horloge circadienne sous un état d'hétérothermie tout en suivant deux sorties de l'horloge à savoir le rythme de Tb et le rythme de MLT s'impose. L'étape suivante serait donc de déterminer si les cycles saisonniers de Ta sont capables comme les variations photopériodiques d'induire des modifications saisonnières sur le rythme de MLT. Avant d'élaborer ce projet, l'étude du système de thermorégulation chez le dromadaire et la vérification de l'existence d'un éventuel état d'hétérothermie chez ce mammifère est importante. Ceci s'est avéré nécessaire pour le développement de ce programme qui fait l'objet de mon sujet de thèse, surtout que cet état d'hétérothermie a été contesté par une autre équipe de chercheur (Al Haidary, 2005). Le déroulement de ces travaux et surtout l'indisponibilité des dromadaires nous a obligés à réorienter le projet de l'étude des mécanismes particulièrs impliqués dans la synchronisation du système circadien et saisonnier par les cycles de Ta chez le dromadaire. Nous avons donc décidé d'étudier chez un autre mammifère, le hamster d'Europe « *Cricetus cricetus* » les mécanismes physiologiques non-classiques du système de mesure de temps. Des travaux récents de notre laboratoire (INCI-UPR 3212 CNRS) (Monecke et *al*., 2013) ont permis de montrer que le signal photopériodique pouvait être intégré même en absence de MLT, ce que jusqu'ici était inconcevable. En effet, ils ont vérifié que chez la majorité des hamsters d'Europe pinéalectomisés, le rythme de Tb, l'activité locomotrice, le poids corporel et le cycle circannuel de reproduction ont été entrainés par le régime instauré de photopériode accélérée. L'hypothèse de travail est donc de déterminer l'existence d'une (ou des) structure (s) dans le cerveau qui serait (seraient) capable (s) de traduire l'information sur la durée de la période d'éclairement et ensuite de la distribuer. L'objectif de cette partie de thèse est donc d'identifier cette (ou ces) structure (s) et de comprendre les mécanismes impliqués. A des niveaux précis de cette étude, certaines vérifications ont été indispensables. Réaliser des tests directement chez le hamster d'Europe n'était pas faisable. Un grand nombre d'animaux est nécessaire et la longueur du cycle annuel fait que la reproduction (donc l'obtention des animaux) demande énormément de temps d'où la planification de certaines expérimentations chez le rat Wistar.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Animaux

- ✓ Dromadaires « *Camelus dromedarius* »
- ✓ Hamsters d'Europe « *Cricetus cricetus* »
- ✓ Rats Wistar « *Rattus norvegicus* »

II. Prélèvements et suivi des paramètres physiologiques chez le dromadaire

- ✓ Prélèvements sanguins et suivi des paramètres physiologiques
- ✓ Suivi de la température corporelle et la température ambiante
- ✓ Suivi du poids corporel

III. Prélèvements et suivi des paramètres physiologiques chez le hamster d'Europe et le rat

- ✓ Prélèvements effectués chez le hamster d'Europe et le rat

IV. Immunohistochimie

- ✓ Principe
- ✓ Immunohistochimie : simple marquage
- ✓ Immunohistochimie : double marquage

V. Analyses statistiques

I. Animaux

1. Dromadaires "*Camelus dromedarius*"

Le dromadaire (*Camelus dromedarius*) est une espèce appartenant au genre *Camelus*, famille des Camélidés, ordre des Tylopodes et sous-classe des mammifères vertébrés placentaires. La famille des camélidés compte deux genres, le genre *Camelus* qui est représenté par deux espèces, le dromadaire (*Camelus dromedarius*) et le chameau bactrien ou chameau à deux bosses (*Camelus bactrianus*) et le genre *Lama* représenté par quatre espèces qui sont : *Lama glama*, *Lama pacos*, *Lama guanicoe* et *Lama vicugna*.

Les dromadaires utilisés dans ces expérimentations appartenaient à un troupeau de dromadaires de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II de Rabat. Ils provenaient principalement des régions sahariennes du sud du Maroc (la province de Lâayoune) ou du massif central (la province de Rehamna et de Settat). Au vu du commerce important des troupeaux camelins et de leur transhumance, l'origine exacte des animaux est restée incertaine. Les chamelles acquises pour ces expérimentations appartenaient aux variétés Marmouri, Khouari et Guerzni. Récement le laboratoire de l'analyse génétique vétérinaire de l'IAV Hassan II et en collaboration avec notre laboratoire a démontré (Piro et *al.*, 2011) par analyse de 17 marqueurs génétiques l'existence de deux races de dromadaire au Maroc ; la race du Sud englobant les variétés Marmouri, Khouari et Guerzni et la race du Nord représentée par les variétés Jebli et la Blanche.

Selon l'approche expérimentale utilisée, les chamelles ont été maintenues dans un paddock sous les conditions naturelles d'environnement, ou placées dans une étable expérimentale où les cycles de photopériode et de Ta ont été contrôlés (pour plus de détails voir chapitre II et IV).

2. Hamsters d'Europe "*Cricetus cricetus*"

Les hamsters d'Europe utilisés dans le cadre de cette thèse étaient des mâles issus de l'élevage de notre laboratoire (Chronobiotron, CNRS-UMS3415, Strasbourg-France). Dans les différentes expériences menues, les animaux étaient adultes avec une masse corporelle de 250 à 450 g. Les hamsters étaient maintenus en cage individuelle de type IIIH (Makrolon, 425x225x180 mm avec une surface au sol de 800 cm^2, Bioscope, Emmendingen, Germany). Chaque cage était enrichie avec un barreau à ronger et un tunnel ou matériel de nidation. Ils étaient placés dans des pièces à température ambiante contrôlée (22 ± 2°C), avec un accès

libre à l'eau et à la nourriture. Selon le protocole expérimental adopté, la photopériode était contrôlée dans les pièces. L'intensité lumineuse dans les cages était variable (entre 60 et 119 lux) selon la position de la cage par rapport à la source de la lumière. Durant la phase obscure, les animaux ont été exposés en continu à une lumière rouge dont l'intensité était inférieure à 3.5 lux et qui permetait les manipulations pendant la scotophase (pour plus de détails voir chapitre V).

3. Rats Wistar "*Rattus norvegicus*"

D'autres expériences ont été réalisées sur des rats Wistar mâles de 175 à 200 g, provenant de l'élevage Charles River (Lyon, France). Ces rats ont été maintenus durant 2 semaines sous une phase d'adaptation au sein du Chronobiotron, CNRS-UMS3415, Strasbourg-France. Durant cette phase, ils ont été mis par 4 à 5 individus dans de grandes cages en plexiglas, sous un cycle LD : 12:12 (phase obscure : 19h00-07h00) et disposaient de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. A la fin de la phase d'adaptation, les animaux ont été séparés en trois groupes : un groupe témoin, un groupe à restriction alimentaire et un groupe à jeun (pour plus de détails voir chapitre V).

II. Prélèvements et suivi des paramètres physiologiques chez le dromadaire

1. Prélèvements sanguins et suivi des paramètres physiologiques

1.1. Prélèvements sanguins effectués

Chez les chamelles, des prélèvements sanguins (8 à 10 ml) ont été réalisés (pour plus de détails voir chapitre II et IV). Le sang a été prélevé sur des animaux en position de décubitus sternal par ponction altérnée des veines jugulaires droite et gauche, dans des tubes sous vides et héparinés. Les protéines sériques totales ont été dosées dans le plasma récupéré par centrifugation pendant 15 minutes à 3000 rmp (Rotation Par Minute). Sur le sang total, nous avons également déterminé le taux d'hémoglobine et le taux d'hématocrite.

1.1.1. Dosage de la protéinémie

La détermination des taux plasmatiques des protéines totales (PT) a été effectuée sur le plasma à l'aide d'un réfractomètre (ATAGO, CO, LTD Japon). La protéinémie est exprimée alors en gramme par 100 millilitres.

1.1.2. Dosage de l'hémoglobine

1.1.2.a. Principe

Les concentrations d'hémoglobine (Hb) dans le sang des chamelles sont déterminées par la méthode colorimétrique manuelle en utilisant un spectrophotomètre. Sous l'action d'un oxydant (potassium ferricyanide), l'Hb (Fe++) est transformée en méthémoglobine (Fe+++). La méthémoglobine ainsi formée se combine avec le cyanure de potassium (CNK) pour former un complexe (la cyanméthémoglobine) qui a un fort pouvoir d'absorption lumineuse à 540 nm.

1.1.2.b. Technique

Pour le dosage des taux d'Hb sur le sang total, nous avons utilisé le kit Haemoglobin-RANDOX. Il est composé de trois réactifs :

- Potassium ferricyanide : 0.61 mmol/l
- Potassium cyanide : 0.77 mmol/l
- Potassium phosphate : 1.03 mmol/l
- Surfactant : 0.1%

Un volume des réactifs est mélangé avec 9 volumes d'eau distillée et c'est avec cette solution diluée que le dosage a été effectué.

Dans un tube à essai, on introduit à l'aide d'une pipette 5 ml de la solution réactionnelle diluée qu'en a ajouté à 20 µl du sang total. Après 3 minutes, à l'aide d'un spectrophotomètre on mesure l'absorbance de l'échantillon par rapport à la solution réactionnelle, La lecture a été réalisée à une longueur d'onde de 540 nm. Ainsi la concentration en Hb est calculée par la formule suivante : **concentration en Hb (g/dl) = Absorbance x 36.77**

1.1.3. Détérmination du taux d'hématocrite

L'hématocrite (Ht) indique le pourcentage du volume occupé par les globules rouges par rapport au volume sanguin total. La détermination de l'Ht par centrifugation constitue une méthode de référence. Elle permet de séparer les composants solides du sang des composants liquides et de les concentrer. Cette méthode est définie dans la norme DIN 58933-1[4]. Conformément à cette dernière, lors du remplissage des tubes capillaires l'extrémité opposée

[4] DIN 58933-1 : Hämatologie. Bestimmung des Volumenanteils der Erythrozyten im Blut. Teil 1: Zentrifugationsmethode als Referenzmethode. Berlin : Beuth Verlag, janvier 1995.

à l'extrémité du remplissage doit rester sèche. Pour la détermination du taux d'Ht, les tubes capillaires sont remplis à environ 75%. Ensuite l'extrémité sèche de ces tubes est sellée avec du mastic. Pour se faire, on enfonce à la verticale chaque tube capillaire dans le mastic jusqu'à ce que le bord du tube touche le fond de la plaque à mastic. Par la suite on incline légèrement le tube et on le sort du mastic. Finalement, les tubes capillaires sont placés dans le rotor à hématocrite de telle sorte que l'extrémité sellée soit à l'extérieur. Le couvercle du rotor est mis en place et donc les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 1000 rmp. Le pourcentage d'Ht de chaque chamelle est déterminé à l'aide du disque de lecture.

2. Suivi de la température corporelle et la température ambiante

2.1. Suivi de la température corporelle

Pour le suivi de la Tb, nous avons utilisé des capteurs électroniques de la température Ibutton® qui permettent un enregistrement automatique selon un intervalle de temps fixé au préalable.

2.1.1. Ibutton® : capteur électronique de la température

2.1.1.a. Description de l'Ibutton®

La Ta et Tb ont été enregistrées grâce à un capteur électronique type thermorcon® de la famille des capteurs nommés Ibutton® (type DS1922L, fabriqué par Dallas Semiconductor, USA). Ce sont de petits capteurs (16 mm de diamètre et 6mm d'épaisseur) enregistreurs de la température et/ou d'humidité. Ces capteurs enregistrent la température (et/ ou l'humidité) de manière autonome et en continu dans une section de mémoire scellée dans de l'acier inoxydable. L'enregistrement est effectué à une vitesse définie par l'utilisateur. Au total, 8192 (8-bits) lectures ou 4096 (16-bits) valeurs mesurées à des intervalles équidistants allant d'une seconde à 273 heures peuvent être stockées. L'Ibutton® type DS1922L permet une lecture de température sur une échelle allant de -40°C à +85°C. Le programme d'interface utilisé pour ce capteur thermique, permet de choisir deux résolutions : 0.5°C pour le mode 8-Bits ou 0.0625°C pour le mode 16-bits. Le dispositif Ibutton® est configuré et programmé au préalable par une communication utilisant un lecteur externe relié à un ordinateur (**Figure 28**). Le programme d'interface «Onewireview» permet d'accéder aux diverses fonctions, notamment la programmation de l'Ibutton® sous forme de missions. Lors du lancement d'une mission, nous pouvons définir la résolution, l'intervalle d'enregistrement de la température,

ainsi que le moment exact du début de l'enregistrement. Un délai de temps peut être programmé afin de différer le début de la lecture.

Figure 28 : Ibutton® DS1922L fabriqué par Dallas Semiconductor, USA et son lecteur externe.

2.1.1.b. Programmation des Ibutton®

Avant chaque implantation, le capteur est programmé sous forme d'une mission grâce au logiciel « Onewireviewer » qui permet un accès à la programmation de l'Ibutton® via son lecteur relié à un ordinateur. Pour la programmation de chaque nouvelle mission, nous avons suivi les étapes suivantes :

- Synchronisation de l'horloge de l'Ibutton® avec celle de l'ordinateur.
- Choix d'un intervalle d'enregistrement de la température. Dans toutes expérimentations, nous avons choisi un interval de 10 minutes qui permet l'enregistrement pendant 28 jours.
- Choix d'une résolution de 16-bits (0,0625°C).
- Sélection de l'option de sauvegarde des données même à saturation de la mémoire.
- Définition d'un délai de temps avant le début de la mission.

Les Ibuttons® programmés destinés à être implantés, sont enrobés dans la paraffine-résine (Paraffin Wax/Elvax ; Mini-Mitter, Sunriver, OR, USA).

2.1.1.c. Choix du site d'implantation des Ibutton®

Les Ibuttons® enrobés ont été implantés au niveau du flanc gauche de chaque chamelle, entre le muscle oblique interne et le muscle transverse de l'abdomen. Ce site d'implantation a été choisi puisqu'il permet un accès et une récupération facile du capteur, une représentativité acceptable de la température centrale, un risque très minime d'hémorragie ou de complications chirurgicales. En outre, le choix de ce site pour implanter les capteurs est

fondé sur les travaux non publiés d'El Allali. En effet, les capteurs ont été placés dans différents sites dans le corps de deux chamelles : dans le rectum, le vagin, la bosse en sous cutané, en intramusculaire au niveau du flanc droit et gauche (entre les muscles oblique interne et transverse de l'abdomen), dans la musculature de la cuisse et en intra-cavité péritonéale. La comparaison des rythmes de température obtenus dans ces divers sites d'implantation a permis de constater que seuls les Ibuttons® implantés dans les muscles du flanc et dans la cavité abdominale ont permis d'obtenir un rythme de température similaire à celui obtenu avec les capteurs placés dans le rectum. Afin d'éviter les risques de péritonites et en regard de la difficulté de récupérer le capteur dans la cavité abdominale, le choix du site intramusculaire du flanc s'est avéré idéal. Des travaux basés sur l'utilisation de ce site pour enregistrer la Tb chez la chamelle ont été publiée par l'équipe dans l'article d'El Allali et *al*.(2013).

2.1.1.d. Protocole opératoire

La technique opératoire comprend les étapes suivantes (**Figure 29**) :

- Contention : chamelle en décubitus sternal, attachée par une corde qui relie les deux membres antérieurs toute en passant sur l'encolure.
- Rasage, lavage, dégraissage à l'alcool 60% et désinfection à la Bétadine® de la région opératoire, située à mi-distance entre la dernière côte et l'angle de la hanche à la bordure entre le creux et le fuyant du flanc. La séquence nettoyage et désinfection est répétée au mois trois fois avant l'anesthésie locale.
- Anesthésie de la chamelle par une dose type II de Xylasine (Rompun®, Bayer Allemagne) : 0.05 mg/Kg en intraveineuse (la veine jugulaire).
- Anesthésie locale : Chlorhydrate de Lidocaïne (Xylocaïne® 2%, Astrazeneca. Canda Inc), 20 mL en infiltration traçante (1 ml par point) autour de la future incision, quelques minutes avant l'incision cutanée.
- Une incision est pratiquée en passant par la corde du flanc. De l'extérieur vers l'intérieur les plans suivants sont incisés : la peau, la tunique abdominale, la partie charnue du muscle oblique externe et la partie charnue du muscle oblique interne.
- L'Ibutton® enrobé et désinfecté à la Bétadine® est placé entre les muscles oblique interne et transverse de l'abdomen.

- Sutures musculaires par un surjet simple en fil résorbable SAFIL® 2-0 (Glycomère-Tressé) alors que la peau est suturée par des points simples en fil de Dexon® 4-0 (Davis et Geck, USA).
- La plaie est couverte par pulvérisation d'une suspension d'Aluminium (Aluspray®).

Les Ibuttons® ont été implantés un ou plusieurs sur chaque chamelle, selon la durée de chaque protocole. A la fin de chaque expérience, le capteur est récupéré en pratiquant une nouvelle incision juste à côté du lieu de la première incision. La technique chirurgicale est identique à celle détaillée ci-dessus.

Figure 29 : Implantation des Ibuttons® dans le flanc gauche d'une chamelle.

2.2. Suivi de la température ambiante : étable expérimentale

Les chamelles ont été maintenues dans des étables à contrôle environnemental, situées à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc. Dans ces étables, les cycles de Ta et de photopériode sont contrôlables et manipulables. Chaque étable est équipée de six climatiseurs d'une puissance totale 75000 BTU, de 9 chauffages électriques et aménagée de sorte à minimiser les échanges de température avec le milieu extérieur. Le cycle LD est aussi contrôlé automatiquement (avec possibilité d'obscurité totale et de variation de la photopériode) par des minuteries électroniques contrôlant le moment du début et la fin de la phase lumineuse. La Ta a été enregistrée toutes les 10 minutes par un Ibutton® suspendu dans l'air ambiant de l'étable.

3. Suivi du poids corporel

Le poids des chamelles a été estimé durant les différentes conditions expérimentales de l'expérience 1 et 2 (voir chapitre IV) en utilisant la formule barymétrique de Boué A. (1949) adaptée par la suite par Graber M.(1966) suivante :

Poids corporel estimé (Kg) = [HGxTPxTAx52] ± 25 Kg, où :

HG : Hauteur au garrot en mètre, **TP :** Tour de la poitrine pris derrière le coussinet sternal et devant la bosse en mètre et **TA :** Tour de l'abdomen en passant par le point le plus haut de la bosse (**Figure 30**).

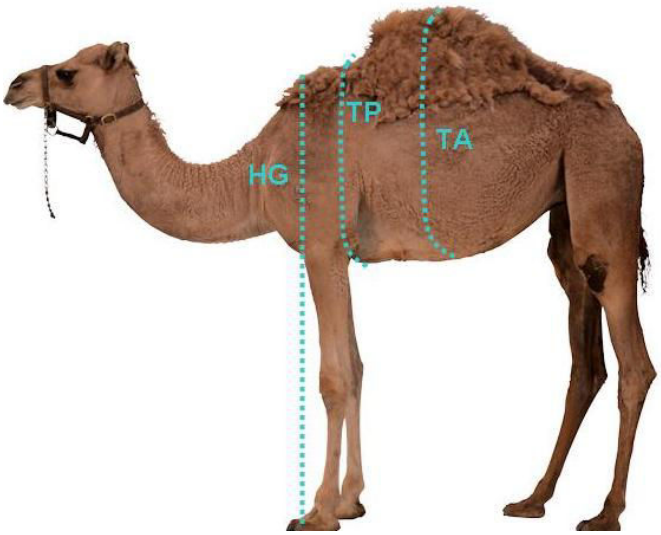

Figure 30 : Schématisation des mensurations barymétriques utilisées pour l'estimation du poids corporel chez le dromadaire.

III. Prélèvements et suivi des paramètres physiologiques chez le hamster d'Europe et le rat

1. Prélèvements effectués chez le hamster d'Europe et le rat

1.1. Prélèvements de cerveaux

Les horaires de prélèvements ainsi que le nombre d'animaux prélevés par point dépendent de l'expérience. Ainsi, dix minutes avant le temps du sacrifice, chaque rongeur a été injecté par une dose létale de l'éthyl-méthyl-butyl-barbiturate de sodium (Pentobarbital Sodique®, Ceva Santé Animal, France) à raison de 100 mg/kg en intra-péritonéale. Immédiatement, les animaux ont été transférés dans la salle d'autopsie où les cerveaux des rongeurs qui feront l'objet d'une **Immunohistochimie** sont prélevés après sacrifice par perfusion intracardiaque de 200 ml d'une solution de tampon phosphate salin (PBS 1X, PH=7.4) puis de 400 ml de fixateur (paraformaldéhyde 4% (PAF), préparé à partir d'une solution stock de 20% diluée dans du tampon phosphate (PB 0.1M, pH= 7.2)). Après perfusion, les animaux ont été décapités, puis les cerveaux prélevés, post-fixés dans du PAF 4% pendant une nuit à 4°C et après rincés dans plusieurs bains de PBS 1X. Ils sont ensuite cryoprotégés par immersion

successive dans des solutions de sucrose à 10%, 20% et 30%, les deux premières étapes durant 24 h et la dernière pendant 48 h. Ils sont alors congelés dans l'isopentane à -40°C puis conservés à -80°C. Des coupes frontales d'une épaisseur de 30 µm ont été réalisées à l'aide du cryostat à -24°C (Leica CM 3000). Les coupes sont collectées dans une solution de PBS 1X contenant un antibactérien le sodium azide (NaN3) dilué à 0.05%.

1.2. Pinéalectomie chez le hamster d'Europe

Chez le hamster d'Europe, comme chez tous les rongeurs, la glande pinéale est située sous les méninges entre les deux hémisphères cérébraux et le cervelet. Cette zone est placée à l'aplomb du point lambda qui est facilement repérable sur la voûte de la boîte crânienne (point d'intersection des sutures sagittale et occipitale). Les animaux ont été placés un par un dans la boite à isoflurane (3% d'isoflurane) pendant au moins 5 minutes. Ensuite, ils ont reçu par voie intrapéritoniale un mélange d'anesthésique composé de 1 volume de tiletamine et zolazépam (Zoletil 20® Virbac) et 1/4 de volume de xylasine 2% (Rompun® Bayer). Par exemple, pour 2 mL de Zoletil + 0,5 ml de Rompun, on a injecté 0,2 à 0,21 ml par 100 g de poids corporel. L'effet anesthésique est observé en moins de 5 minutes et se prolonge pendant plus de 3 heures. Après rasage et désinfection du site chirurgical, les hamsters anesthésiés sont ensuite placés dans un appareil de stéréotaxie. La tête est fixée entre les deux barres d'oreilles à la position 0,25 mm afin d'empêcher tout mouvement horizontal et le museau est maintenu par la barre d'incisives pour empêcher tout mouvement vertical. La peau du crâne est incisée derrière les yeux à l'arrière des oreilles sur une longueur de 2 à 3 cm, ensuite le tissu musculaire et le périoste sont débridés sur les côtés et en arrière de l'incision. Une trépanation de 5 mm de diamètre centrée sur le point lambda est effectuée, faisant apparaitre le sinus veineux dural. Le disque osseux est ensuite conservé dans du sérum physiologique. Le sinus veineux supérieur est incisé, rendant la glande pinéale accessible pour ablation mécanique à l'aide de pinces fines courbes. Afin d'avoir une vue dégagée de la pinéale et de réaliser l'ablation dans de bonnes conditions, le saignement généré par l'incision du sinus veineux est jugulé via une pompe à vide tout au long de la procédure d'ablation. L'hémorragie provoquée par la chirurgie est ensuite stoppée grâce à la pose d'un morceau d'éponge hémostatique (Bloxang®). Le disque circulaire osseux maintenu dans du sérum physiologique est ensuite remis en place et la peau est refermée à l'aide d'agrafes chirurgicales (agrafes Bruneau® de 7,5 mm). Une injection sous cutanée de 2-4 ml d'une solution de sérum physiologique à 37°C est réalisée pour compenser la perte sanguine induite par l'incision du sinus veineux.

IV. Immunohistochimie

1. Principe

L'immunohistochimie est une technique permettant la détection dans une cellule ou dans un tissu un antigène reconnu par un anticorps grâce à la liaison spécifique antigène-anticorps (Ag-Ac). La révélation se fait par couplage d'une enzyme à l'Ac, en présence d'une substance chromogène (**Figure 31**).

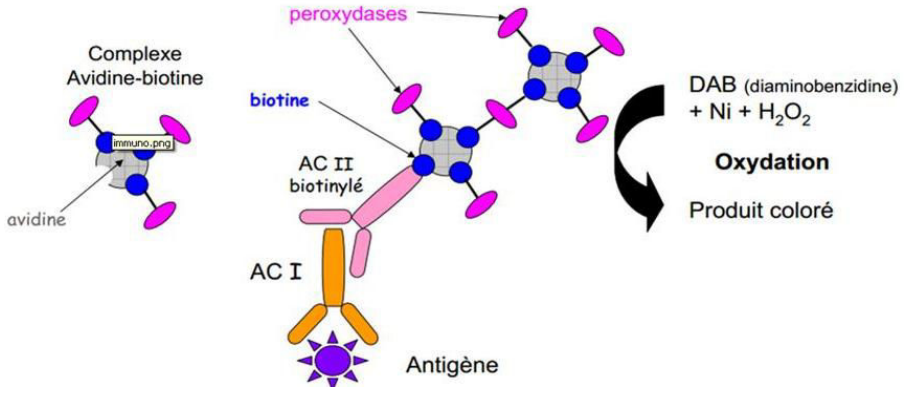

Figure 31 : Schématisation du principe d'immunohistochimie.

Adapté d'après (Boenisch, 2001)

2. Immunohistochimie : simple marquage

Dans certaines expérimentations, afin de détécter l'activité neuronale nous avons utilisé la protéine c-Fos. Il s'agit d'un facteur de transcription le plus fréquement synthétisé suite à un signal activateur. Les gènes de réponse précoce, comme *c-fos* et *Jun B* sont très rapidement transcrits suite à une stimulation par exemple lumineuse (Mahoney et *al*., 2001). Une fois traduits, ces élements forment des hétérodimères qui vont ensuite activer la transcription des gènes tradifs. La protéine c-Fos est incapable de s'homodimériser et de se fixer à la molécule d'ADN. Avec c-Jun, ils reconnaissent précisément la séquence de nucléotides adéquate sur l'ADN.

Dans la technique d'immunohistochimie : simple marquage, les coupes flottantes de cerveaux subissent tout d'abord trois rinçages de 10 minutes dans du PBS 1X, suivi d'une étape d'élimination de la peroxydase endogène (3% H_2O_2, PBS 1X) d'une durée de 20 minutes suivi à nouveau de 3 rinçages. Les sites non spécifiques de fixation de l'anticorps sont bloqués par un tampon de saturation contenant 10 % du sérum de chèvre (Chemicon®, Merck-millipore, USA), 0.3% du Tween-20 dans du PBS 1X pendant 1h à une température

ambiante. Les coupes de cerveaux sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire polyclonal anti-c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, sc-52, lot # I0710) dilué à 1/10000 dans la même solution de préblocage mais avec juste 5% du sérum, pendant 48 heures à 4°C sous agitation. Les coupes sont alors rincées dans du PBS 1X et incubées avec un anticorps secondaire biotinylé (Vector Laboratories, anti-lapin conçu chez la chèvre, CAT, BA-1000) dilué à 1/500 dans un tampon contenant 0.3% du Tween-20 dans du PBS 1X, pendant 2h à température ambiante sous agitation. De nouveau, les coupes sont rincées et incubées 1 heure dans un complexe avidine-biotine-peroxydase (Vectastin kit, Vector Laboratories) dilué à 1/500 dans un tampon contenant 0.05% du Tween-20 dans du PBS 1X. Après rinçage, la révélation est induite par l'ajout de 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.5 mg/ml, Sigma) et d'H_2O_2 (0.015%). Cette réaction a été suivie et arrêtée après 6 min. Après rinçage dans du PBS 1X, les coupes sont finalement montées sur lames gélatinées, laissées une nuit à température ambiante et sont déshydratées dans des bains d'alcool progressifs : 70%, 95%, 100%, 100% de 10 minutes chacun et placées dans deux bains de toluène pour clarifier durant 10 minutes chacun.

3. Immunohistochimie : double marquage

Nous avons utilisé cette technique afin de phénotyper les neurones immunoreactive c-Fos. Les coupes flottantes subissent le même traitement décrit dans le paragraphe ci-dessus, mais dont l'étape de révélation est différente. En effet, en plus de la 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.5 mg/ml, Sigma) et d'H_2O_2 (0.015%), nous avons utilisé le sulfate de nickel à 2% afin d'intensifier la couleur de la DAB. Après les trois rinçages de 10 minutes dans du PBS 1X contenant 0.05% de Tween-20, les coupes sont fixées dans du PAF 4% pendant 5 minutes à température ambiante. Les coupes sont de nouveaux rincées et incubées avec le 2^{éme} anticorps primaire (**Tableau 4**) pendant 24 heures à 4°C sur agitateur. Les coupes sont alors rincées dans du PBS 1X et incubées avec un anticorps secondaire biotinylé (**Tableau 4**), pendant 2h à température ambiante sous agitation. De nouveau, les coupes sont rincées et incubées 1 heure dans un complexe avidine-biotine-peroxydase (Vectastin kit, Vector Laboratories) dilué à 1/500 dans un tampon contenant 0.05% du Tween-20 dans du PBS 1X. Après rinçage, la révélation est induite par l'ajout de 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.5 mg/mL, Sigma) et H_2O_2 (0.015%). Cette réaction a été suivie et arrêtée après 6 min. Après rinçage dans du PBS 1X, les coupes sont finalement montées sur lames gélatinées, laissées une nuit à température ambiante et sont

déshydratées dans des bains d'alcool progressifs : 70%, 95%, 100%, 100% de 10 minutes chacun et placées dans deux bains de toluène pour lesclarifiés durant 10 minutes chacun.

Tableau 4 : La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en immunohistochimie double

Anticorps	Type	Référence	Concentration
C-Fos	polyclonal	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	1/10000
B-endorphin/Met-enkephalin (C-15)	polyclonal	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	1/800
Donkey Anti-Rabbit	Biotin-SP-conjugated	Jackson ImmunoResearch	1/200
Horse Anti-goat	Biotin-SP-conjugated	Vector Laboratories	1/500

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques effectuées seront expliquées en détails dans chaque chapitre de la partie Résultats.

RÉSULTATS

Chapitre IV : Identification d'une régulation complexe du système de thermorégulation chez le dromadaire « *Camelus dromedarius* ».

Chapitre V : Intégration du signal photopériodique chez le hamster d'Europe : mise en évidence d'une voie indépendante de la mélatonine.

Chapitre IV. IDENTIFICATION D'UNE REGULATION COMPLEXE DU SYSTEME DE THERMOREGULATION CHEZ LE DROMADAIRE « *Camelus dromedarius* »

I. Introduction

- ✓ Stratégies d'adaptation du monde animal au milieu aride
- ✓ Particularités physiologiques du dromadaire en relation avec son adaptation aux conditions du désert

II. Facteurs de régulation du système de thermorégulation chez le dromadaire

- ✓ Effet de la déshydratation et du stress thermique sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire : état d'hétérothermie
- ✓ Effet de la diminution progressive de l'alimentation sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire

III. Discussion

I. Introduction

Quelques soient les régions du globe, les variations cycliques de l'environnement sont présentes mais elles sont très prononcées dans les zones arides. C'est le cas du Sahara, le plus vaste et le plus chaud désert du monde. Le Sahara est une écorégion désertique s'étirant sur 7500 kilomètres et couvrant 12 millions de kilomètres carrés. Il traverse tout le continent africain depuis l'océan Atlantique jusqu'à la mer Rouge et il descend de la Méditerranée jusqu'à la bonde Sahelienne (au sud du tropique du Cancer) au-delà de laquelle la végétation reprend ses droits. Au-delà de la mer Rouge, le Sahara se prolonge par le désert Arabique (appelé désert Sharo-arabique) constituant alors la partie occidentale d'une vaste diagonale sèche s'étendant jusqu'en Mongolie.

On croit que le Sahara est un milieu inerte puisqu'il est caractérisé par une aridité accentuée due à la rareté et l'irrégularité des précipitations au cours de l'année (1-100 mm), et par des températures très élevées qui peuvent dépasser facilement 50°C à l'ombre, cependant en réalité il s'agit d'un environnement qui abrite une faune et une flore qui s'y adaptent parfaitement.

1. Stratégies d'adaptation du monde animal au milieu aride

Le Sahara le plus grand des déserts, est une immensité de rocs et de sable. Les différentes formes de vie qu'on y rencontre dépendent d'un grand trésor sans prix : l'eau. Dans ce biotope, les êtres vivants sont confrontés à la chaleur du jour surtout en été quand elle atteint son paroxysme, aux radiations solaires, à la rareté de l'eau et/ou parfois au manque de nourriture. Les créatures qui le peuplent ont donc adopté des stratégies de survie.

La plupart des animaux désertiques sont adeptes de la vie nocturne ou crépusculaire, par exemple dans le désert de Sonora « entre les États-Unis et le Mexique » 93% des espèces de rongeurs sont nocturnes (Walsberg, 2000). Le jour, ils doivent chercher un refuge pour se protéger du soleil en cherchant de l'ombre ou encore en s'enfouissant dans des terriers (gerboise, fennec...) où ils trouvent des conditions thermiques favorables, limitant ainsi la déperdition d'eau. D'autres résistent à la chaleur du jour grâce au développement de certains organes. Par exemple, les grandes oreilles de l'éléphant ou du fennec leur servent à évacuer les excès de chaleur, l'épiderme dur et imperméable du scorpion le protège des chaleurs intenses ou encore la toison de soies argentées de la fourmi saharienne (*Cataglyphis bombycina*) lui permettant de réfléchir le rayonnement solaire. Les animaux s'accommodent aussi des conditions extrêmes du désert grâce au développement de mécanismes favorisant

l'économie de l'eau. En effet, certaines espèces déserticoles sont capables de ne pas boire, elles utilisent l'eau contenue dans les aliments qui varie de 60-70% (chez les carnivores) à 80-90% (chez les herbivores). Pour les herbivores, il n'est pas rare de ne trouver que des végétaux secs. Les antilopes évitent ce problème en se nourrissant que la nuit pendant laquelle les plantes déshydratées s'imbibent de l'humidité atmosphérique qui a augmenté de près de 40% par rapport au jour. L'eau métabolique constitue le sous produit de la respiration cellulaire lors de la phosphorylation oxydative. En effet chez les Rats-kangourous (*Dipodomys spectabilis*), elle peut représenter près de 90% de l'approvisionnement en eau.

Comme évoqué précédemment, le désert est une mosaïque de biotopes différents. Chaque espèce a choisi celui qui lui convient le mieux : le sable pour les fouisseurs ou les rochers pour ceux qui peuvent se glisser dans les petits interstices. Cependant, un tel choix est bien entendu inconcevable pour un animal de la taille du dromadaire. D'autres mécanismes physiologiques d'adaptation ont été mis en œuvre par cette espèce pour lutter contre l'aridité, ce qui fait de lui un modèle biologique remarquable.

2. Particularités physiologiques du dromadaire en relation avec son adaptation aux conditions du désert

Le dromadaire est un animal, bien adapté aux conditions extrêmes des milieux arides et semi-arides telle qu'un fort écart thermique journalier, une aridité de l'air, une pénurie hydrique, une faible valeur nutritive et la dispersion des ressources alimentaires.

2.1. Aspects d'adaptation du dromadaire à la chaleur

2.1.1. Comportement adaptatif et particularités de la robe et de la peau du dromadaire

Le dromadaire présente un ensemble de spécificités comportementales et anatomiques qui contribuent à sa résistance aux écarts thermiques, caractéristiques des milieux désertiques. L'observation des troupeaux de dromadaire pendant la journée, révèle que ces derniers maintiennent une position debout pour éviter les chaleurs très élevées au niveau du sol (75 à 80°C). Au repos, le dromadaire oriente son corps face au soleil pour limiter l'impact des rayons solaires puisqu'ainsi il peut réduire la surface exposée de son corps. La position de décubitus sternal lui permet aussi de minimiser la surface de son corps exposée à la chaleur du sol. En effet, une telle position assure que la majeure partie du corps reste soulevée par rapport au sol grâce aux coussinets articulaires et la callosité sternale rapporté par Wilson (1984). Chez la plupart des races du dromadaire, la couleur de la robe souvent claire permet

ainsi de mieux refléter les rayons solaires. Elle est recouverte d'une épaisse toison qui tombe d'elle même en été (la mue). La variation de la température de la surface des poils par rapport à la variation de la température de la peau est plus élevée au niveau de la bosse par rapport aux régions axillaires et le flanc, ce qui indique l'importance de la fourrure du dromadaire dans la protection contre les variations quotidiennes de la Ta en réduisant les pertes hydriques cutanées (Abdoun et *al.*, 2012). Les glandes sudoripares sont réparties sur pratiquement toute la surface du corps sauf au niveau des lèvres, les narines externes et la région péri-anale (Lee & Schmidt, 1962; Taha & Abdalla, 1980). Elles s'activent quand la Tb dépasse 42°C. Abdoun et ses collaborateurs (2012) ont démontré que le taux de transpiration chez le dromadaire présente des variations circadiennes concomitantes au rythme circadien de la Ta. En effet, la thermographie infrarouge a révélé que les régions axillaires et des flancs présentent un gradient thermique faible à une Ta élevée et l'inverse à une Ta basse, ce qui suggère que ces deux régions interviennent dans la dissipation de la chaleur pendant la nuit.

2.1.2. La bosse du dromadaire, une adaptation anatomique

La bosse du dromadaire ne constitue pas une réserve d'eau comme le prétend la légende mais il s'agit en réalité d'une réserve énergétique qui joue plusieurs rôles entre autres dans la thermorégulation. En effet, près de la moitié du gras total de l'animal est localisé au niveau de sa bosse. Cette adaptation anatomique intervient dans la thermorégulation puisque la concentration des réserves adipeuses au même endroit limite la distribution du gras sous cutané et par conséquent facilite la dissipation cutanée de la chaleur au niveau des autres parties du corps (Bengoumi & Faye, 2002).

2.1.3. Refroidissement sélectif du cerveau chez le dromadaire

Le dromadaire a la capacité de supporter des Tb élevées (≈ 42°C) enregistrées sous des conditions de déshydratation couplées au stress thermique, sans avoir d'effet néfaste sur l'intégrité de son cerveau (Zguigal & Ghoshal, 1991; Elkhawad, 1992). Le système de refroidissement du cerveau (**Figure 32A**) fournit une protection et permet au dromadaire de survivre à des températures qui seraient normalement létales. La température du cerveau du dromadaire est inférieure par plusieurs degrés de la Tb. En effet chez un dromadaire parfaitement hydraté, la Tb se situe entre 36 et 38°C. Dans ces conditions, le sang veineux préalablement refroidi dans la cavité nasale rejoint directement la circulation sanguine générale (**Figure 32B**). En revanche, lorsqu'un dromadaire déshydraté accumule de la chaleur

et augmente sa Tb pendant le jour dans un milieu chaud, une adaptation anatomique du système veineux est observée. En effet, les veines nasale et angulaire deviennent plus larges alors que la veine faciale se rétrécie permettant ainsi au sang veineux préalablement refroidi dans la cavité nasale de shunter dans une seule direction via les veines ophtalmiques vers le sinus caverneux qui ensuite assure le refroidissement du sang artériel à travers un échange de chaleur au niveau de l'artère carotide (**Figure 32 B**) (Elkhawad, 1992).

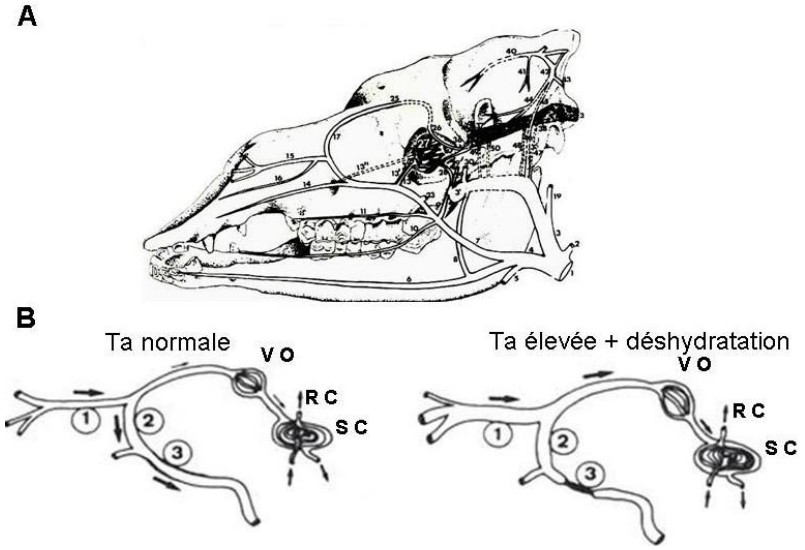

Figure 32 : Implications des veines superficielles de la tête du dromadaire dans le refroidissement sélectif du cerveau.

1 : Veine nasale ; 2 : Veine angulaire ; 3 : Veine faciale ; V O : Veine ophtalmique ; R C : Réseau carotidien ; S C : Sinus caverneux ; Ta : Température ambiante.

Modifié d'après Elkhawad (1992) et Zguigal and Ghoshal, 1991

2.2. Aspects d'adaptation du dromadaire à la sous alimentation

Dans les zones arides et semi arides, le couvert végétal dépend surtout de la quantité d'eau disponible. D'une manière générale et en dehors des oasis, il est caractérisé par une rareté, une grande dispersion et une forte variabilité temporelle. Au sein de ce biotope, le dromadaire est connu pour sa résistance à la privation prolongée d'eau. En outre, ce mammifère survit plus longtemps que les autres ruminants domestiques quand les ressources alimentaires sont faibles et les fourrages sont peu digestibles. De point de vue métabolisme énergétique, le dromadaire se distingue des autres animaux entre autres par une glycémie supérieure à 1 g/L (Chandrasena et *al.*, 1979a) comparable à celle des monogastriques et donc très élevée par rapport à celle des autres ruminants. En effet, ceux-ci assurent l'essentiel de leurs besoins énergétiques à partir de la production d'acides gras volatils et par conséquent une faible quantité de glucose est générée. Par ailleurs, le dromadaire présente un métabolisme énergétique particulier (Chandrasena et *al.*, 1979a; Emmanuel, 1984), que l'on peut résumer

par une néoglucogenèse très active tant au niveau du foie que du rein (Emmanuel, 1981b; Bengoumi & Faye, 2002), ce qui lui permet de maintenir une glycémie presque normale en cas de privation de nourriture (Wensvoort et *al.*, 2001) avec en particulier une très faible cétogenèse qui résulte d'une faible transformation du butyrate en 3-hydroxybutyrate par l'épithélium du rumen ou par le foie (Chandrasena *et al.*, 1979b; Emmanuel, 1981a). Le butyrate absorbé est directement utilisé par le rein comme source d'énergie (Emmanuel, 1980), et par le tissu adipeux comme précurseur de la synthèse des acides gras longs, ainsi que de l'acétate. Toutefois à long terme, la sous alimentation provoque une diminution de la glycémie chez le dromadaire (Delavaud et *al*., 2013). Du point de vue du métabolisme azoté, le dromadaire répond aux déficits protéiques d'origine alimentaire par des mécanismes qui mettent en jeu la réabsorption tubulaire de l'urée et son recyclage très actif afin de rejoindre le tube digestif via la salive ou l'épithélium du rumen, assurant par la suite le maintien de la protéosynthèse ruminale (Gihad *et al.*, 1989; Jouany, 2000; Bengoumi & Faye, 2002). Ces spécificités témoignent de l'adaptation du dromadaire à des situations transitoires de sous alimentation énergétique ou azotée. Ainsi, avec une ration équilibrée, l'urée filtrée par le rein est excrétée à 40%. Cependant lorsque le dromadaire dispose d'une ration déficitaire en protéines, il excrète seulement 1 à 2% de son urée (Bengoumi, 1992). Ce n'est que lors d'une privation de nourriture prolongée caractérisée par un catabolisme protéique excessif qu'on peut observer des urémies très élevées (Faye et *al.*, 1992).

2.3. Aspects d'adaptation du dromadaire à la déshydratation

C'est dans des conditions environnementales très rudes et très contraignantes, notamment lors de la déshydratation prolongée, que le dromadaire dévoile ses exceptionnelles qualités. En effet, cet animal est souvent confronté à des longues périodes de pénurie hydrique et quand l'eau de boisson est disponible par exemple après la saison des crues, les mares d'eau qui persistent sont souvent saumâtres à cause de l'évaporation très élevée caractéristique des zones désertiques (Yagil, 1986). Pour s'adapter à la déshydratation, le dromadaire adopte des stratégies spécifiques résultantes de ces particularités anatomiques et physiologiques remarquables qui sont étudiées depuis longtemps (Adolph & Dill, 1938; Bengoumi, 1992) afin de réduire ses dépenses énergétiques et économiser ses pertes hydriques, tout en maintenant un équilibre homéostatique entre la concentration des éléments vitaux pour sa survie et l'excrétion maximale des déchets métaboliques. Ces mécanismes adaptatifs concourent à limiter les pertes hydriques par des processus d'économie à savoir : une

diminution de la diurèse (Schmidt-Nielsen, 1964a; Yagil & Berlyne, 1976; Mc Farlane, 1977; Yagil, 1993) impliquant en particulier la vasopressine du système hypothalamo-neurohypophysaire (Achaaban *et al.*, 1992; Elkhawad, 1992; Bengoumi *et al.*, 1993). Également une diminution de **l'évaporation cutanée** (Schmidt-Nielsen *et al.*, 1956; Abdoun *et al.*, 2012), une **diminution du métabolisme basal** et **de la fréquence respiratoire** (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1967) et **une augmentation des variations quotidiennes de la Tb** en fonction de l'avancement de l'état de déshydratation du dromadaire grâce à un système de thermorégulation très actif qui lui permet de diminuer l'écart de la température avec le milieu ambiant et de limiter le gain de chaleur (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957).

La **Figure 33** résume les majeurs mécanismes physiologiques d'adaptation mis en jeu par le dromadaire pour échapper aux effets de la chaleur intense et pour résister aux périodes de pénurie hydrique dans son environnement désertique.

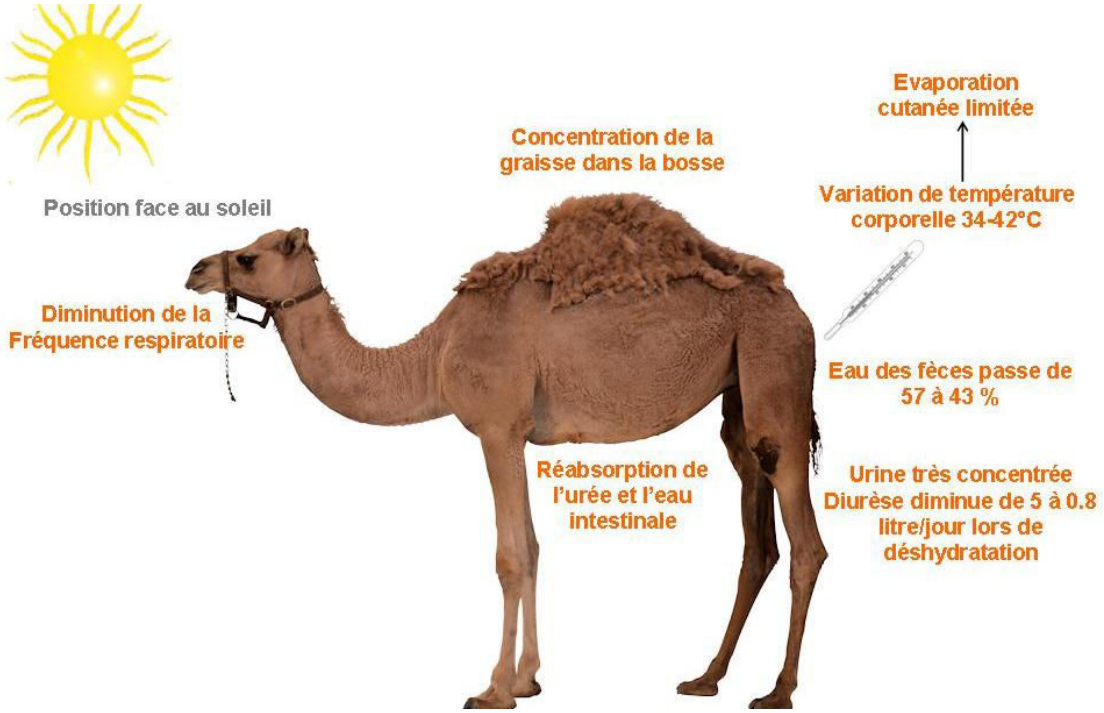

Figure 33 : Stratégies adoptées par le dromadaire pour supporter la chaleur du désert et la pénurie de l'eau.

Modifié d'après Bonne. (1998)

La Tb du dromadaire parfaitement hydraté est pratiquement stable, elle oscille entre 36 et 38°C. Cependant, durant la déshydratation et sous un stress thermique, le dromadaire accumule passivement la chaleur du jour et par conséquent sa Tb augmente jusqu'à ce qu'elle atteint un maximum physiologique (≈ 42°C) vers la fin d'après-midi (**Figure 34**). La nuit

quand la Ta est faible, la chaleur corporelle stockée le long de la journée va être dissipée d'une manière non-évaporative. Par conséquent, le métabolisme basal est réduit et l'eau corporelle est préservée (Schmidt-Nielsen *et al.*, 1957; Zine-Filali, 1991; Ayoub & Saleh, 1998).

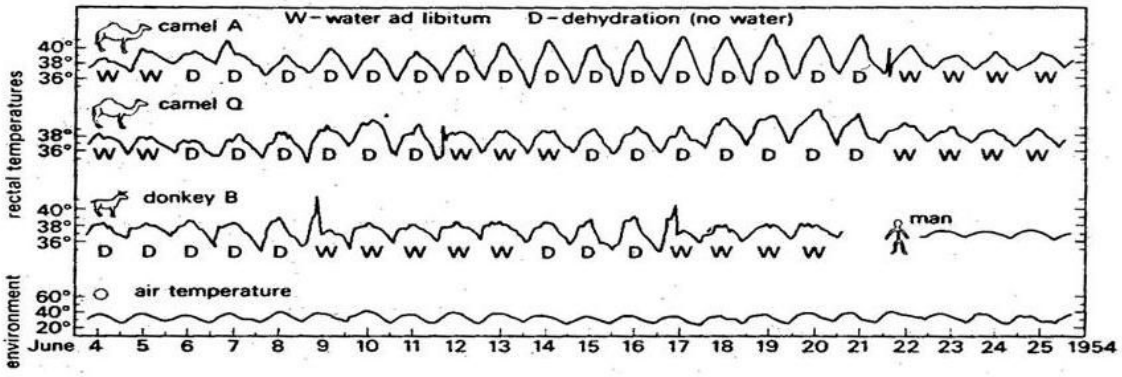

Figure 34 : Comparaison du système de thermorégulation chez le dromadaire avec d'autres mammifères.

Température rectale chez le dromadaire (chez l'âne et chez l'Homme) sous des états de privation et de non privation hydrique et sous des températures de l'environnement

D'après Schmidt-Nielsen et *al.* (1957)

Sous des Ta très élevées et selon la disponibilité de l'eau de boisson, le système de thermorégulation chez le dromadaire oscille entre l'homéothermie et la poïkilothermie. La Ta et la disponibilité de l'eau semblent avoir un effet très remarquable chez cet animal. Le rythme de Tb chez ce mammifère est généré d'une part par l'horloge circadienne et d'autre part, c'est une réponse d'une régulation thermique. Ces deux composantes (circadienne et thermorégulatrice) sont contrôlées par les cycles journaliers de Ta. De là, il est primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans l'entrainement de l'horloge circadienne par les cycles journaliers de Ta. Pour cela, il serait intéressant d'étudier le fonctionnement de l'horloge circadienne sous des états d'hétérothermie tout en suivant deux sorties de l'horloge à savoir le rythme de Tb et le rythme de MLT. Ceci va nous permettra de comprendre si le système circadien fonctionne normalement sous des états d'hétérothermie. Toutefois, une équipe saoudienne qui s'intéresse particulièrement aux mécanismes impliqués dans le système de thermorégulation du dromadaire (Al Haidary, 2005), a remis en cause ce processus d'hétérothermie chez le dromadaire déshydraté et exposé à des hautes Ta.

II. Facteurs de régulation du système de thermorégulation chez le dromadaire

1. Effet de la déshydratation et du stress thermique sur le rythme de la Tb chez le dromadaire : état d'hétérothermie (expérience 1)

Dans cette étude, nous avons vérifié l'existence de l'hétérothermie dans des conditions expérimentales chez le dromadaire déshydraté et exposé à un stress thermique.

1.1. Procédure expérimentale

1.1.1. Animaux

Pour cet objectif, six chamelles, non gestantes, toutes pubères ; âgées de 9 à 13 ans, appartenant à la race du sud (variétés Guerzni, Marmouri et Khouari), préalablement déparasitées avec du Moxidectine (Cydectin®1%, Pfizer santé animal France) et vaccinées contre la variole (CAMEL VAX POX®, MCI Maroc) ont été utilisées. Cette expérience s'est déroulée dans une étable dans laquelle les cycles de Ta et de photopériode sont contrôlables et manipulables. Elle est située à l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II à Rabat, Maroc (34°1'12''N/6°49'48''W).

1.1.2. Protocol expérimental

Tout au long de cette expérience, les chamelles ont été placées sous un cycle artificiel de photopériode (LD 12:12) avec un passage lumière-obscurité à 20h00 (durant la phase d'éclairement, l'intensité moyenne de la lumière était de 350 lux). Durant cet essai, un cycle journalier de Ta a été instauré avec une amplitude élevée afin d'induire un stress thermique (Ta maximale enregistrée vers la fin de la phase d'éclairement oscillait entre 38-46°C et la Ta minimale enregistrée vers la fin de la phase d'obscurité se situait entre 20-25°C). L'humidité relative de l'air ambiant au sein de l'étable était d'environ 30.0%. Les chamelles recevaient quotidiennement vers 09h00 du matin une seule ration alimentaire composée d'un aliment concentré destiné au dromadaire (MARAA®, Alf Sahel Maroc) à raison de 2 Kg/chamelle/jour et de la paille de blé à raison de 3 Kg/chamelle/jour. La teneur totale en eau de la ration distribuée était de 13%. Les animaux avaient un accès libre à l'eau de boisson sauf pendant la phase de déshydratation durant laquelle l'eau a été retirée totalement. En outre, tout le long de cette expérience leur activité locomotrice a été partiellement restreinte.

En attachant les licols aux murs de l'étable, les chamelles pouvaient rester debout ou s'asseoir en position de décubitus sternal.

Sur une durée de 29 jours, entre le mois de juillet et août, cette étude s'est déroulée selon 3 phases successives : une phase I d'hydratation (8 jours) suivi immédiatement d'une phase II de déshydratation (19 jours) et en fin une phase III de réhydratation (2 jours).

Les températures ambiantes et corporelles ont été enregistrées grâce à des capteurs électroniques : Ibuttons® (voir Matériel et Méthodes) programmés pour relever les températures toutes les 10 min à la plus faible résolution 0.0625°C. Pour le monitoring de la Ta, l'Ibutton® a été suspendu au sein de l'étable. Par contre pour le suivi de la Tb, les Ibuttons® préalablement programmés ont été enrobés dans la paraffine-résine (Paraffin wax/Elvax ; Mini-Mitter, Sunriver, OR, USA). Chirurgicalement ces Ibuttons® enrobés ont été implantés au niveau du flanc gauche de chaque chamelle, entre le muscle oblique interne et le muscle transverse de l'abdomen (voir Matériel et Méthodes).

Le paramètre principal de notre étude est le rythme de la Tb, mais puisque les chamelles ont été placées sous de hautes Ta (des températures journalières oscillant entre 38 et 46°C) et ont été totalement privée d'eau de boisson durant 19 jours consécutifs (phase de déshydratation), le suivi d'un certain nombre de paramètres était indispensable. Quotidiennement, nous avons suivi la prise alimentaire, le volume d'eau ingéré (pendant la phase d'hydratation et de réhydratation), la fréquence cardiaque et la fréquence respiratoire. Tout les 3 jours, nous avons suivi l'évolution du poids corporel, la PT, le taux d'Hb et le taux d'Ht.

1.2. Analyses statistiques

Les données fournies par les capteurs Ibutton® correspondent à des mesures en continu de Tb, sur une période de 29 jours, pour chaque chamelle et chaque expérience. Les résultats obtenus sont exprimés en valeur moyenne ± SEM.

La comparaison des trois phases expérimentales (hydratation, déshydratation et réhydratation durant l'expérience 1 est assurée par une ANOVA à un seul facteur et à mesures répétées, suivi par le test post-hoc de Tukey en utilisant le logiciel STATISTICA 10.0 (StatSoft, France). Un effet est considéré comme significatif si la probabilité p est révélée inférieure ou égale à 0.05.

Dans l'expérience 1, une autre analyse avec une représentation de la Tb en fonction de la Ta "Tb= f(Ta) " a été réalisée et une ligne d'identité, représentant les points Ta=Tb a été

identifiée. La relation entre Ta et Tb a été vérifiée durant les 3 phases de chaque expérience chaque 24-h sur des données enregistrées toutes les 10 min.

1.3. Résultats

1.3.1. Rythme de la température corporelle

L'évolution de la Tb d'une chamelle représentative (H), en fonction du temps et durant les trois phases successives de cette expérience est représentée dans la **Figure 35**. Un rythme journalier et régulier de la Tb existe avec des températures minimales (Tb_{min}) enregistrées tôt le matin et des températures maximales (Tb_{max}) relevées en fin d'après-midi. Dans la **Figure 36**, l'évolution de la Tb moyenne chez les 6 chamelles au long de l'expérience est représentée. Les résultats sont cohérents avec ceux d'une seule chamelle. Pendant la phase d'hydratation, l'amplitude du rythme moyen de la Tb était faible. Ainsi, l'amplitude moyenne durant les 4 derniers jours de cette phase est de 2.39±0.11°C avec une Tb_{min} de 35.37±0.13°C et une Tb_{max} de 37.76±0.10°C enregistrée le soir. Cette faible amplitude enregistrée durant la phase d'hydratation confirme l'existence d'un état d'homéothermie, démontré auparavant (Schmidt-Nielsen et *al*., 1957; Zine-Filali, 1991) chez le dromadaire parfaitement hydraté et placé sous des hautes Ta. En phase II, en maintenant les mêmes conditions de photopériode et de Ta et en privant totalement les animaux d'eau de boisson pendant 19 jours consécutifs, le rythme journalier de Tb persiste avec une amplitude croissante. En effet, l'amplitude du rythme moyen de la Tb commence à augmenter progressivement après 7 jours de privation hydrique (le 15ème jour de l'expérience). Après 19 jours de restriction hydrique (le 27^{éme} jour de l'expérience), l'amplitude du rythme moyen de la Tb devient plus importante et atteint 3.8±0.25°C (**Figure 36**) avec une Tb_{min} de 35.42±0.17°C et Tb_{max} de 39.22±0.11°C enregistrée le soir.

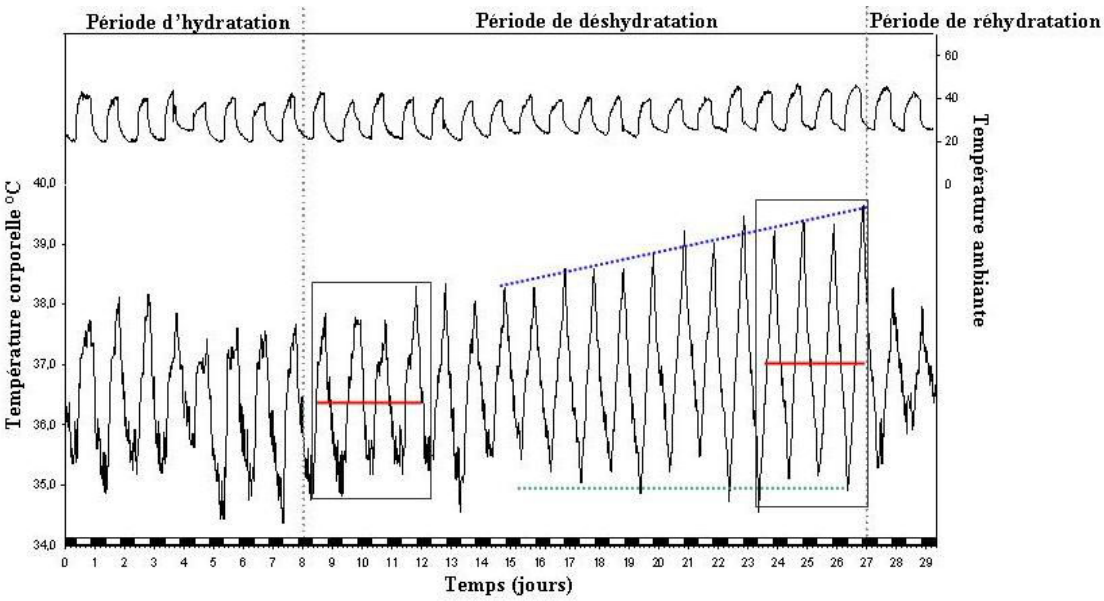

Figure 35 : Evolution du rythme de la température corporelle d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience1.

La chamelle H a été placée sous les différentes conditions expérimentales des 3 phases de l'expérience 1 : phase I : hydratation pendant 8 jours, phase II : privation totale d'eau de boisson pendant 19 jours consécutifs et phase III : réhydratation durant 2 jours. La température corporelle a été relevée en intramusculaire toutes les 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 29 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Le long de cette expérimentation un cycle de température ambiante a été instauré (38-46°C le jour et 20-25°C la nuit) afin d'induire un stress thermique. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits verticaux en pointillés, montrent les moments de changement des conditions expérimentales. Les lignes bleu et verte en pointillées représentent l'évolution de Tb_{max} et de Tb_{min} à partir du 7^{éme} jour de privation hydrique. Les lignes rouges indiquent la moyenne de Tb durant les 4 premiers (36.64±0.03°C) et les 4 derniers jours de la phase de déshydratation (37.12±0.04°C).

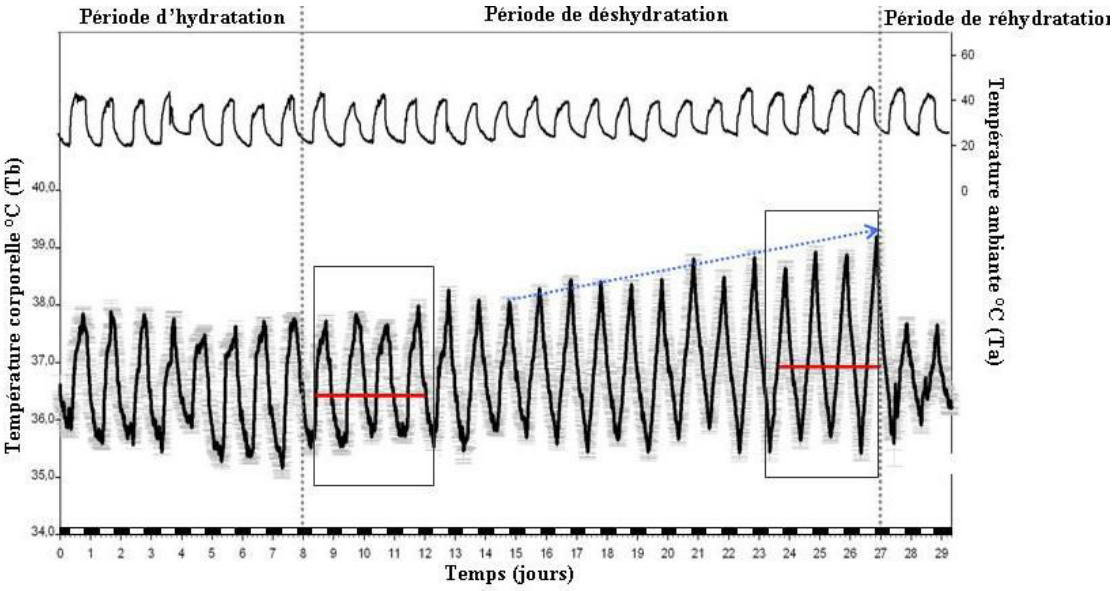

Figure 36 : Evolution du rythme moyen de la température corporelle des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1.

Les chamelles ont été placées sous les différentes conditions expérimentales des 3 phases de l'expérience 1 : phase I : hydratation pendant 8 jours, phase II : privation totale d'eau de boisson pendant 19 jours consécutifs et phase III : réhydratation durant 2 jours. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM). La température corporelle a été relevée en intramusculaire chaque 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 29 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Le long de cette expérimentation un cycle de température ambiante a été instauré (38-46°C le jour et 20-25°C la nuit) afin d'induire un stress thermique. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits verticaux en pointillés, montrent les moments de changement des conditions expérimentales. La flèche bleue indique l'augmentation progressive de l'amplitude du rythme de la Tb après 7 jours de privation hydrique. Les lignes rouges indiquent la moyenne de Tb durant les 4 premiers (36.39±0.04°C) et les 4 derniers jours de la phase de déshydratation (36.95±0.05°C).

Les écarts individuels du rythme journalier de la Tb calculés durant les 4 derniers jours successifs de la phase de déshydratation, se situent entre 3.0 et 4.47°C chez 5 chamelles sur 6 (**Figure 37**). En phase III, le rythme de la Tb a montré une réponse immédiate à la réhydratation, observée dès le premier jour (**Figure 36 et Figure 37**). En effet, l'amplitude a diminué pour passer de 3.8±0.25°C (dernier jour de déshydratation) à 1.78±0.13°C (Tb_{min}=35.90°C, Tb_{max}=37.68°C) lors du premier jour de réhydratation. Les résultats précédents démontrent clairement l'effet de la déshydratation sur l'amplitude du rythme de la Tb. En outre, nous avons également établi l'effet de la privation hydrique sur la phase du rythme de la Tb. En effet durant le dernier jour de la phase d'hydratation, le pic du rythme de Tb sous une photopériode artificielle (LD 12:12) et une Ta oscillant entre 38-46°C (à la fin de la phase lumineuse) et 20-25°C (à la fin de la phase obscure), apparait à 589 minutes (9h48min) après la transition obscurité-lumière chez la chamelle H (**Tableau 5**).

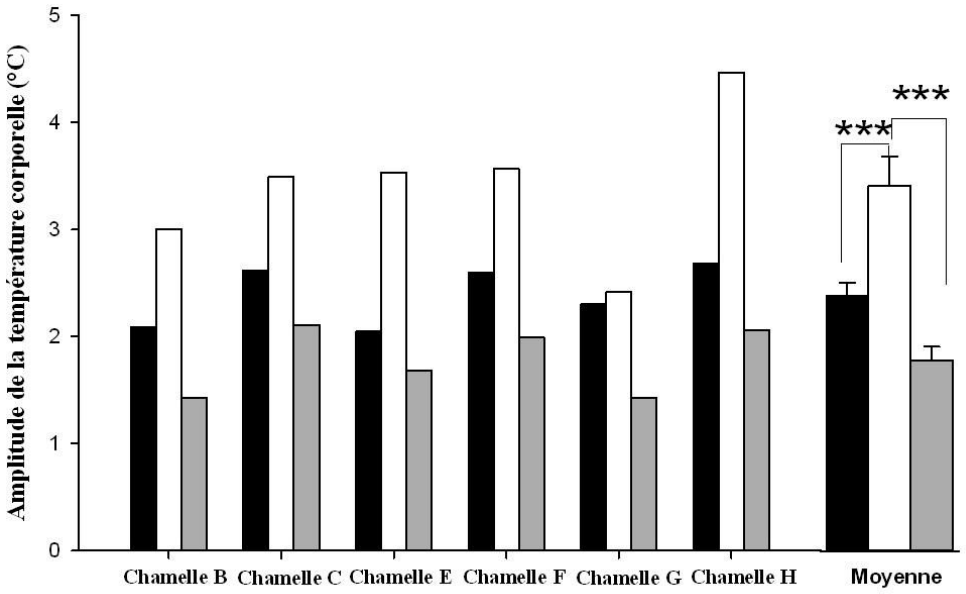

Figure 37 : Amplitude de la température corporelle des six chamelles et de leur moyenne placées sous les conditions de l'expérience 1.

Les amplitudes ont été calculées sur les données de la température corporelle des 4 derniers jours de la phase d'hydratation (barres noires), des 4 derniers jours de la phase de déshydratation (barres blanches) et du premier jour de la phase de réhydratation (barres grises). Les amplitudes moyennes sont représentées avec les barres d'erreurs (amplitude ±SEM).
*** p≤0.001

L'application pendant la phase II d'une restriction hydrique engendre un retard du pic qui apparait durant le dernier jour de la phase de déshydratation, chez la même chamelle à 779 minutes (12h58min) après la transition obscurité-lumière. Ce retard de phase est estimé à plus de 3 heures (**Tableau 5**). Ceci est cohérent avec les résultats obtenus chez les 5 autres chamelles (527.33 minutes ± 31.77 versus 775.67 ± 4.22) (**Tableau 5**). Ce retard de phase par rapport à la transition obscurité-lumière augmente progressivement durant la phase de

déshydratation (**Figure 38**). La régression était non liniéaire, le retard de phase observé résulte donc de la déshydratation et non pas du changement de cycle de la Ta au long de l'expérience (**Figure 38**).

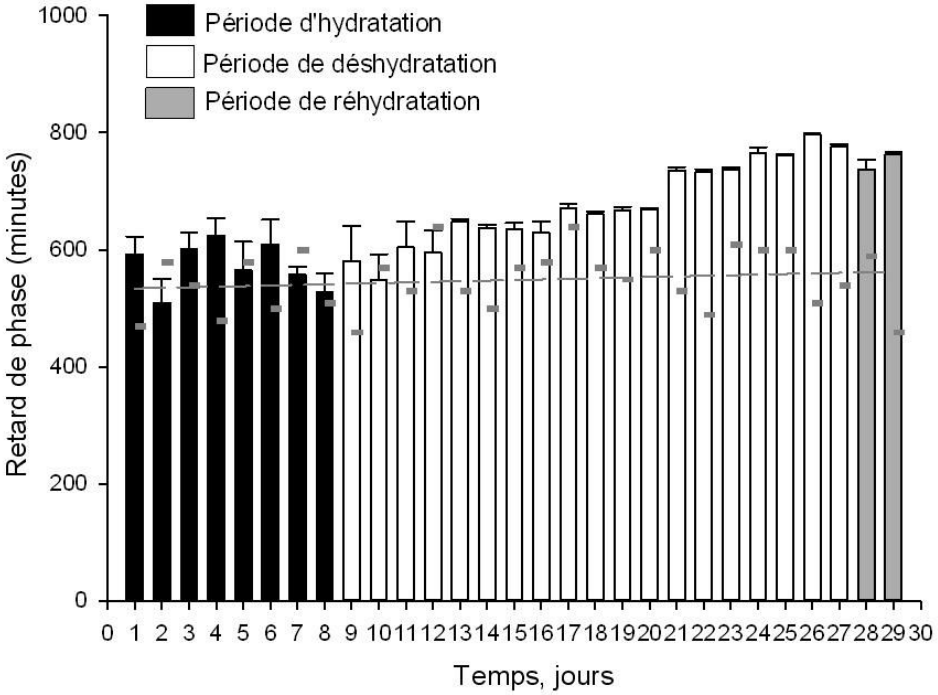

Figure 38 : Evolution du retard de phase du pic du rythme de la Tb par rapport au moment de transition obscurité-lumière au cours de l'expérience 1.

Les données ont été calculées sur les 29 jours de l'expérience 1 : durant les 8 jours de la phase d'hydratation (barres noires), durant les 19 jours de la phase de déshydratation (barres blanches) et durant les 2 jours de la phase de réhydratation (barres grises). Les petits traits en gris indiquent le moment du pic de la Ta. La ligne en trait indique la fonction de la régression non-linière utilisée pour la Ta.

L'analyse statistique des données par ANOVA à un facteur avec mesures répétées a révélé l'existence de différences statistiquement significatives pour l'amplitude moyenne du rythme de la Tb entre les trois phases de l'expérience 1 ($F_{(2,10)=}$ 41.391, p= 0.00001). Suivie par un test post hoc (HSD de Tukey), nous avons démontré que l'augmentation de l'amplitude du rythme de la Tb durant la phase de déshydratation est nettement significative par rapport à la phase d'hydratation et de réhydratation ($p<0.05$) (**Figure 37**). Au cours des 4 premiers jours de la phase de déshydratation, la Tb_{min} moyenne calculée sur nos six chamelles est de 35.52±0.15°C (**Figure 36**). Nous avons également trouvé la même valeur de Tb_{min} (35.52±0.16°C) durant les 4 derniers jours de cette phase (**Figure 39A**). En comparant la Tb_{max} enregistrée durant les 4 premiers jours de la phase de déshydratation *versus* les 4 derniers jours de cette même phase, nous concluons que l'accroissement de l'amplitude de la Tb observé à partir du 7éme jour de privation hydrique est une conséquence d'une augmentation de la Tb_{max} (**Figure 39B**) et non pas par une diminution de la Tb_{min}.

Tableau 5 : Retard de phase (en minutes) entre le moment de transition nuit-jour et le moment du maximum du Tb au cours de l'expérience 1

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21	Day 22	Day 23	Day 24	Day 25	Day 26	Day 27	Day 28	Day 29
Camel B	599	359	569	669	659	709	619	589	329	579	739	519	659	649	679	689	659	669	659	669	709	749	739	719	759	799	779	719	779
Camel C	459	489	619	569	629	639	529	549	599	619	589	639	649	639	629	549	659	659	679	669	739	739	739	779	769	799	779	669	759
Camel E	589	489	689	599	549	629	549	519	579	549	639	659	639	649	639	639	689	669	689	669	749	739	749	779	769	799	789	769	769
Camel F	619	599	629	589	599	639	559	539	599	589	619	649	629	619	629	629	649	649	669	669	739	719	719	769	749	799	759	739	749
Camel G	609	479	479	749	339	409	549	379	789	329	409	449	649	629	589	639	679	649	659	679	739	719	739	769	759	789	769	759	759
Camel H	679	639	619	569	619	629	539	589	589	619	629	659	659	639	639	629	689	669	649	659	739	729	739	779	759	799	779	769	759
Ta	16 :49 949	17 :39 1059	16 :59 1019	15 :59 959	17 :39 1059	16 :19 979	17 :59 1079	16 :29 989	15 :39 939	17 :29 1049	16 :49 1009	18 :39 1119	16 :49 1009	16 :19 979	17 :29 1049	17 :39 1059	18 :39 1119	17 :29 1049	17 :09 1029	17 :59 1079	16 :49 1009	16 :09 969	18 :09 1089	17 :59 1079	17 :59 1079	16 :29 989	16 :59 1019	17 :49 1069	15 :39 939
Mean	**592.33**	**509.00**	**600.67**	**624.00**	**565.67**	**609.00**	**557.33**	**527.33**	**580.67**	**547.33**	**604.00**	**595.67**	**647.33**	**637.33**	**634.00**	**629.00**	**670.67**	**660.67**	**667.33**	**669.00**	**735.67**	**732.33**	**737.33**	**765.67**	**760.67**	**797.33**	**775.67**	**737.33**	**762.33**
SEM	**29.63**	**40.50**	**28.92**	**29.18**	**47.73**	**41.87**	**13.02**	**31.77**	**59.86**	**44.98**	**44.18**	**36.58**	**4.77**	**4.77**	**11.76**	**18.44**	**7.03**	**4.01**	**6.01**	**2.58**	**5.58**	**4.94**	**4.01**	**9.55**	**3.07**	**1.67**	**4.22**	**15.79**	**4.22**
							09:17:18 ±0:13:01																			13:17:20 ±0:01:40			

NB : Le retard de phase (en minutes et en heures) entre le moment de la transition nuit-jour au 7^{éme} jour (phase d'hydratation) aussi qu'au 26^{éme} jour (phase de déshydratation) et le maximum de la Tb moyenne (±SEM) et est représenté dans les zones grises du tableau

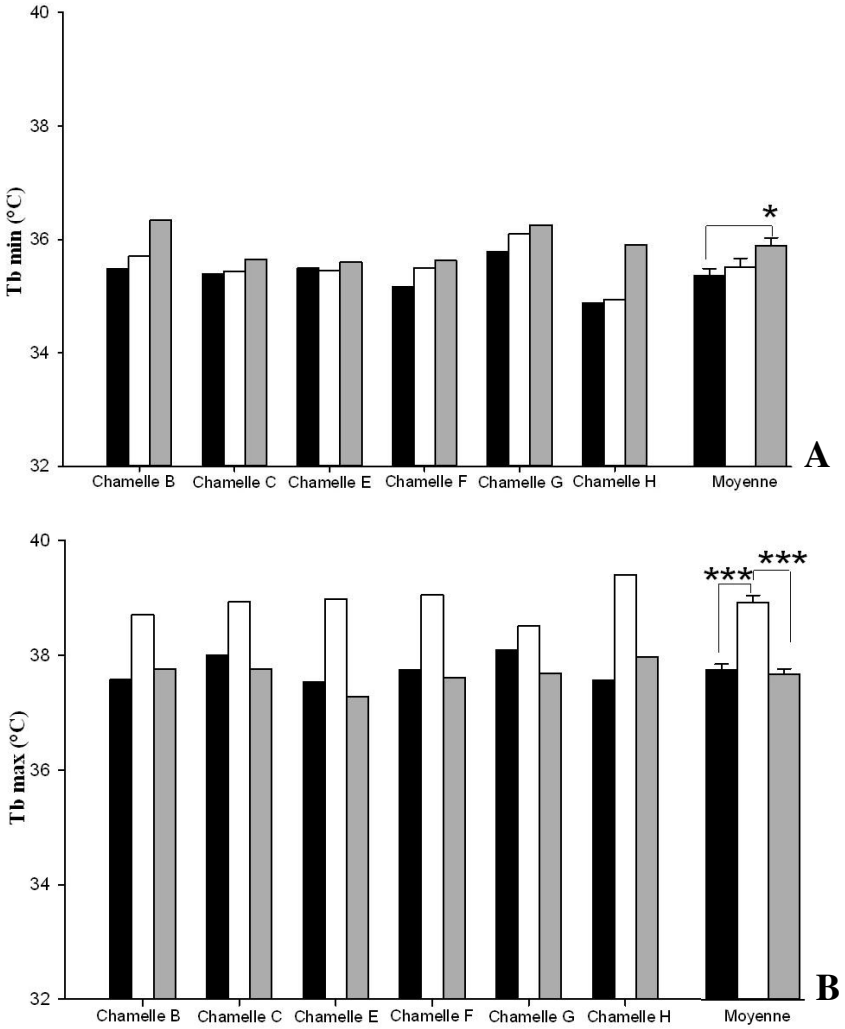

Figure 39 : Comparaison de la température corporelle minimale et maximale des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1.

A : La température corporelle minimale de chaque chamelle et la moyenne des Tb_{min} calculée sur les six chamelles. B : La température corporelle maximale de chaque chamelle et la moyenne des Tb_{max} calculée sur les mêmes chamelles. Les données ont été calculées sur les 4 derniers jours des phases d'hydratation (barres noires) et de déshydratation (barres en blancs) et le durant le premier jour de la phase de réhydratation (barres grises).
*** $p \leq 0.001$, *$0.01 < p \leq 0.05$

Pour déterminer l'effet de la Ta sur le système de thermorégulation chez le dromadaire, nous avons étudié l'évolution de la Tb en fonction de la Ta jour par jour pendant la phase d'hydratation, la phase de déshydratation et également pendant la phase de réhydratation chez chaque chamelle. Pour faciliter la présentation des résultats, nous avons choisi de montrer le rythme journalier de la Tb d'une chamelle représentative parmi les 6 animaux utilisés, en fonction de la Ta pendant **le dernier jour de la phase d'hydratation**, **le dernier jour de la phase de déshydratation** et **pendant le premier jour de la phase de réhydratation** (**Figure 40**). Les résultats de cette analyse confirme bien que pendant la phase d'hydratation la Tb du dromadaire varie très peu, l'amplitude du rythme de la Tb de la chamelle représentative (H)

pendant le dernier jour de la phase d'hydratation était de 2.6°C (**Figure 40A**). Toutefois, en période de pénurie hydrique cette variation entre la température corporelle matinale et celle de fin d'après-midi augmente progressivement avec le degré de déshydratation. Au 19^{éme} jour de privation hydrique, l'amplitude du rythme de la Tb de la chamelle représentative (H) a augmenté à 4.73°C (**Figure 40B**). Durant la phase de réhydratation, nous avons confirmé l'effet immédiat de la disponibilité de l'eau sur la réduction des variations journalières de la Tb. Pendant le premier jour de la phase de réhydratation, l'amplitude du rythme de la Tb de la chamelle représentative (H) était de 2.4°C (**Figure 40C**).

Des résultats similaires ont été observés chez nos six chamelles (**Figure 41**). Cette analyse approfondie du rythme de la Tb en fonction de la Ta nous a permis de révéler pour la première fois l'existence d'une hétérothermie journalière chez le dromadaire déshydraté, placé sous des hautes Ta. Tard la nuit et tôt le matin, le dromadaire baisse sa Tb en suivant passivement la Ta (la courbe de Tb est tangente à la pente de la ligne d'identité : la ligne d'identité correspond à la droite Tb= Ta sur une représentation Tb=f(Ta). Le dromadaire réagit donc comme un thermoconformateur anciennement appelé poïkilotherme. En baissant sa Tb tôt le matin, le dromadaire se donne un élan pour faire face au stress thermique de la longue journée qui l'attend. Durant la matinée, la Ta commence a augmenté progressivement, alors le dromadaire réagit en régulant sa Tb de telle sorte qu'elle reste stable probablement par une vasodilatation périphérique. L'animal agit donc comme un thermorégulateur connu aussi sous le terme d'homéotherme. Au cours de l'après-midi, la Ta continue a augmenté jusqu'à ce qu'elle atteint son paroxysme. Ainsi pour s'adapter à la chaleur intense et à la déshydratation, le dromadaire adopte des stratégies spécifiques résultantes de ses particularités anatomiques et physiologiques uniques afin de réduire les dépenses énergétiques et économiser les pertes hydriques. Parmi ces mécanismes de lutte, le dromadaire accumule passivement la chaleur à partir de son environnement immédiat durant toute l'après-midi. Par conséquent, sa Tb augmente jusqu'à ce qu'elle atteigne un maximum physiologique (≈ 42°C) enregistré au début du soir. Ainsi, le dromadaire adopte de nouveau un état de thermoconformateur (poïkilotherme). La nuit quand la Ta est faible, la chaleur corporelle stockée au cours de la journée va être dissipée d'une manière non-évaporative ce qui est en faveur de la diminution du métabolisme basal, et par conséquent la préservation de l'eau corporelle (Schmidt-Nielsen et *al.*, 1957). Par la suite et après avoir dissipé toute la chaleur stockée, le dromadaire régule sa Tb pour qu'elle demeure stable. Il réagit de nouveau comme un thermorégulateur (homéotherme). Nos résultats confirment bien l'existence de l'hétérothermie chez le dromadaire déshydraté et placé sous des Ta très élevées, et démontrent pour la première fois

chez cet animal la présence d'une hétérothermie sur une échelle de 24 heures. De plus, nos résultats affirment que le système de thermorégulation chez le dromadaire fluctue entre l'homéothermie et la poïkilothermie selon la disponibilité de l'eau. Dans la **Figure 40D**, nous démontrons que l'amplitude du rythme de la Tb chez le dromadaire est pratiquement la même durant les 4 derniers jours consécutifs de la phase de déshydratation. Ceci est aussi valable pour les moments de changement du statut thermorégulatreur.

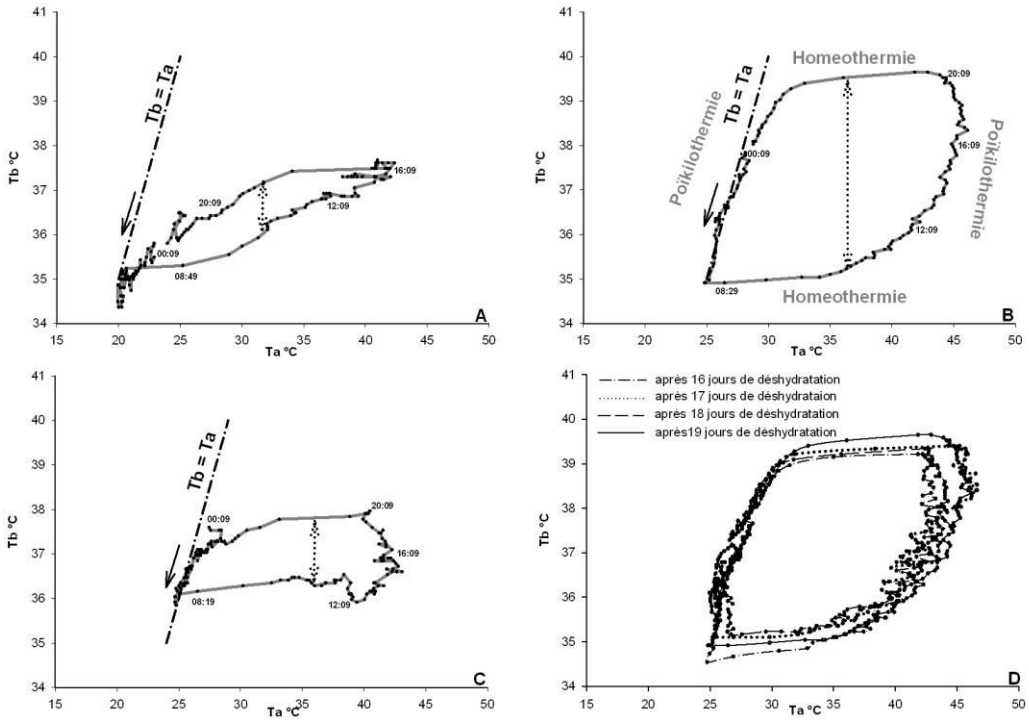

Figure 40 : Courbes de 24 heures de la température corporelle en fonction de la température ambiante d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience 1.

Rythme de la température corporelle de la chamelle H pendant le dernier jour de la phase d'hydratation (A), durant le dernier jour de la phase de déshydratation (B), durant le premier jour de la phase de réhydratation (C) et durant les 4 derniers jours consécutifs de la phase de déshydratation (D). La température a été relevée en intramusculaire toutes les 10 min par le capteur Ibutton®.La ligne en pointillé correspond à la pente de la ligne d'identité : Tb=f(Ta). Les flèches pointillées schématisent l'amplitude du rythme de la température corporelle. Le sens des flèches solides indique le cours du temps.

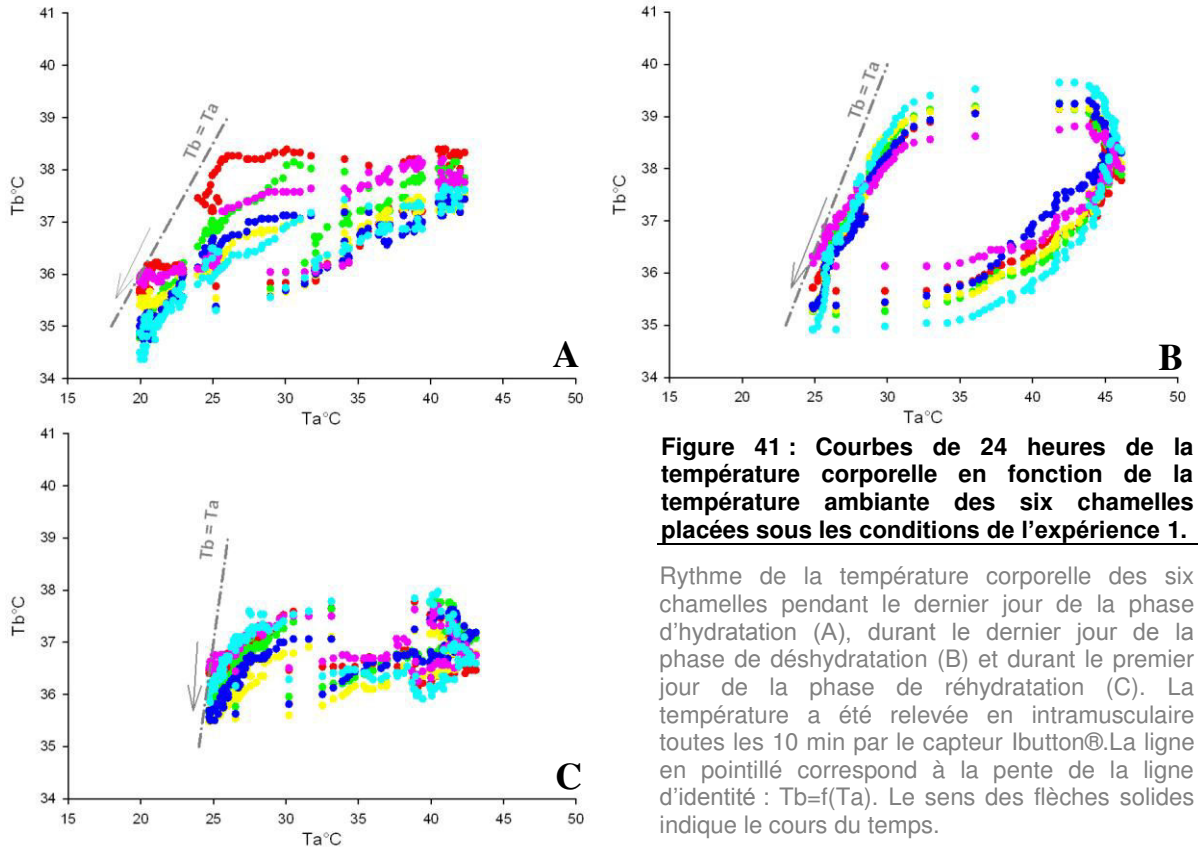

Figure 41 : Courbes de 24 heures de la température corporelle en fonction de la température ambiante des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1.

Rythme de la température corporelle des six chamelles pendant le dernier jour de la phase d'hydratation (A), durant le dernier jour de la phase de déshydratation (B) et durant le premier jour de la phase de réhydratation (C). La température a été relevée en intramusculaire toutes les 10 min par le capteur Ibutton®.La ligne en pointillé correspond à la pente de la ligne d'identité : Tb=f(Ta). Le sens des flèches solides indique le cours du temps.

1.3.2. Effets de la déshydratation et du stress thermique sur certains paramètres physiologiques chez le dromadaire

En plus de la température corporelle, nous avons suivi certains paramètres physiologiques chez le dromadaire. Premièrement, afin de contrôler le bon déroulement de l'expérience puisque dans cette étude les chamelles ont été exposées à des Ta élevées et privées d'eau de boisson durant 19 jours consécutifs. Deuxièmement, pour évaluer dans nos conditions expérimentales l'effet de la déshydratation et du stress thermique sur certains paramètres physiologiques que nous avons comparés avec des études ultérieures.

1.3.2.a. Poids corporel

Au début de l'expérience, les chamelles présentaient un poids corporel moyen de 395.0±22.5 Kg. Après 19 jours de privation totale d'eau sous les conditions préalablement citées de cette expérience, les chamelles avaient un poids corporel moyen de 319.9±17.8 Kg avec une perte moyenne de poids corporel de 23.43% (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Pourcentage de perte de poids corporel de chaque chamelle après 19 jours de privation hydrique durant l'expérience1

Chamelles	% de perte de poids corporel
Chamelle B	22.87
Chamelle C	19.94
Chamelle E	25.1
Chamelle F	22.3
Chamelle G	22.3
Chamelle H	28.0
Moyenne	23.43

Une récupération partielle du poids corporel initial a été notée dès le premier jour de réhydratation, ainsi le poids corporel moyen des six chamelles était de 365.35±18.83 Kg. Une semaine a été nécessaire pour retourner au poids corporel initial. Le traitement des données par ANOVA à un facteur avec mesures répétées a montré l'existence d'une différence significative dans les valeurs moyennes du poids corporel entre les 3 phases de l'expérience 1 ($F_{(2,10)=}$ 150.666, p= 0.000000). La comparaison des poids corporels moyens en utilisant le test post hoc de Tukey, durant la phase d'hydratation et la phase de déshydratation et pendant la phase de réhydratation a montré qu'il y a une diminution significative du poids corporel des chamelles ($p<0.05$) suite à la privation hydrique (**Figure 42, 43**).

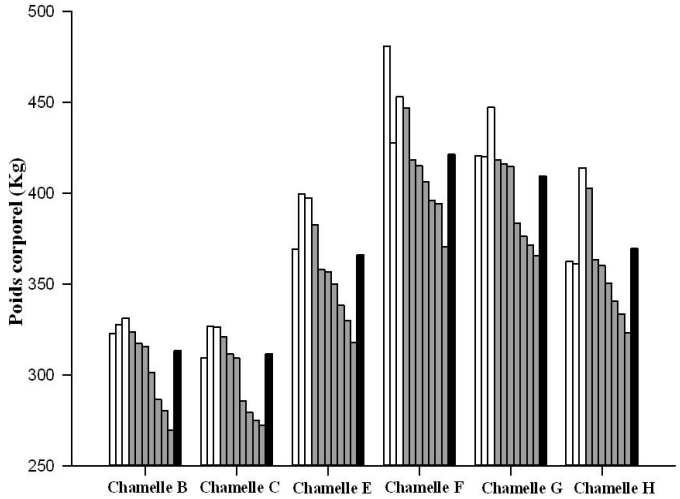

Figure 42 : Evolution du poids corporel des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 1.

Poids corporel de chaque chamelle durant les 3 phases de l'expérience 1 : jour 1, jour 5 et jour 8 durant la phase d'hydratation (les barres en blanc), jour 3, jour 6, jour 9, jour 12, jour 15, jour 18 et jour 1 (premier jour de réhydratation : dernière pesée juste avant la réhydratation) correspondent à des pesées sous restriction hydrique (barres en gris) et jour 2 correspond à une pesée 24-h après réhydratation (barres en noir).

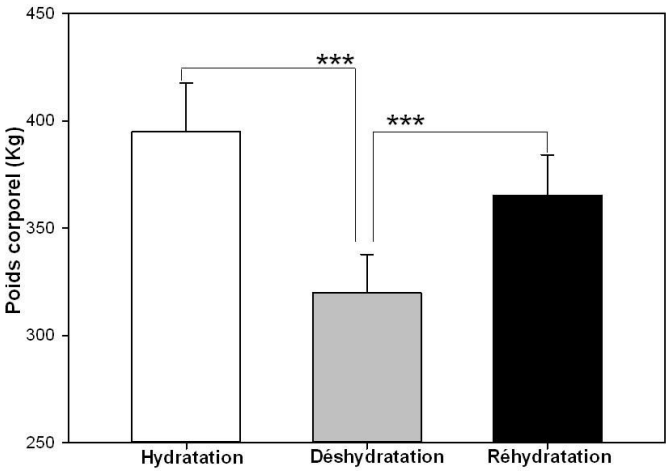

Figure 43 : Effet de la déshydratation sur le poids corporels des chamelles durant l'expérience 1.

Moyenne des poids corporel des six chamelles utilisées dans l'expérience 1 : après 8 jours d'hydratation (barre blanche) et après 19 jours de privation hydrique (barre grise) et après un jour de réhydratation (barre en noire). Les moyennes sont représentées avec les barres d'erreurs (moyennes ± SEM).
*** p≤0.001

1.3.2.b. Taux des protéines totales plasmatiques

Pendant la phase d'hydratation, le taux des PT varie très peu. En effet durant la dite phase, la protéinémie moyenne mesurée chez les six chamelles placées sous les conditions préalablement décrites de l'expérience 1 oscillait entre 6.9±0.2 g/100 ml (notée au premier jour de la phase d'hydratation) et 7.2±0.1 g/100 ml (mesurée au 8^{éme} jour de la phase d'hydratation). Toutefois, durant la phase de déshydratation, le taux plasmatique des PT augmente progressivement. Après 12 jours de privation hydrique, nous avons observé que la protéinémie a grimpé à une valeur maximale de 8.3±0.2 g/100 ml ce qui témoigne d'une augmentation statistiquement significative (ANOVA, $F_{(12,60)=}$ 51.088, p= 0.00000). La protéinémie s'est stabilisé à cette valeur jusqu'à la fin de la phase de déshydratation. Quinze minutes après la réhydratation, le taux plasmatique des PT a atteint 8.9 ± 0.2 g/100 ml (c'est la valeur la plus élevée, notée tout au long de l'expérience 1) (**Figure 44**). Nos résultats montrent bien que la protéinémie des chamelles n'a baissé qu'après deux heures d'accès libre à l'eau de boisson. Le processus de régulation durant la phase de réhydratation semble avoir besoin de beaucoup plus de temps pour réduire les effets de la déshydratation sur la protéinémie. Le taux plasmatique des PT a continué à diminuer jusqu'au deuxième jour de la phase de réhydratation, mais sans atteindre les valeurs initiales rapportées durant la phase d'hydratation. Le système de régulation nécessite probablement plus de temps pour réguler la protéinémie en phase de réhydratation et ainsi retourner aux valeurs basales, observées en début de l'expérience.

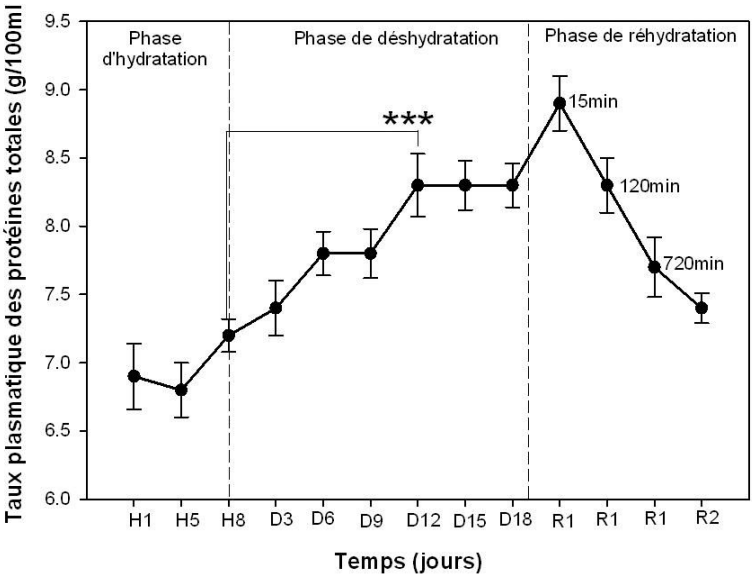

Figure 44 : Effet de la déshydratation sur le taux plasmatique des protéines totales des chamelles durant l'expérience 1.

Evolution de la moyenne des protéines totales durant les trois phases de l'expérience 1 : phase d'hydratation (H1, H5 et H8), phase de déshydratation (D3, D6, D9, D12, D15 et D18) et phase de réhydratation (après 15 minutes, après 120 minutes, après 720 minutes et au R2 « 2éme jour de la réhydratation »). Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM).
*** $p \leq 0.001$

1.3.2.c. Taux d'hémoglobine

La valeur moyenne d'Hb varie en fonction de l'état d'hydratation des chamelles. En effet, pendant la phase de déshydratation, nous avons noté une augmentation progressive des taux d'Hb. Au début de l'expérience 1, les chamelles avaient un taux moyen d'Hb de 10.3±0.3 g/dL. Après avoir subi 18 jours de privation hydrique, sous les conditions précitées de l'expérience 1, les chamelles se retrouvaient avec un taux moyen d'Hb de 16.09±0.2 g/dL. La comparaison des moyennes avant et après déshydratation a montré qu'il y a une augmentation statistiquement significative (ANOVA, $F_{(12,60)=}$ 8.2076, p= 0.00000) suite à la déshydratation. En phase de réhydratation, le taux d'Hb a baissé mais la diminution ne fut pas immédiate. En effet, quinze minutes après réhydratation le taux moyen d'Hb était encore très élevé (16.6±0.2 g/dL) alors que deux heures plus tard, il a baissé à 14.10±0.2 g/dL. Les valeurs initiales d'Hb n'ont été retrouvées qu'après douze heures de réhydratation (**Figure 45**). En comparant l'évolution du taux d'Hb avec le taux des PT durant la phase de réhydratation, nous avons constaté que le temps de récupération est plus court pour le taux des PT que pour le taux d'Hb.

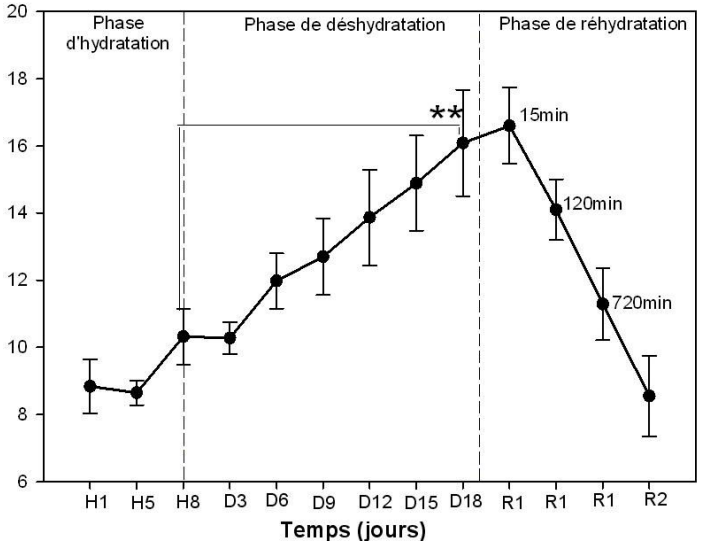

Figure 45 : Effet de la déshydratation sur le taux d'hémoglobine des chamelles durant l'expérience 1.

Evolution de la moyenne des taux d'hémoglobine durant les trois phases de l'expérience 1 : phase d'hydratation (H1, H5 et H8), phase de déshydratation (D3, D6, D9, D12, D15 et D18) et phase de réhydratation (après 15 minutes, après 120 minutes, après 720 minutes et au R2 « 2^{éme} jour de la réhydratation »). Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM).
** 0.001<p≤0.01

1.3.2.d. Taux d'hématocrite

L'évolution des taux d'Ht durant les trois phases de l'expérience 1 indique la présence de variations individuelles très importantes (**Tableau 7**). Le suivi de ce paramètre chez chaque chamelle tout au long de cette expérience montre que les conditions de déshydratation dans cette étude n'ont pas influencé le taux d'Ht. Ceci a été également noté sur les valeurs moyennes d'Ht (**Figure 46**). Un résultat similaire a été obtenu chez les mêmes chamelles lors d'une étude préalable (Kamili et *al*., 2013).

Tableau 7 : Suivi des taux d'hématocrite de chaque chamelle durant les trois phases de l'expérience 1

Animaux	Phase d'hydratation			Phase de déshydratation						Phase de réhydratation			
	J1	J5	J8	J3	J6	J9	J12	J15	J18	J1			J2
										15 min	120 min	720 min	
Chamelle B	25%	32%	26%	25%	28%	23%	23%	23%	26%	28%	22%	24%	18%
Chamelle C	27%	29%	21%	22%	23%	34%	34%	22%	31%	24%	21%	25%	21%
Chamelle E	25%	35%	27%	26%	28%	26%	26%	28%	31%	27%	27%	28%	23%
Chamelle F	25%	37%	24%	22%	25%	23%	23%	22%	24%	28%	22%	24%	23%
Chamelle G	29%	36%	39%	38%	27%	28%	28%	26%	29%	29%	28%	28%	27%
Chamelle H	26%	30%	30%	20%	24%	20%	20%	22%	22%	28%	22%	22%	21%

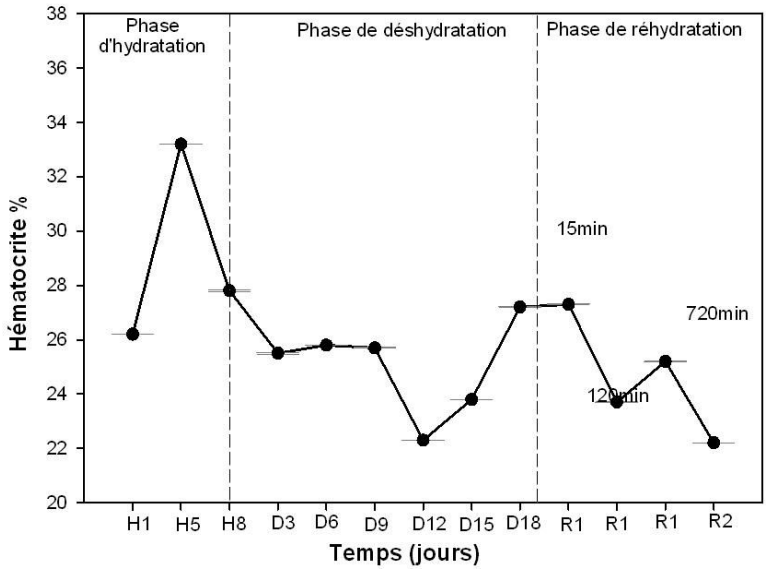

Figure 46 : Effet de la déshydratation sur le taux d'hématocrite des chamelles durant l'expérime 1.

Evolution de la moyenne des taux d'hématocrite durant les trois phases de l'expérience 1 : phase d'hydratation (H1, H5 et H8), phase de déshydratation (D3, D6, D9, D12, D15 et D18) et phase de réhydratation (après 15 minutes, après 120 minutes, après 720 minutes et au R2 « 2^{éme} jour de la réhydratation »). Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM).

1.3.2.c. Prise alimentaire

Durant la phase d'hydratation, les animaux consommaient la totalité de la ration alimentaire distribuée (2 Kg d'aliments concentrés et 3 Kg de paille). Cette prise est restée invariable jusqu'à l'apparition des premiers effets de la déshydratation. En effet, la privation d'eau a entrainé une diminution notable de la prise de l'aliment concentré chez les six chamelles et ce, après huit jours de privation hydrique (**Figure 47**). Cette diminution est devenue encore plus importante entre le 12^{éme} jour de la phase de déshydratation jusqu'à la fin de cette phase (19^{éme} jour de déshydratation). Une fois les animaux réhydratés (phase III), nous avons observé que la prise alimentaire a été au même niveau que durant la phase d'hydratation (phase I). De même, la prise de la paille fut stable et sans refus notée pendant la phase d'hydratation mais elle a été également affectée par la restriction hydrique. Toutefois, la chute de la consommation de la paille a été notée précocement par rapport à la prise de l'aliment concentré. En effet, la chute de la prise de la paille a été observée au 2^{éme} jour de la phase de déshydratation (**Figure 47**). De la même façon, la réhydratation a permis aux animaux de reprendre la consommation de la paille telle que nous avons observé durant la phase d'hydratation.

En quantifiant la quantité de l'aliment concentré et de la paille qui restait dans les mangeoires pendant la phase de déshydratation, nous avons trouvé que la diminution de la prise de la paille était beaucoup plus importante que celle de l'aliment composé, cette chute a été de 76.6% pour la paille et seulement de 35% pour l'aliment concentré. Nous avons ainsi noté que la réduction de la prise de la paille durant la phase de déshydratation est beaucoup plus homogène que celle de l'aliment composé. Ceci peut être confirmé par la stabilité de la courbe de la prise de la paille entre le 9^{éme} et le 19^{éme} jour de la phase II et par les faibles barres d'erreurs (**Figure 47**). Avec la réhydratation (phase III), la reprise immédiate de la consommation de la totalité de la ration alimentaire distribuée (2Kg d'aliment concentré et 3Kg de paille) était observée dès le premier jour de la phase III.

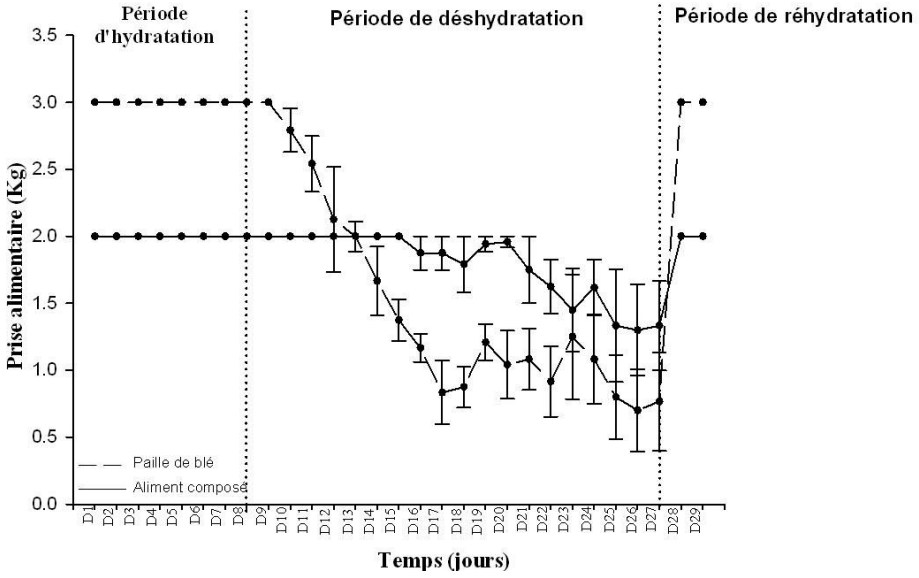

Figure 47 : Evolution de la prise alimentaire des six chamelles durant l'expérience 1.

Prise alimentaire de l'aliment concentré (ligne continue) et de la paille (igne discontinue) durant la phase d'hydratation, phase de déshydratation et phase de réhydratation. Chaque point des courbes correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM)

2. Effet de la diminution progressive de l'alimentation sur le rythme de la température corporelle chez le dromadaire (expérience 2)

Dans notre protocole expérimental, nous avons confirmé l'existence de l'hétérothermie chez le dromadaire déshydraté sujet à un stress thermique. Nous avons ainsi pu démontrer, pour la première fois chez cet animal, la présence d'une hétérothermie sur 24 heures. Les résultats obtenus montrent que les chamelles privées d'eau de boisson et placées sous des hautes températures ambiantes réduisent aussi leur prise de nourriture (après 19 jours de restriction hydrique, une chute de 76.6% de prise de paille et une chute de 35% de la prise de l'aliment concentré a été notée) (**Figure 47**). Nous avons donc programmé l'expérience 2

pour vérifier si dans les mêmes conditions expérimentales, la diminution de la prise de nourriture comme observée dans l'expérience 1, est capable à elle seule (chamelles normalement hydratées) d'induire un état d'hétérothermie chez le dromadaire. L'expérience 2 s'est déroulée dans pratiquement les mêmes conditions expérimentales précitées dans l'expérience 1 sauf pour l'abreuvement. Les chamelles avaient un accès libre à l'eau tout au long de l'expérience 2. La ration alimentaire journalière a été distribuée de telle sorte de reproduire exactement la prise alimentaire notée durant l'expérience 1 (**Figure 47**).

2.1. Procédure expérimentale

2.1.1. Animaux

Cette expérience a été réalisée sur le même groupe d'animaux utilisé durant l'expérience 1, constitué des six chamelles de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat Maroc.

2.1.2. Protocol expérimental

Les relevés de la température corporelle ont été réalisés en utilisant les mêmes capteurs électroniques type Ibutton® décrits auparavant. L'expérience 2 s'est déroulée en respectant les mêmes conditions de température ambiante et de photopériode adoptées durant l'expérience 1. En revanche le long de cette expérience, les animaux avaient un accès libre à l'eau renouvelée quotidiennement une fois le matin (09h00) et une fois le soir (17h00). Afin de démontrer l'effet de la diminution progressive de l'alimentation sur le rythme de la température corporelle, les chamelles recevaient une ration alimentaire de même composition, distribuée une fois par jour et au même moment comme dans l'expérience 1. La quantité journalière de la ration alimentaire distribuée pour chaque chamelle correspond exactement à la quantité ingérée par la même chamelle au jour équivalant durant l'expérience 1.Donc, cette expérience a été également réalisée sur une durée de 29 jours selon 3 phases successives : phase I de contrôle (8 jours), suivi immédiatement d'une phase II de diminution progressive d'alimentation (19 jours) et en fin, une phase III de réalimentation (2 jours).

2.2. Analyses statistiques

Les données de l'expérience 2 ont été traitées en utilisant les mêmes moyens et tests statistiques appliqués sur les données de l'expérience 1 « voir 1.2. Analyses statistiques ».

2.3. Résultats

2.3.1. Rythme de la température corporelle

L'enregistrement continu du rythme de la température corporelle en fonction du temps, durant les 3 phases expérimentales du protocole est montré chez la chamelle représentative (H) (**Figure 48**) aussi sous forme de la moyenne des six chamelles (**Figure 49**). Les résultats démontrent l'existence d'un rythme journalier et régulier de la température corporelle sous les conditions expérimentales de la phase I, II et III. La diminution progressive de l'alimentation n'affecte pas la rythmicité de la température corporelle.

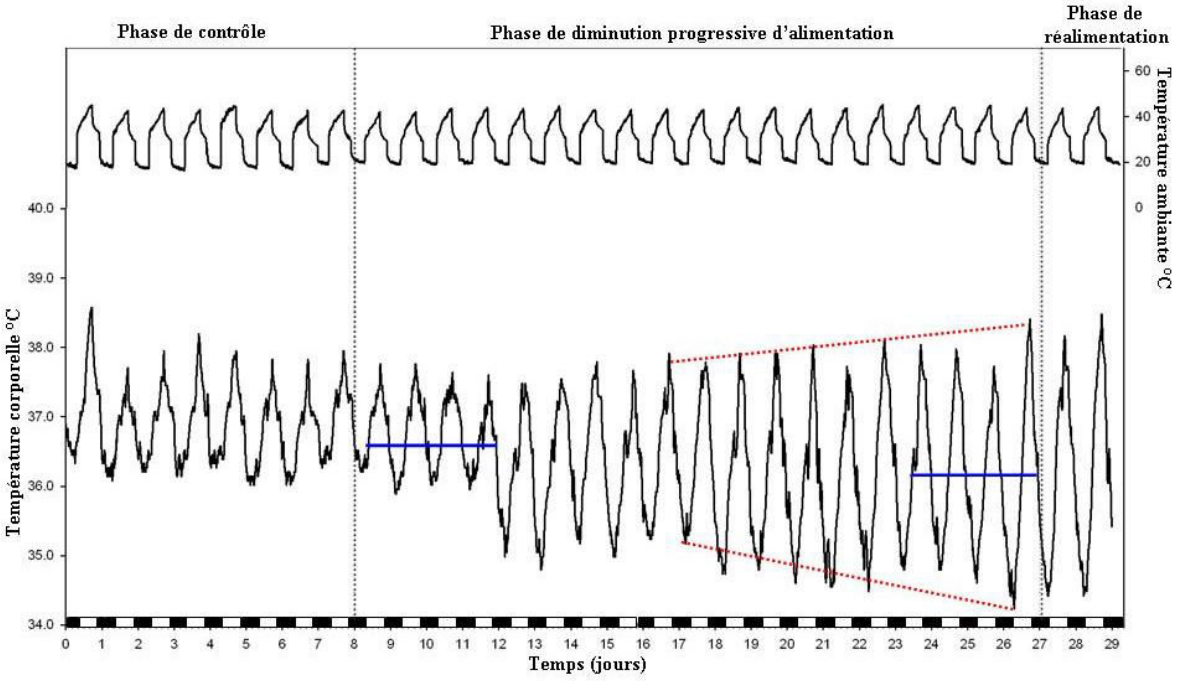

Figure 48 : Evolution du rythme de la température corporelle d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience 2.

La chamelle H a été placée sous les différentes conditions de l'expérience 2, soit phase I : phase de contrôle pendant 8 jours, phase II : diminution progressive de l'alimentation pendant 19 jours consécutifs et phase III : réalimentation durant 2 jours. La température a été relevée en intramusculaire toutes les 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 29 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Tout au long de cette expérience un cycle de température ambiante a été instauré (38-46°C le jour et 20-25°C la nuit) afin d'induire un stress thermique. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits verticaux en pointillés montrent les moments de changement de conditions expérimentales. Les lignes rouges en pointillées représentent l'évolution de Tb_{max} et de Tb_{min}. Les lignes bleues indiquent la moyenne de Tb durant les premiers (36.74±0.02°C) et les derniers 4 jours de la phase de diminution progressive de de l'alimentation (36.16±0.04°C).

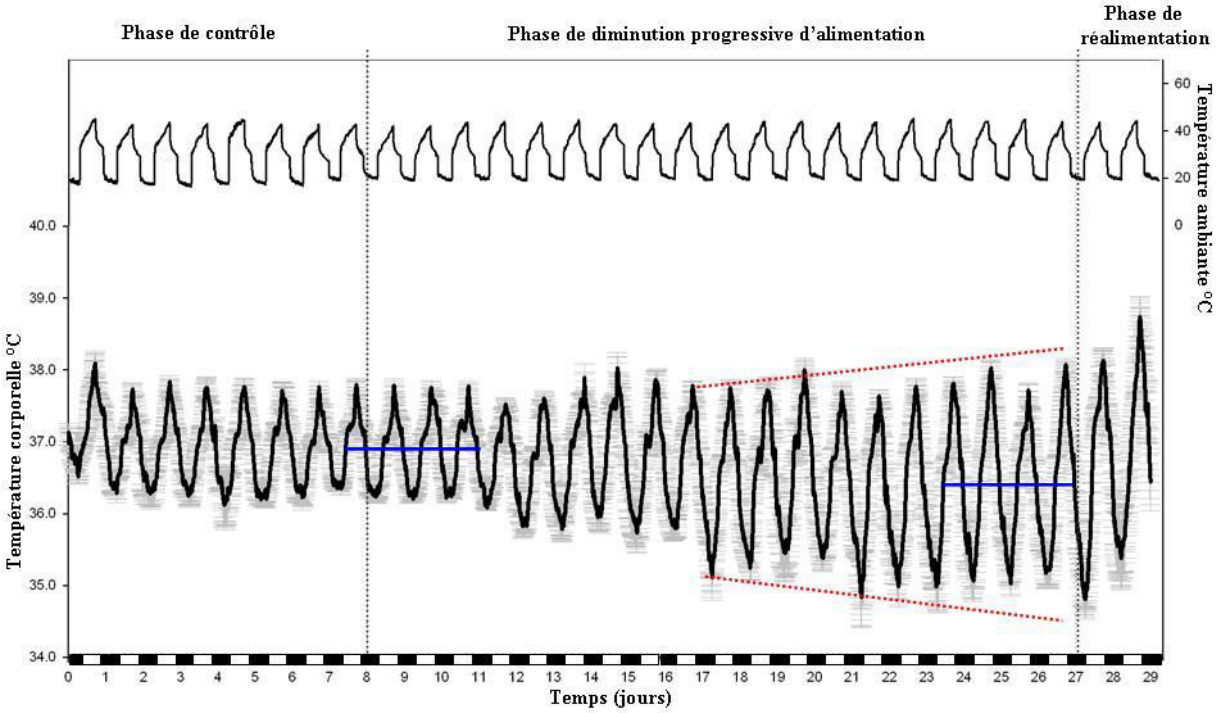

Figure 49 : Evolution du rythme de la température corporelle des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2.

Les chamelles ont été placées sous les différentes conditions de l'expérience 2, soit phase I : phase de contrôle pendant 8 jours, phase II : diminution progressive de l'alimentation pendant 19 jours consécutifs et phase III : réalimentation durant 2 jours. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM). La température a été relevée en intramusculaire toutes les 10 minutes par le capteur Ibutton® et pendant 29 jours consécutifs. La température ambiante a été relevée également suivant le même intervalle et représentée au niveau de la courbe supérieure. Tout au long de cette expérience un cycle de température ambiante a été instauré (38-46°C le jour et 20-25°C la nuit) afin d'induire un stress thermique. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité. Les traits verticaux en pointillés montrent les moments de changement de conditions expérimentales. Les lignes rouges en pointillées représentent l'évolution de Tb_{max} et de Tb_{min}. Les lignes bleues indiquent la moyenne de Tb durant les premiers (36.85±0.02°C) et les derniers 4 jours de la phase de diminution progressive d'alimentation (36.40±0.04°C).

Durant les 4 derniers jours de la phase I, le rythme de la température corporelle montre une moyenne de 36.87±0.02°C. Cette valeur a connu une légère baisse durant la phase II, avec une moyenne de 36.40±0.04°C calculée sur les 4 derniers jours de cette phase. Durant la phase III (mêmes conditions expérimentales que dans la phase I), le rythme de la température corporelle est conservé avec respectivement une moyenne de 36.53±0.09°C au premier jour et de 36.85±0.09 au deuxième jour. Chez le dromadaire parfaitement hydraté et placé sous des hautes Ta, la relation entre l'hétérothermie et la diminution progressive de l'alimentation a été investiguée pour la première fois via notre expérience 2. Au cours des 4 premiers jours de la phase de diminution progressive de l'alimentation, la Tb_{max} moyenne calculées sur nos six chamelles est de 37.77±0.07°C. Celle calculée durant les 4 derniers jours de cette phase en est proche (37.93±0.06°C) (**Figure 50A**). La Tb_{min} moyenne était de 36.08±0.04°C durant les 4 premiers jours de la phase de diminution progressive de l'alimentation. Elle a diminué à 34.97±0.24°C (**Figure 50B**) durant les 4 derniers jours de cette phase. Nous avons également

étudié chez la chamelle représentative (H) l'évolution du rythme de la Tb en fonction de la Ta jour par jour durant les 3 phases de l'expérience 2.

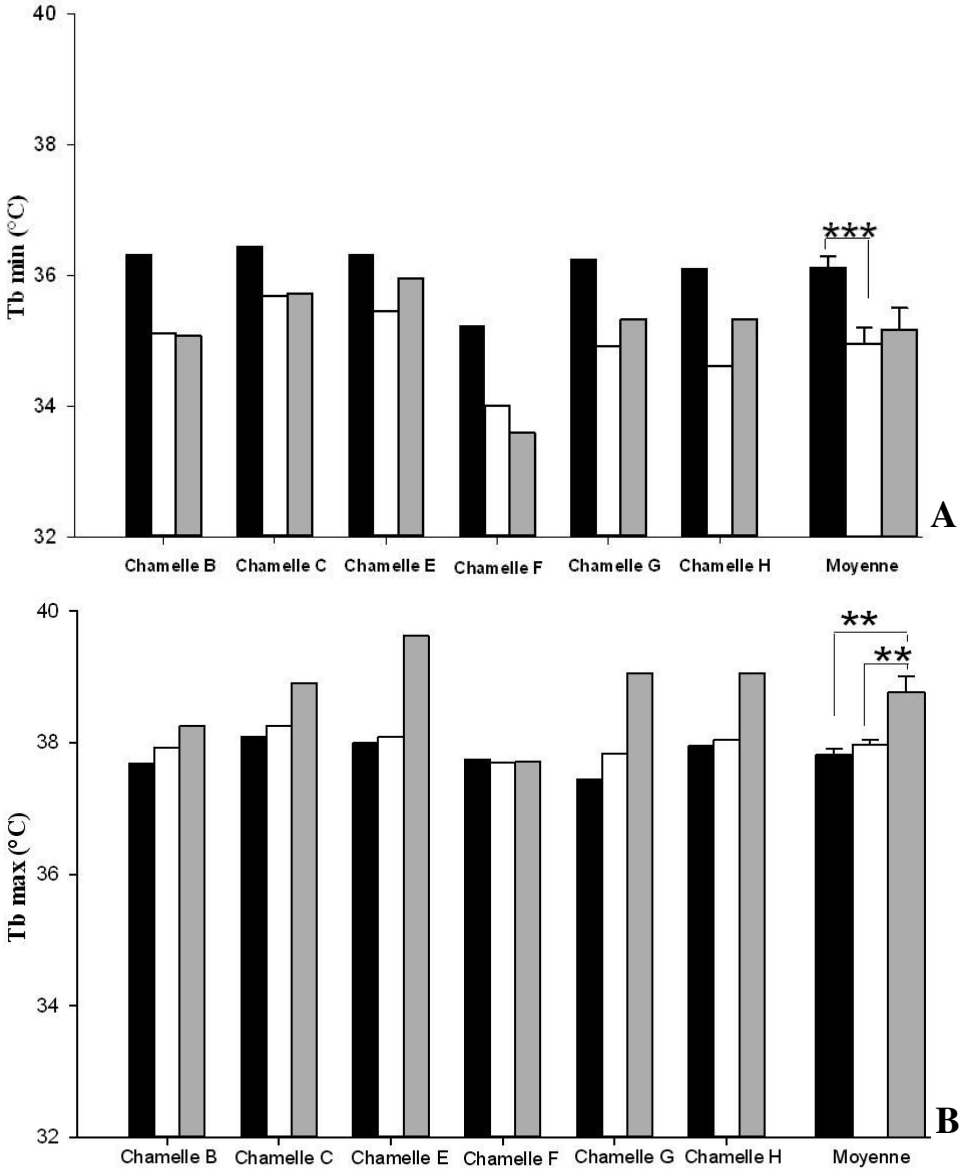

Figure 50 : Comparaison de la température corporelle maximale et minimale des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2.

A : La température corporelle maximale de chaque chamelle et la moyenne des Tb_{min} calculée sur les six chamelles. B : La température corporelle minimale de chaque chamelle et la moyenne des Tb_{max} calculée sur les mêmes chamelles. Les données ont été calculées sur les 4 derniers jours des phases de contrôle (barres noires) et de diminution progressive de l'alimentation (barres en blancs) et le durant le premier jour de la phase de réalimentation (barres grises).
** $0.01 < p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.001$

L'analyse du rythme de la Tb en fonction de la Ta (**Figure 51**) a permis de révéler, pour la première fois, que le système de thermorégulation chez le dromadaire est doté d'une plasticité complexe et journalière, caractérisée par une alternance quotidienne de phase homéothermie et de phase poïkilothermie chez le dromadaire sujet à une diminution progressive de l'alimentation et placé sous des hautes Ta.

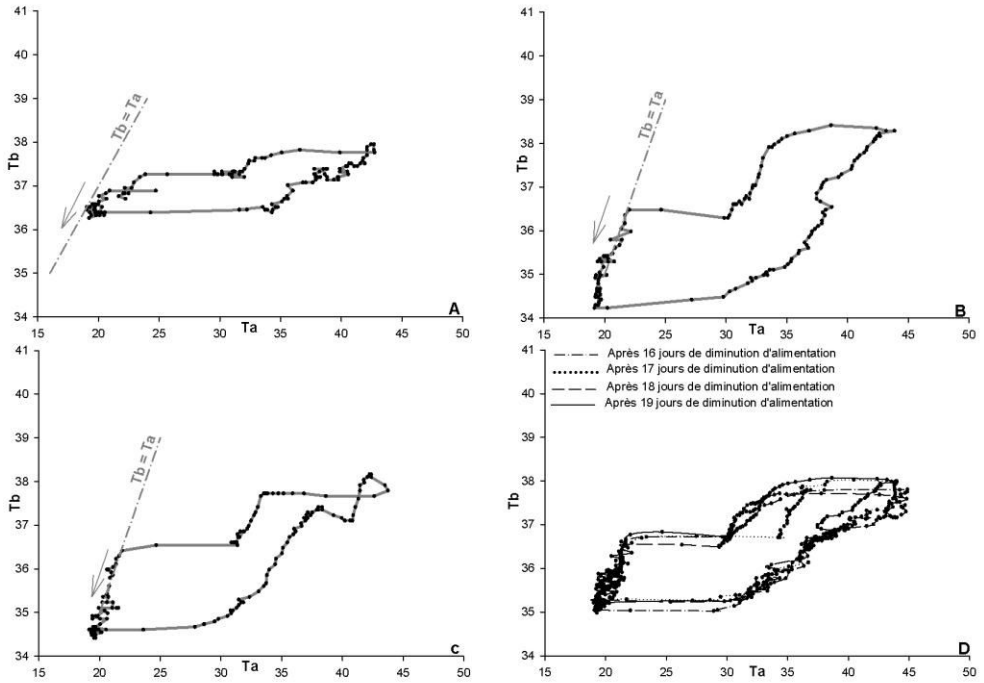

Figure 51 : Courbes de 24 heures de la température corporelle en fonction de la température ambiante d'une chamelle représentative placée sous les conditions de l'expérience 2.

Rythme de la température corporelle de la chamelle H pendant le dernier jour de la phase de contrôle (A), durant le dernier jour de la phase de diminution progressive de l'alimentation (B) et durant le premier jour de la phase de réalimentation (C) et durant les 4 derniers jours consécutifs de la phase de diminution progressive d'alimentation (D). La température a été relevée en intramusculaire toutes les 10 min par le capteur Ibutton®.La ligne en pointillé correspond à la pente de la ligne d'identité : Tb=f(Ta). Le sens des flèches indique le cours du temps.

En combinant les résultats de l'expérience 1 et 2, nous avons comparé la moyenne du rythme de la température corporelle des six chamelles : durant les 4 derniers jours des phases d'hydratation et de déshydratation versus les 4 derniers jours des phases de contrôle et de diminution progressive de l'alimentation et durant le premier jour de la phase réhydratation versus le premier jour de la phase de réalimentation (**Figure 52**). Une analyse ANOVA à un seul facteur et à mesures répétées a été effectuée pour vérifier la variation du rythme de Tb entre les trois phases expérimentales dans l'expérience 1 et dans l'expérience 2. Sur la base de cette analyse statistique, nous avons trouvé que la moyenne du rythme de Tb présente une différence statistiquement significative entre les 3 phases de l'expérience1 ($F_{(2,10)=}$ 14.5, p= 0.00110) aussi qu'entre les 3 phases de l'expérience 2 ($F_{(2,10)=}$ 8.588, p= 0.00675). Le test post hoc (HSD de Tukey) a montré que l'augmentation de la moyenne du rythme de Tb durant la phase de déshydratation est significative ($p<0.05$) par rapport à la moyenne de ce rythme calculée au cours de la phase d'hydratation et de réhydratation. Toutefois, ce même test post hoc a révélé que la diminution de la moyenne du rythme de Tb durant la phase de diminution progressive de l'alimentation est significative ($p<0.05$) uniquement par rapport à la phase de contrôle durant l'expérience 2.

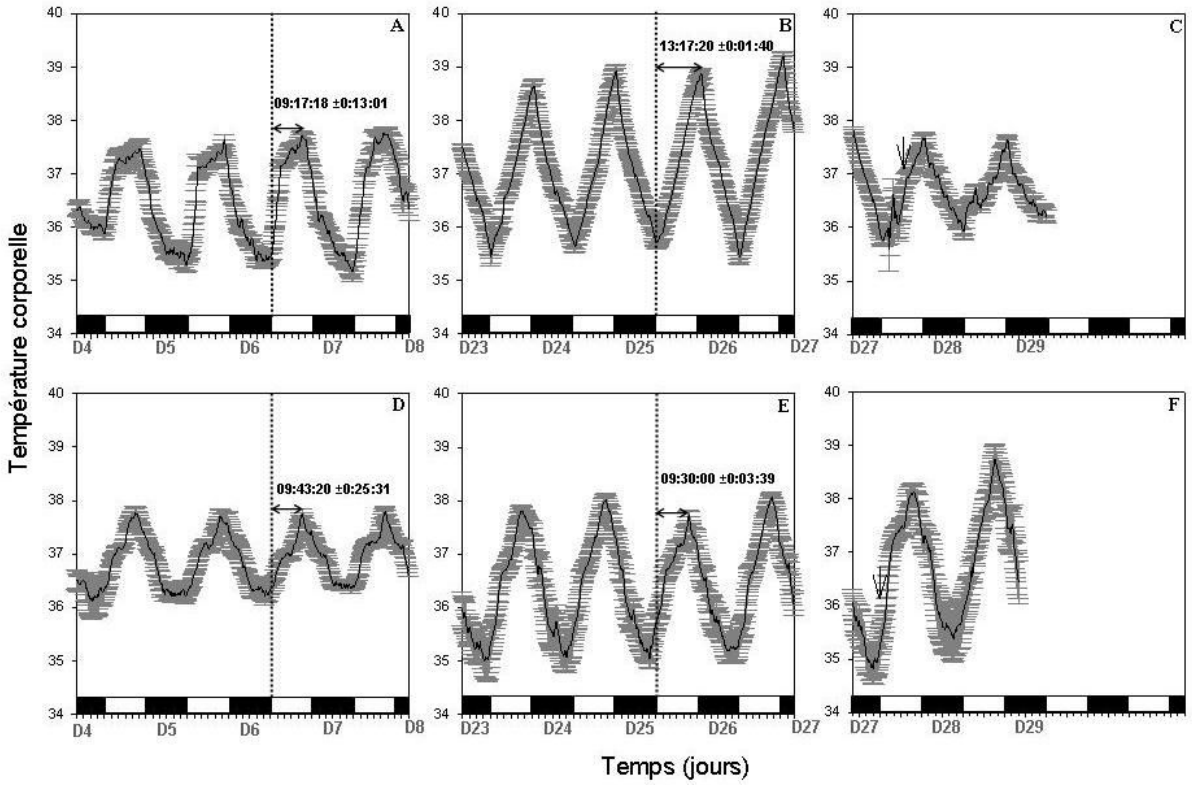

Figure 52 : Comparaison des rythmes de températures corporelles moyennes des six chamelles, enregistrés durant l'expérience 1 et 2.

Les chamelles ont été placées sous les conditions de l'expérience 1 et par la suite sous les conditions de l'expérience 2 : **A** : rythme moyen de la température corporelle durant les 4 derniers jours de la phase d'hydratation. **B** : rythme moyen de la température corporelle durant les 4 derniers jours de la phase de déshydratation. **C** : rythme moyen de la température corporelle durant les 2 jours de la phase de réhydratation. **D** : rythme moyen de la température corporelle durant les 4 derniers jours de la phase de contrôle. **E** : rythme moyen de la température corporelle durant les 4 derniers jours de la phase de diminution progressive de l'alimentation. **F** : rythme moyen de la température corporelle durant les 2 jours de la phase de réalimentation. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne des six chamelles (moyenne ± SEM). La température a été relevée en intramusculaire toutes les 10 minutes. Les traits discontinus indiquent le temps du passage obscurité-lumière (08h00) pour le jour 7 et 26 dans les deux expériences 1 et 2. Les flèches horizontales montrent la relation de phase entre le moment du maximum de la Tb et le moment de transition de la lumière à l'obscurité. Les flèches verticales indiquent le moment du début de réhydratation et de réalimentation durant la dernière période de l'expérience 1 et 2 successivement. Les barres noires et blanches correspondent à la phase obscure et lumineuse du cycle lumière-obscurité.

Dans les deux expériences 1 et 2, l'amplitude du rythme de Tb est plus importante durant les 4 derniers jours des phases de déshydratation et de restriction alimentaire. Celle-ci était de 3.41±0.28°C (**Figure 37**) et de 3.01±0.18°C respectivement (**Figure 53**).

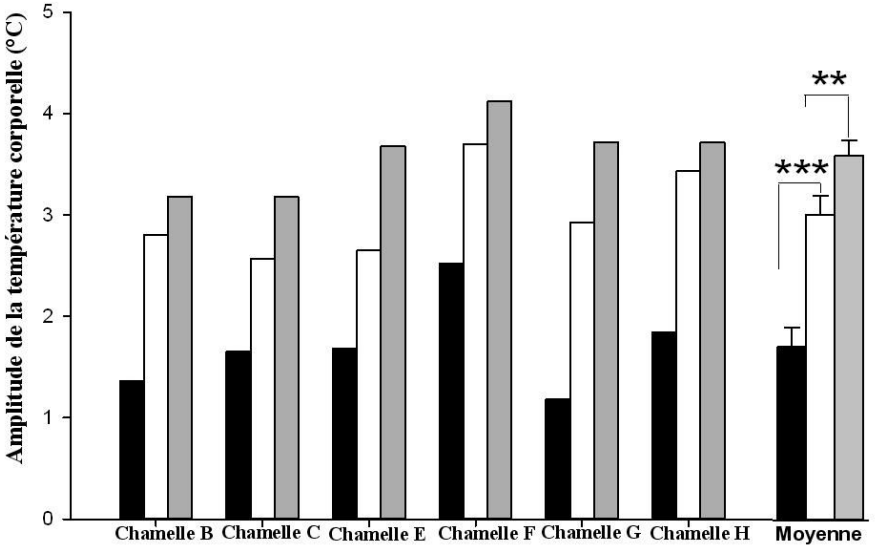

Figure 53 : Amplitude de la température corporelle de chaque chamelle et des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2.

Les amplitudes ont été calculées sur les données de la température corporelle des 4 derniers jours de la phase de contrôle (barres noires), des 4 derniers jours de la phase de diminution progressive de l'alimentation (barres blanches) et du premier jour de la phase de réalimentation (barres grises). Les amplitudes moyennes sont représentées avec les barres d'erreurs (amplitude ±SEM).
** 0.001<p≤0.01, *** p≤0.001

L'augmentation de l'amplitude observée au cours des derniers jours de la phase de diminution progressive de l'alimentation est due à la diminution de la Tb_{min} (**Figure 50A**) et non pas à l'élévation de la Tb_{max} (**Figure 50B**), à l'inverse de ce que nous avons noté durant la phase de déshydratation de l'expérience 1. Comme pour la déshydratation, nous avons également étudié l'effet de la diminution progressive de l'alimentation sur la phase du rythme de la Tb. Le retard de phase par rapport à la transition obscurité-lumière noté durant la phase de déshydratation (expérience 1), n'a pas été observé chez les dromadaires en restriction alimentaire (**Figure 52**). Pendant le premier jour de la phase de réhydratation et de la phase de réalimentation, l'amplitude du rythme de Tb était respectivement de 1.78±0.13°C (**Figure 37**) et de 3.59±0.15°C (**Figure 53**). Si la disponibilité de l'eau a un effet immédiat sur la diminution de l'amplitude du rythme de Tb, la réalimentation nécessite plus de temps pour retrouver les valeurs initiales de Tb enregistrées durant la phase du contrôle.

L'ensemble de ces résultats confirment bien l'existence d'un état d'hétérothermie chez le dromadaire déshydraté et soumis à de hautes Ta et démontrent pour la première fois que cette hétérothermie adaptative est adoptée également par le dromadaire en état de restriction alimentaire sous de hautes Ta. Dans nos conditions expérimentales, nous avons trouvé que ces deux facteurs externes, la privation hydrique et la restriction alimentaire, sont impliqués dans le processus d'hétérothermie adaptative probablement via différents mécanismes et à des niveaux différents. En conclusion, le dromadaire possède un système de thermorégulation caractérisé par une plasticité remarquable, essentiellement utilisée pour faire face à la rareté

de l'eau et de la nourriture dans son biotope. Cette plasticité identifiée pour la première fois via nos expériences, correspond à une régulation complexe sur 24 heures, caractérisée par une double altérnance quotidienne des phases de poïkilothermie et d'homéothermie.

2.3.2. Effets de la diminution progressive de l'alimentation et du stress thermique sur certains paramètres physiologiques chez le dromadaire parfaitement hydraté

Comme dans l'expérience 1, en plus de la température corporelle, nous avons suivi certains paramètres physiologiques. Premièrement, afin de bien contrôler le bon déroulement de l'expérience puisque dans cette étude les chamelles ont été exposées à des Ta élevées et à une restriction progressive de l'alimentation pendant 19 jours consécutifs. Deuxièmement, pour évaluer dans nos conditions expérimentales l'effet de la diminution progressive de l'alimentation sur un certain nombre de paramètres physiologiques chez le dromadaire et les comparer avec des études ultérieures.

2.3.2.a. Poids corporel

Au début de cette expérience, les chamelles avaient un poids corporel moyen de 421.69±16.6 Kg. Après 19 jours de diminution progressive de l'alimentation sous les conditions préalablement citées de cette expérience, le poids corporel moyen des chamelles a baissé à 365.90±9.9 Kg avec une perte moyenne de 12.99% (**Tableau 8**). La récupération partielle du poids corporel initial a été observé dès le premier jour de réalimentation ainsi le poids corporel moyen des six chamelles était de 383.45±12.67 Kg. Les chamelles ont regagné leur poids corporel initial après une semaine. Le traitement des données par ANOVA à un facteur avec mesures répétées a montré l'existence d'une différence significative dans les valeurs moyennes du poids corporel entre les 3 phases de l'expérience 2 ($F_{(2,10)=}$ 42.498, p= 0.0000013). La comparaison des poids corporels moyens en utilisant le test post hoc de Tukey, durant la phase de contrôle, la phase de diminution progressive de l'alimentation et pendant la phase de réalimentation a montré qu'il y a une diminution significative du poids corporel des chamelles ($p<0.05$) suite à la restriction progressive de l'alimentation (**Figure 54, 55**).

Tableau 8 Pourcentage de perte de poids corporel de chaque chamelle après 19 jours de diminution progressive de l'alimentation durant l'expérience 2

Chamelles	% de perte de poids corporel
Chamelle B	9.66
Chamelle C	9.87
Chamelle E	14.34
Chamelle F	19.06
Chamelle G	14.05
Chamelle H	10.94
Moyenne	12.99

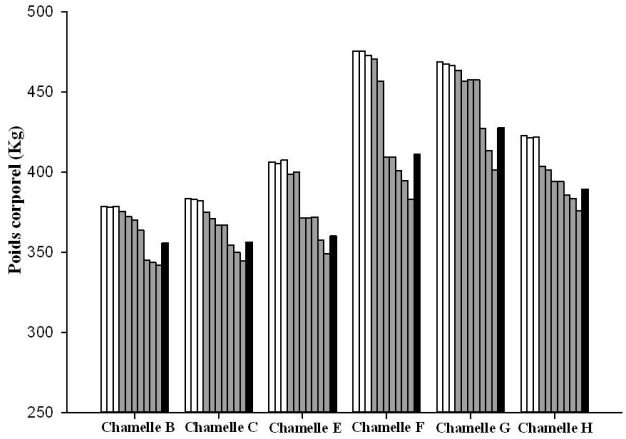

Figure 54 : Evolution du poids corporel des six chamelles placées sous les conditions de l'expérience 2.

Poids corporel de chaque chamelle durant les 3 phases de l'expérience 2 : jour 1, jour 5 et jour 8 durant la phase de contrôle (les barres en blanc), jour 3, jour 6, jour 9, jour 12, jour 15, jour 18 et jour 1 (premier jour de réalimentation : dernière pesée juste avant la réalimentation) correspondent à des pesées lors de la diminution progressive d'alimentation (barres en gris) et jour 2 correspond a une pesée 24-h après la réalimentation (barres en noir).

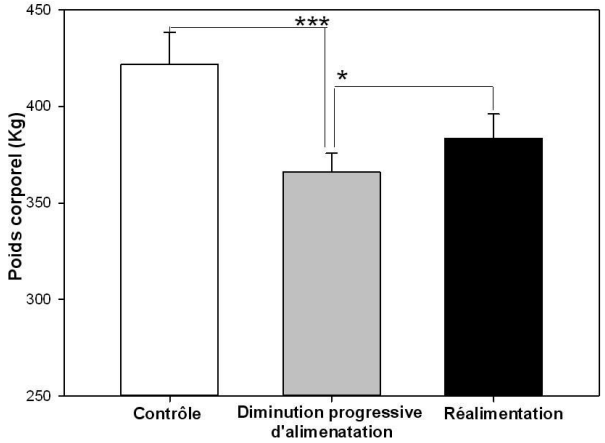

Figure 55 : Effet de la diminution progressive de l'alimentation sur le poids corporel des chamelles durant l'expérience 2

Moyenne des poids corporel des six chamelles utilisées dans l'expérience 2 : après 8 jours de contrôle (barre blanche) et après 19 jours de diminution progressive de l'alimentation (barre grise) et après un jour de réalimentation (barre en noire). Les moyennes sont représentées avec les barres d'erreur (moyennes ± SEM).
* $0.01<p\leq0.05$, *** $p\leq0.001$

2.3.2.b. Autres paramètres

Les taux de protéines totales, d'hémoglobine et d'hématocrite n'ont montré aucun changement tout au long de l'expérience 2. Ceci suggère que les conditions de cette expérience n'affectent pas le volume plasmatique d'une manière significative.

III. Discussion

Dans le présent travail, nous avons établi clairement que la privation de l'eau lors de l'exposition à la chaleur durant le jour a un effet significatif sur l'amplitude du rythme de la Tb chez le dromadaire (adoption d'un état d'hétérothermie). Ainsi, les résultats de notre étude confirment ceux de (Schmidt-Nielsen et *al*., 1957; Schmidt-Nielsen et *al*., 1967), rapportés précédemment. Toutefois, cet état d'hétérothermie adaptative a été mise en cause par Al Haidary (2005). L'utilisation d'un nouvel outil électronique IButton® pour l'enregistrement continu de la température corporelle sans aucune manipulation de l'animal et l'usage d'une étable où les paramètres environnementaux sont contrôlables, spécialement la température ambiante et la photopériode, ont permis de se lancer dans des études plus précises et de plus longues durées sur le processus d'hétérothermie adaptatif. Les résultats obtenus permettent d'identifier et ce, pour la première fois chez le dromadaire déshydraté et placé sous de hautes Ta, l'existence d'une régulation complexe de thermorégulation avec alternance quotidienne des phases de poïkilothermie et d'homéothermie. Cette remarquable plasticité du système de thermorégulation chez le dromadaire est le résultat d'un cycle journalier de la Tb entrainée par le cycle lumière-obscurité (**Figure 40D**). Nous avons démontré précédemment que le rythme journalier de la température corporelle est de nature circadienne puisqu'il persiste en conditions constantes avec une période propre différente de 24-h. Par conséquent, nous avons prouvé et pour la première fois l'existence d'une horloge biologique chez le dromadaire (El Allali et *al*., 2013). En se basant sur le résultat précédent, nous suggérons que cette plasticité complexe du système de thermorégulation avec alternance quotidienne de phase de poïkilothermie et d'homéothermie, notée chez le dromadaire en restriction hydrique et placé dans un environnement à haute Ta, est de nature circadienne. Cette interprétation reste hypothétique et sa validation nécessitera des études prolongées sur des dromadaires gardés dans des conditions constantes (obscurité totale ou bien lumière constante). En plus, dans ce travail, nous avons clairement démontré que la déshydratation provoque un retard de phase du pic du rythme de la Tb par rapport à la transition obscurité-lumière. Ce retard de phase n'est

pas observé quand les dromadaires ont subi une restriction alimentaire (**Figure 52**). Ce phénomène est en accord avec notre hypothèse formulée sur la nature circadienne du processus d'hétérothermie adaptative. En effet, la déshydratation pourrait agir sur le fonctionnement de l'horloge principale ou encore sur la synchronisation de l'horloge par le cycle lumière-obscurité. Toutefois, à l'heure actuelle ne nous pouvons pas le prouver. Comme l'avons signalé en haut de ce chapitre, le rythme de la Tb chez le dromadaire en privation hydrique est directement influencé par la Ta, et ceci se traduit clairement par la présence de deux phases de poïkilothermie sur 24 heures. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure totalement que le retard de phase du pic du rythme de la Tb que nous avons précédemment trouvé associé à un état de déshydratation, pourrait simplement résulter des variations du cycle de Ta. La superposition du rythme moyen de Tb des 6 chamelles, calculé pendant les 4 premiers et les 4 derniers jours de la phase de déshydratation, avec le cycle journalier de Ta semble appuyer notre suggestion (**Figure 56**).

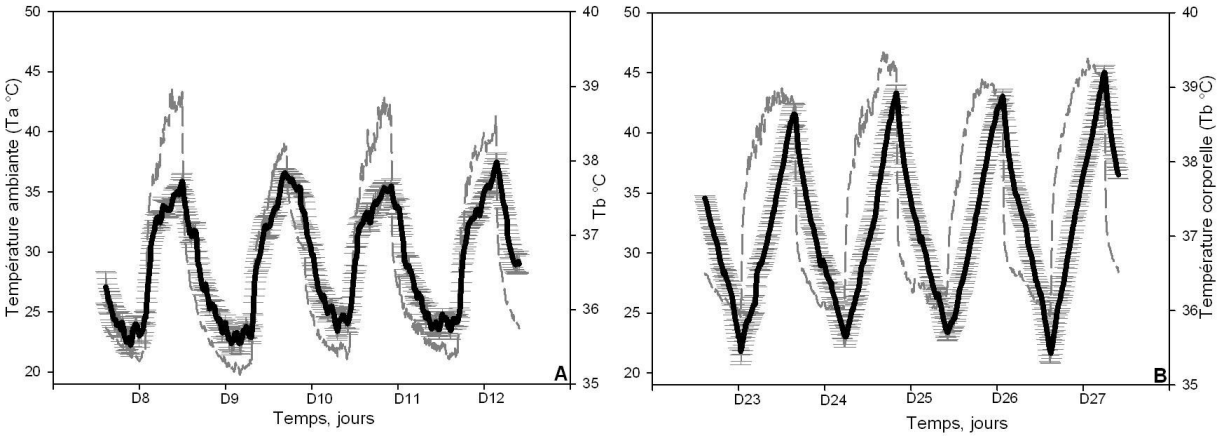

Figure 56 : Superposition du rythme moyen de Tb des 6 chamelles avec le cycle de Ta durant l'expérience 1.

Superposition du rythme moyen (± SEM) de Tb (line en noire) des 6 chamelles calculé pendant les 4 premiers (A) et les 4 derniers jours de la phase de déshydratation (B), avec le cycle journalier de Ta (line en gris).

Indépendamment du mécanisme impliqué, le retard de la phase du pic du rythme de Tb pourrait avoir des conséquences drastiques dans la physiologie des animaux. En effet, l'adaptation et l'anticipation optimale aux changements physiques de l'environnement, observée dans les processus biologiques, physiologiques et comportementaux implique des mécanismes fonctionnels qui dépendent d'un réseau comprenant une horloge circadienne principale (SCN) et de multiples structures périphériques capables elles-mêmes de générer des rythmes (oscillateurs périphériques) (Dibner *et al.*, 2010; Pévet & Challet, 2011). Les interactions complexes entre l'horloge principale et les oscillateurs subordonnés animent l'expression temporelle dans les autres tissus nerveux ou périphériques.

Le rythme de Tb est l'une des sorties de l'horloge principale qui est connu pour être l'un des signaux puissants utilisés pour la synchronisation des oscillateurs périphériques (Brown et *al*., 2002; Buhr et *al*., 2010). Chez le dromadaire, la déshydratation provoque un retard de phase du pic du rythme de Tb par rapport au cycle lumière-obscurité, ceci pourrait engendrer un état de désynchronisation interne entre différentes fonctions dans l'organisme. Nous supposons que cette réponse de phase constitue l'un des mécanismes d'adaptation aux conditions désertiques. Dans un travail précédent, nous avons démontré l'existence d'un entrainement non-photique de l'horloge en utilisant le cycle de Ta comme zeitgeber (El Allali et *al.*, 2013). Le protocole adopté dans la présente étude permet également de vérifier dans ces conditions spécifiques, si l'utilisation du cycle de Ta comme zeitgeber avec des amplitudes élevées est capable d'interférer avec le synchroniseur puissant qu'est le cycle lumière-obscurité. Ceci constitue une question fondamentale dans la biologie circadienne des mammifères. En outre, il conduira aussi à comprendre et à déterminer plus précisément le fonctionnement du réseau circadien, spécifiquement l'horloge circadienne principale et d'autres oscillateurs périphériques chez le dromadaire en privation hydrique placé sous des hautes Ta.

Au cours de nos expériences, nous avons suivi le rythme de Tb des chamelles pendant une longue durée en utilisant des capteurs électroniques IButton®. Cet outil, nous a permis la compréhension des résultats de Al Haidary (2005). Dans notre expérience 1, l'application d'une privation totale d'eau durant la période de déshydratation avec le maintien d'un cycle de Ta caractérisé par des grands écarts de températures entre le jour et la nuit entraine l'apparition d'une amplitude croissante. En effet, l'amplitude du rythme moyen de Tb commence à augmenter progressivement à partir du 7^{éme} jour de privation hydrique. En s'appuyant sur des données bibliographiques (Schmidt-Nielsen *et al.*, 1957; Mc Farlane *et al.*, 1963; Zine-Filali, 1991; Ayoub & Saleh, 1998; Bengoumi & Faye, 2002), nous avons remarqué que dans toutes les études réalisées ayant démontré l'existence de cette hétérothermie chez le dromadaire en restriction hydrique et placé sous de hautes Ta, la période de déshydratation avoisinant les 12 jours. Il est nécessaire de noter que l'intensité du stress thermique est à prendre en considération à côté du facteur durée. La remise en question du processus d'hétérothermie par Al Haidary (2005), serait principalement due au choix d'une courte période de déshydratation. En effet, la restriction hydrique était très courte, seulement de 96 heures et sous une Ta moyenne modérée de 38.3°C. Ceci expliquerait l'état d'homéothermie retrouvé chez les dromadaires utilisés dans cette étude.

En fonction de la disponibilité de l'eau et des conditions climatiques de son environnement immédiat, le dromadaire adopte une régulation complexe de thermorégulation avec une alternance quotidienne des phases de poïkilothermie et d'homéothermie. Ceci joue un rôle primordial dans la physiologie d'adaptation chez cet animal. Ce processus d'hétérothermie peut apparait-il chez d'autres mammifères vivant dans des conditions environnementales similaires ? Une telle hétérothermie adaptative a été démontrée chez de nombreuses espèces d'antilopes : la gazelle Idemi en captivité (*Gazella gazella*) (Al Johany et *al*., 1998), la gazelle du sable vivant en liberté (Gazella subgutturosa marica) (Ostrowski & Williams, 2006) l'oryx Arabe en liberté (*Oryx leucoryx*) (Ostrowski *et al.*, 2003; Hetem *et al.*, 2010). Récemment, il a également été décrit que les éléphants asiatiques (*Elephas maximus*) parfaitement hydratés s'adaptent aux Ta élevées en adoptant un état d'hétérothermie (Weissenbock et *al*., 2012). L'hétérothermie adaptative semble donc être un phénomène spécifique aux animaux vivants dans le milieu désertique ou semi-désertique. L'Homme fait aussi partie des êtres vivants occupant ces zones arides en s'adaptant aux conditions environnementales extrêmes. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans le développement de ce processus d'adaptation, en particulier la composante rythmique et/ou circadienne puisqu'elle est considérée comme une clée pour s'adapter aux changements environnementaux extrêmes.

Nos résultats montrent également que les chamelles en privation hydrique et placées sous de hautes Ta (38-46°C) durant le jour, réduisent leurs prises de nourriture. Des études ultérieures ont rapporté que la privation hydrique à des Ta élevées conduit à une diminution de la consommation de la nourriture chez le dromadaire. A notre connaissance, cette observation n'a pas encore été décrite en détail, et particulièrement son effet sur l'augmentation de l'amplitude du rythme de Tb (adoption d'une hétérothermie adaptative) n'a jamais été rapporté. Cette baisse de la prise alimentaire a été aussi démontrée chez le mouton (Gueroulali, 1980). De même, Ayoub et Saleh (1998) ont réalisé une étude physiologique comparative entre le dromadaire et la chèvre privés d'eau de boisson pendant 72 h et sous des Ta de 31.4°C. Ils ont trouvé que la déshydratation engendre une diminution progressive de la prise alimentaire chez les deux espèces (une chute de 54.6% chez le dromadaire et seulement une diminution de 27% chez la chèvre). Egalement, Bengoumi (1992) et Achaaban (1998) ont montré que les quantités d'aliments consommés diminaient significativement avec la déshydratation. Dans le travail de Al Haidary (2005), il est également rapporté que le dromadaire diminuait significativement sa prise alimentaire uniquement après 24h de restriction hydrique et un arrêt total de la prise de la nourriture après 72h de déshydratation.

Dans le présent travail, nous avons décrit et quantifié ce phénomène de diminution de la prise alimentaire. Sous des conditions de chaleur et de déshydratation, les chamelles réduisent progressivement leur prise de nourriture. En effet vers la fin de la phase de déshydratation, nous avons relevé une chute de 76.6% pour la paille et de seulement 35% pour l'aliment concentré. Une diminution concomitante du poids corporel a été notée. La réhydratation a permis une reprise rapide et immédiate de la consommation de la paille et de l'aliment concentré. Chez les rongeurs aussi la déshydratation permet de déclencher ce qu'on appelle « une anorexie induite par la déshydratation » (Watts & Boyle, 2010; Alvarez-Salas *et al.*, 2012). Suite à nos résultats chez le dromadaire, nous avons voulu savoir si cette diminution progressive de la prise de nourriture durant la phase de déshydratation était responsable de l'instauration du processus d'hétérothermie adaptative. Nous avons également recherché si ce phénomène pourrait avoir un effet sur la phase du rythme de Tb par rapport au cycle lumière-obscurité. Les résultats de l'expérience 2 montrent clairement que la diminution de la prise de nourriture imposée à des chamelles parfaitement hydratées et maintenues sous de hautes Ta provoque une augmentation de l'amplitude du rythme de Tb. Ce résultat confirme des travaux ultérieurs sur la restriction alimentaire chez les rongeurs (Nelson & Halberg, 1986; Challet, 2010). La diminution de la prise de nourriture observée durant l'expérience 1 résultant de la privation hydrique, et/ou de Ta élevées, pourrait être impliquée dans le mécanisme d'hétérothermie adaptative. Ceci pose le problème du rôle respectif de la diminution progressive de la prise alimentaire et de la déshydratation dans l'établissement d'un état d'hétérothermie. Il est difficile de répondre entièrement à cette question, même si on a pu étudier au moins l'effet de la restriction alimentaire seul sur le rythme de Tb. Cependant, il est impossible de dissocier la privation hydrique de la diminution progressive de la prise alimentaire puisque la déplétion hydrique est responsable de l'apparition d'un état de chute de prise alimentaire chez le dromadaire. Quoi qu'il en soit, la comparaison des données obtenues dans nos deux expériences permet d'en tirer plusieurs conclusions. Dans l'expérience 2 quand les chamelles ont été parfaitement hydratées, l'augmentation de l'amplitude du rythme de Tb résultant de la restriction alimentaire imposée est caractérisée par une diminution progressive de Tb_{min} à la fin de la nuit. Ceci est compatible avec la diminution du métabolisme basale classiquement observée chez les rongeurs en restriction alimentaire (McCarter & McGee, 1989) et en concordance avec études précédentes réalisées chez le dromadaire.(Dahlborn et *al.*, 1992; Zine-Filali et *al.*, 1995). En comparaison avec les valeurs de Tb enregistrées durant la période de contrôle, cette diminution importante de Tb_{min} explique la faible moyenne de Tb notée durant la phase de diminution progressive de l'alimentation, même si une très faible

augmentation de Tb_{max} est également observée. A la lumière de ces résultats, la diminution du métabolisme de base peut être interprétée comme une stratégie adoptée par le dromadaire afin de conserver ses réserves énergétiques durant la période de restriction alimentaire. Lorsque le dromadaire est déshydraté ou bien parfaitement hydraté mais sujet à une restriction alimentaire, nous avons observé une augmentation similaire dans l'amplitude de rythme de Tb. Dans ces conditions expérimentales, l'élévation de la moyenne de rythme de Tb est due à une augmentation progressive de Tb_{max} en fin d'après-midi. Toutefois, Tb_{min} ne semble pas affecter dans ces conditions Ta élevée et de déshydratation. En outre, la diminution de Tb_{min} observée lors de la restriction alimentaire imposée, n'est pas observée quand les chamelles ont été en déplétion hydrique même si sous cette dernière condition le degré de restriction alimentaire est semblable. Nos résultats démontrent clairement que ces deux facteurs externes (déshydratation et niveau d'alimentation) sont impliqués dans le processus d'hétérothermie adaptative probablement par différents mécanismes agissant à divers niveaux. Ceci corrobore le fait que le déphasage du pic du rythme de Tb observé chez les dromadaires déshydratés n'est pas décelable chez les animaux sujets à une restriction alimentaire imposée. En se basant sur ces nouveaux résultats, nous pouvons conclure que l'hétérothermie adaptative chez le dromadaire est donc une combinaison de trois facteurs qui interagissent tout au long du cycle journalier lumière-obscurité : la Ta élevée, la restriction hydrique et le niveau de la prise alimentaire.

Chapitre V. INTEGRATION DU SIGNAL PHOTOPERIODIQUE CHEZ LE HAMSTER D'EUROPE : MISE EN EVIDENCE D'UNE VOIE INDEPENDANTE DE LA MELATONINE

I. Introduction

II. Analyses des données

III. Nature de l'expression nocturne de c-Fos dans l'ARC

IV. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe

V. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe pinéalectomisés

VI. Discussion

I. Introduction

Plusieurs fonctions physiologiques, biologiques et comportementales varient en fonction des saisons par exemple : la **reproduction**, la **migration**, la **prise alimentaire**, l'**hibernation**, la **masse corporelle**, la **thermorégulation**, les **comportements sociaux**, la **mue du pelage**, la **sécrétion des hormones** et la **concentration des neurotransmetteurs dans le cerveau** (Walker *et al.*, 1980; Heldmaier & Steinlechner, 1981; Bartness & Wade, 1985; Buijs *et al.*, 1986; Ferkin & Zucker, 1991; Goldman & Nelson, 1993; Turek & Van Cauter, 1994). Ces fonctions physiologiques limitées à une seule période de l'année ne peuvent pas débuter instantanément. Leur déclanchement exige, en effet, une longue préparation endocrinienne, métabolique ou même comportementale, induite par des mécanismes internes, eux-mêmes inféodés aux variations périodiques du milieu. Par conséquent, il est indispensable que les animaux aient la possibilité de s'orienter dans le temps et de pouvoir ainsi déterminer la période propice au cours de laquelle les facteurs environnementaux atteindront un niveau compatible avec l'installation du phénomène physiologique saisonnier. Le **changement de photopériode** est le marqueur le plus fiable pour déterminer la période de l'année (Gorman et *al*., 2001).

A l'image des rythmes circadiens, des travaux antérieurs ont étudié l'endogénie des rythmes circannuels chez plusieurs espèces. Par exemple, Pengelly et Fisher (1963) ont montré la persistance pendant au moins trois ans du rythme de la masse corporelle, de la prise alimentaire et de l'hibernation chez un mammifère hibernant (*Spermatophilus lateralis*), élevé dans des conditions constantes de température (21°C et 0°C) et d'éclairement (LD 12:12). Des résultats identiques aux précédents signent la nature **endogène des rythmes circannuels**. En effet, il a été démontré dans la plupart des cas que la période du rythme circannuel sous des conditions de libre cours est inférieure à un an « par 1 à 2 mois » (Gwinner, 1986). Dans la nature, le principal *zeitgeber* assurant la synchronisation des rythmes annuels est la photopériode (la variation de la longueur du jour) (Gwinner, 1986; Goldman, 2001; Paul *et al.*, 2008). Chez les mammifères, l'intégration du signal photopériodique est assurée essentiellement par deux différentes stratégies : 1) un contrôle direct par la photopériode, dans le cas des rythmes saisonniers ou 2) l'entrainement par la photopériode des rythmes circannuels endogènes (Zucker, 2001). Chez **les espèces photopériodiques**, les changements de la photopériode entrainent directement des variations physiologiques saisonnières (e.g. reproduction/quiescence sexuelle). Par exemple, les hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*) ou sibériens (*Phodopus sungorus*), exposés à une photopériode longue sont sexuellement

actifs (Gaston & Menaker, 1967; Hoffmann, 1982). Leur exposition à une photopériode courte induit en quelques semaines une atrophie des gonades. Toutefois, quand ils sont maintenus en SP constante, les animaux redeviennent sexuellement actifs après 24 à 28 semaines (phase photoréfractaire). Les gonades restent alors actives durant toute la vie du hamster sauf si cette phase photoréfractaire est rompue par une nouvelle exposition à la LP (Reiter, 1972; Stetson et *al.*, 1976). Les espèces photopériodiques sont incapables de présenter un cycle annuel en absence des changements de la photopériode (Reiter, 1972; Hoffmann, 1981). **Les espèces qui présentent des rythmes circannuels** expriment des cycles physiologiques complets et répétitifs avec une période proche d'un an même quand ils sont maintenus pendant plusieurs années dans des conditions environnementales constantes (Pengelly, 1974; Gwinner, 1986; Boissin & Canguilhem, 1988). Les changements de la photopériode par contre entrainent l'horloge endogène circannuelle avec une période d'un an, d'où les rythmes circannuels (e.g. la reproduction, l'hibernation…) (Pengelly, 1974; Boissin & Canguilhem, 1988). La synchronisation de l'horloge circannuelle par le signal photopériodique n'est efficace que durant certaines phases du cycle circannuel (Randall *et al.*, 1998; Miyazaki *et al.*, 2005; Monecke *et al.*, 2009). Par exemple, chez le hamster d'Europe « *Cricetus cricetus* », la synchronisation ne nécessite pas une perception constante du signal photopériodique (Masson-Pévet et *al.*, 1994b). En effet, les changements photopériodiques entrainent l'horloge circannuelle durant deux phases de photosensibilité situées autour des solstices (Saboureau *et al.*, 1999; Monecke & Wollnik, 2004). Une phase de sensibilité à la SP vers le solstice d'été (aux alentours de mi-Mai jusqu'à mi-Juillet) (Saboureau et *al.*, 1999). Durant cette phase, l'exposition à une SP (LD 10:14) provoque en 4 semaines un état de repos sexuel. Dans la nature, le raccourcissement de la photopériode en dessous de la valeur critique 15.5 h qui se produit en mi-Juillet à 48°35' N, Strasbourg, France (Canguilhem et *al.*, 1988) induit une régression des gonades (Saboureau *et al.*, 1999; Monecke & Wollnik, 2005). Une phase de sensibilité à la LP (autour du solstice d'hiver) a été également mise en évidence chez cette espèce, elle se produit à partir de mi-Novembre jusqu'en Mars, voir début Avril (Monecke & Wollnik, 2004). Durant cette phase, l'exposition à une LP (LD 16:08) provoque une réactivation sexuelle chez le hamster d'Europe. Monecke and Wollnik ont démontré qu'une photopériode d'environ 13h est nécessaire pour stimuler la recrudescence des gonades chez le hamster d'Europe (2004) induit un développement des gonades. Puisque le cycle annuel de reproduction chez l'hamster d'Europe est de nature endogène, le développement des gonades survient généralement avant que la photopériode naturelle dépasse la valeur critique (Masson-Pévet *et al.*, 1994b; Monecke & Wollnik, 2004).

Chez les mammifères, l'hormone MLT sécrétée par la glande pinéale joue un rôle essentiel dans le traitement de l'information photopériodique de l'environnement. Le rythme de MLT généré par la glande pinéale et contrôlé par les SCN, représente un signal hormonal efférent de l'horloge qui définit la nuit biologique. La synthèse de la MLT est dépendante des variations journalières et saisonnières de l'environnement lumineux et la durée de sa sécrétion est proportionnelle à la longueur de la nuit et expérimentalement, il a été démontré que cette variation de durée qui permet au cerveau d'intégrer le message photopériodique (Bartness & Goldman, 1989; Pévet *et al.*, 1991; Steinlechner, 1992). La sécrétion rythmique de la MLT, constitue ainsi à la fois une sortie circadienne et saisonnière de l'horloge (Pévet, 2003b). Comme chez les mammifères à reproduction saisonnière, le hamster d'Europe utilise également la photopériode afin de réguler son activité sexuelle (Canguilhem et *al.*, 1986; Masson-Pévet et *al.*, 1987). Il intègre la photopériode *via* une voie neuroendocrine permettant de traduire le signal photique en un message hormonal : libération rythmique de la MLT (Reiter, 1993; Goldman, 2001; Pévet, 2003b). Toutefois, il faut noté que les variations jour-nuit de la sécrétion de MLT sont absentes à la fin du printemps et au début de l'été (Pévet et *al.*, 1989).

Chez le hamster d'Europe, un cycle annuel de reproduction s'exprime même dans un environnement constant. Ce rythme dépend d'une horloge circannuelle qui est, dans la nature, entrainée à un an par les changements photopériodiques. Masson-Pévet et ses collaborateurs (1994b), ont démontré chez des hamsters d'Europe capturés en Avril-Mai et ensuite maintenus sous des conditions constantes de LP (LD 16:8) et de Ta (20±2°C), qu'un grand nombre d'animaux présentaient entre Septembre et Décembre une atrophie gonadique complète associée à une diminution de la masse corporelle (**Figure 57A et B**). La reprise de l'activité sexuelle ainsi que l'augmentation de la masse corporelle ont été observées chez les mêmes animaux, entre Janvier et Avril. Ces observations démontrent clairement que l'involution de l'activité sexuelle ne nécessite pas une diminution de la photopériode.

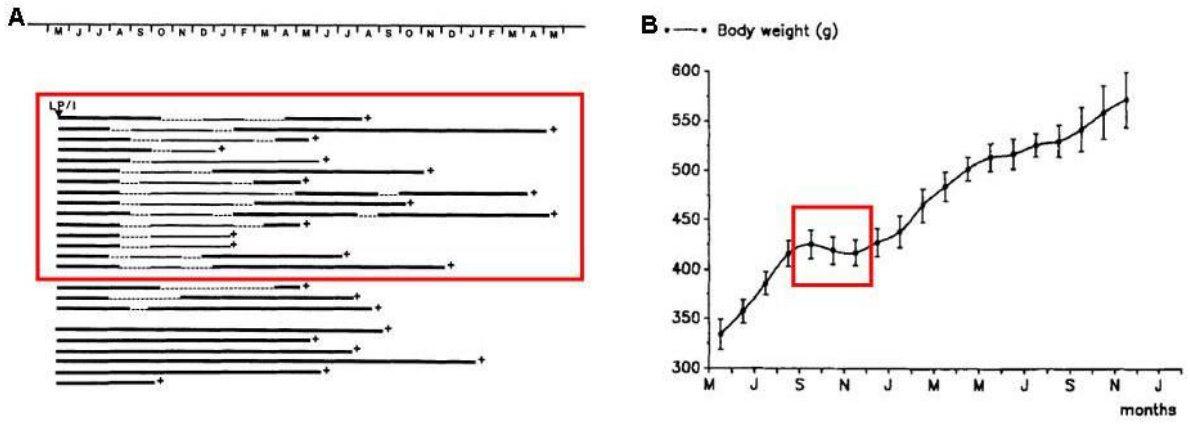

Figure 57 : Evolution de la taille des testicules et du poids corporel chez des hamsters d'Europe maintenus en conditions constantes de photopériode longue (LD 16:08) et de température ambiante.

A : Représentation schématique de la taille des testicules chez des hamsters européens intacts, maintenus en conditions constantes de longue photopériode et de TA après leur capture en Mai. La ligne du haut indique le temps en mois. Les lignes épaisses représentent les testicules larges, les lignes en pointillées représentent les testicules de taille moyenne et les fines lignes schématisent les testicules de petites tailles. Le rectangle rouge délimite les hamsters présentant une atrophie testiculaire durant une période de 3 à 6 mois. B : évolution du poids corporel moyen (±SEM) des hamsters d'Europe placés sous les mêmes conditions constantes de longue photopériode et de Ta. Le rectangle rouge indique la période septembre-Décembre où les animaux ont présenté une légère diminution de la masse corporelle.

Masson-Pévet et ses collaborateurs (1994b)

Dans ces conditions, si les variations observées dans l'activité sexuelle et dans la masse corporelle correspondaient à des rythmes endogènes, générés par l'horloge circannuelle, ils doivent persister en absence de toute information photopériodique. Afin de tester cette hypothèse, Masson-Pévet et ses collaborateurs (1994b) ont suivi sous les mêmes conditions expérimentales (LD 16:08 et Ta =20±2°C) l'activité sexuelle et la masse corporelle chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés (les animaux deviennent incapables de détecter les changements de photopériode). La **Figure 58** montre que les animaux pinéalectomisés expriment également des rythmes circannuels.

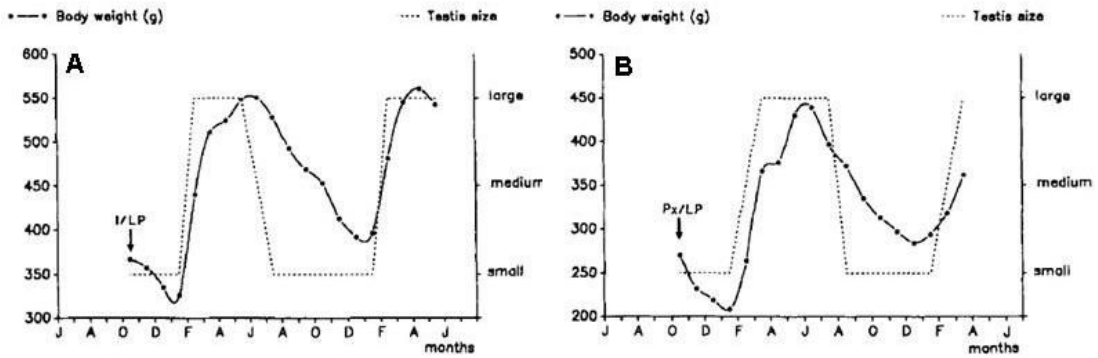

Figure 58 : Evolution de la taille des testicules et du poids corporel chez un hamster d'Europe intact et un autre pinéalectomisé, tous les deux maintenus sous des conditions constantes de photopériode longue (LD 16:08) et de température ambiante.

Evolution de la taille des testicules (ligne en pointillée) et le poids corporel (ligne continue) chez un hamster d'Europe intact (graphe A) et chez un hamster d'Europe qui a été pinéalectomisé en mi-octobre. Les deux animaux ont été placés sous les conditions constantes de photopériode longue (LD 16:08) et de température ambiante

Masson-Pévet et ses collaborateurs (1994b)

Des travaux récents dans notre laboratoire (NBR-INCI) montrent que le système est très complexe et qu'à côté de la MLT, d'autres systèmes peuvent être impliqués dans la lecture de la photopériode. En suivant quatre paramètres physiologiques à savoir : la reproduction, le poids corporel, la température corporelle et l'activité locomotrice, Monecke *et al.,* (2013) ont confirmé que la MLT est capable d'entrainer des rythmes circannuels, ils ont aussi démontré que la présence de l'hormone n'est pas nécessaire. Les résultats de Monecke *et al.,* (2013) démontrent que les hamsters d'Europe pinéalectomisés sont capables d'exprimer les rythmes circannuels de reproduction, de la masse corporelle, de la température corporelle et de l'activité locomotrice comme chez les hamsters intacts (**Figure 59**). Le signal photopériodique peut donc être intégré d'une façon indépendante de la MLT. La photopériode semble donc être capable d'agir sur d'autres structures cérébrales.

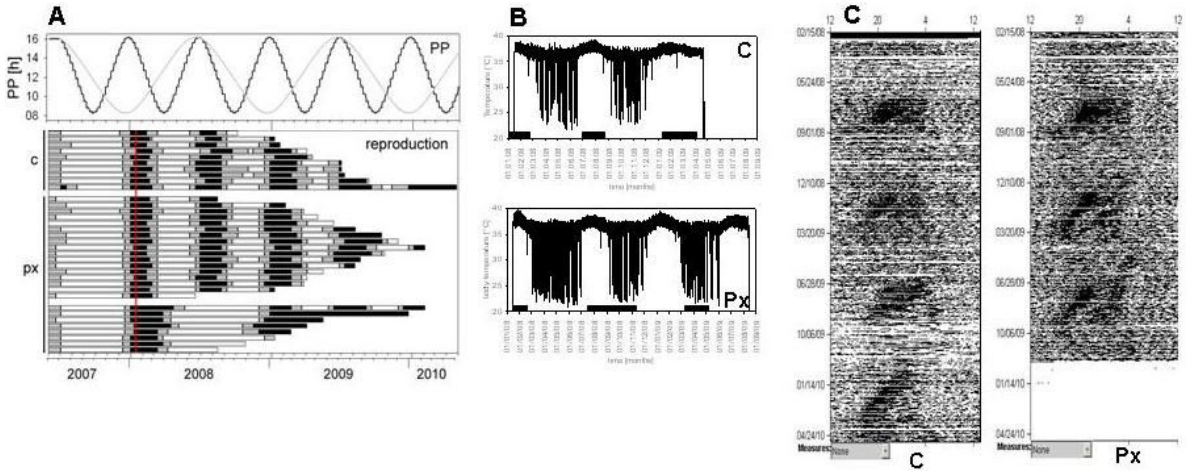

Figure 59 : Entrainement des rythmes circannuels chez des hamsters d'Europe maintenus sous un régime de photopériode accélérée.

A : La courbe noire en haut indique le régime de photopériode accélérée instaurée et la courbe grise montre la photopériode naturelle. Les barres horizontales indiquent l'évolution du rythme de reproduction chez le groupe contrôle (C) et chez le groupe pinéalectomisé (Px). Les animaux sexuellement actifs sont schématisés par les barres noires. Les barres blanches représentent la période où les hamsters montrent une régression testiculaire. Les barres grises illustrent un état sexuel transitoire. B : Evolution du rythme de la température corporelle chez le groupe contrôle (C) et chez le groupe pinéalectomisé (Px). C : Enregistrement du rythme de l'activité locomotrice chez le groupe contrôle (C) et chez le groupe Px.

Monecke et *al.*, (2013)

Cette observation pose de nombreuses questions. Ce mécanisme particulier est-il spécifique aux hamsters d'Europe et aux quelques rongeurs des régions nordiques, ou bien se retrouve t-il chez d'autres mammifères en particulier chez ceux qui vivent dans des biotopes difficiles où les variations environnementales sont multiples et de grandes amplitudes (e.g. dromadaire) ? La photopériode agit, mais où agit-elle ? Quelles sont les voies nerveuses impliquées ? Ce sont ces questions qui sont à la base de nos travaux de recherches dans cette dernière partie de la thèse.

Nous voulons tout d'abord comprendre comment en absence de MLT, le hamster d'Europe est capable d'intégrer les changements photopériodiques.

Pour répondre à cette question, deux hypothèses ont été posées (**Figure 60**) :

1- le signal photopériodique serait transmis via des projections directes allant de la rétine vers l'horloge circannuelle dont la localisation anatomique reste inconnue.

2- Le signal photopériodique serait transmis indirectement via des projections rétiniennes vers l'horloge circannuelle en passant par les SCN.

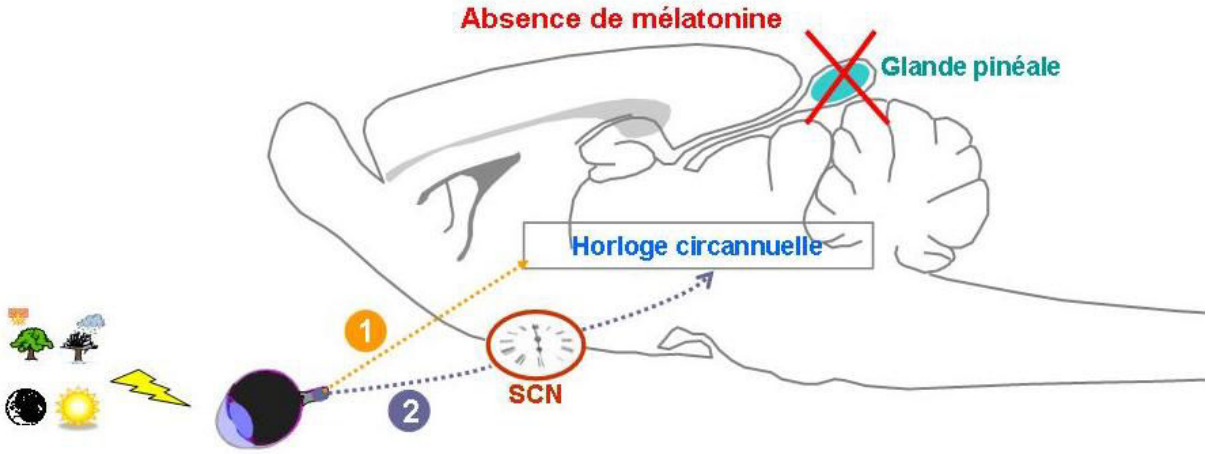

Figure 60 : Représentation schématique des hypothèses 1 et 2 postulées afin d'essayer d'expliquer la voie d'intégration du signal photopériodique en absence de mélatonine.

La transmission du signal photopériodique via des projections rétiniennes vers l'horloge circannuelle en passant par les SCN semble être l'hypothèse la plus logique. Dans ce contexte, plusieurs études démontrent clairement que le signal photopériodique est construit dans les SCN (Menet et *al.*, 2003; Tournier et *al.*, 2003; Tournier et *al.*, 2009) et que l'absence de la MLT endogène (suite à une pinéalectomie) n'empêche pas l'intégration du signal photopériodique dans cette structure (Jacob et *al.*, 1997). Comment tester cette hypothèse expérimentalement chez le hamster d'Europe ? Pour cela, nous avons cherché des paramètres qui varient en fonction de la photopériode dans des structures cérébrales potentiellement impliquées dans le contrôle d'une ou des fonctions circannuelles. En consultant la littérature, nous nous sommes spécialement intéressés aux travaux de Jamali et Tramu (1999). Ces auteurs ont démontré, chez des rats Wistar exposés à une photopériode LD 12:12, que dans l'hypothalamus médio-basal des neurones immunopositifs à la protéine c-Fos étaient présents (**Figure 61a**). Cette induction de c-Fos est rythmique avec une forte expression durant la nuit (**Figure 61b**). Ils ont également établi que l'expression nocturne de c-Fos est en relation avec la durée de la phase obscure (**Figure 61c**). Chez des rats maintenus

en LL (**Figure 61d**) ou en DD pendant 2 à 3 jours, l'expression de c-Fos persiste durant la nuit subjective démontrant ainsi l'endogénicité de ce rythme. En outre, ils ont également prouvé que l'induction nocturne de l'immunoréactivité c-Fos dans les neurones de l'hypothalamus médio basal ne dépend pas de la MLT endogène. En effet chez des rats placés en cycle LD 12:12, la pinéalectomie ne semble affecter ni le pattern cinétique, ni l'amplitude de l'expression c-Fos quelque soit le temps testé (**Figure 61e**).

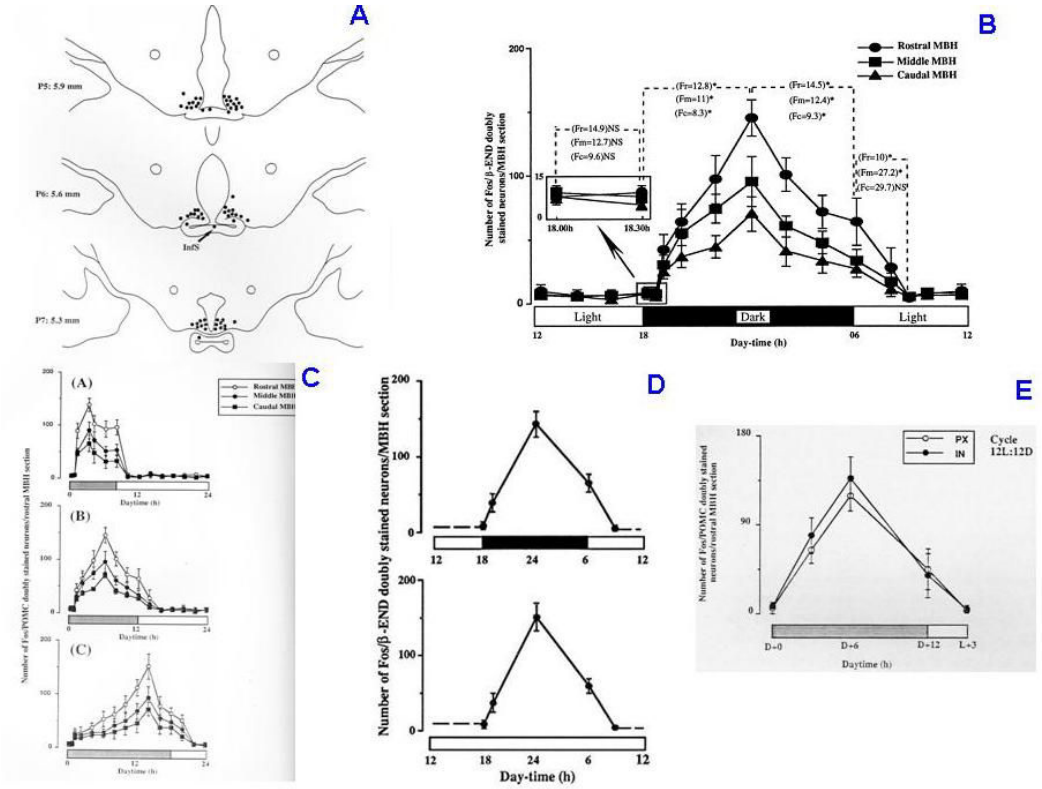

Figure 61 : Expression de c-Fos dans les neurones de l'hypothalamus médio basal chez le rat.

A : Localisation des neurones exprimant c-Fos dans l'hypothalamus médio basal chez le Rat. **B** : Expression rythmique de c-Fos chez des rats maintenus en photopériode LD 12 :12. Le nombre moyen (±SD) des neurones immunorpositifs est donné pour la partie rostrale (ronds), moyenne (carrés) et caudale (triangles) de l'hypothalamus médio-basal. **C** : l'expression nocturne de c-Fos dans l'hypothalamus médio basal est proportionnelle à la durée de la nuit. **D** : Persistance du rythme d'expression de c-Fos dans les neurones de l'hypothalamus de rats maintenus pendant 2 à 3 jours en LL. **E** : La pinéalectomie (PX) ne semble pas affecter l'expression rythmique de c-Fos dans les neurones de l'hypothalamus médio-basal quel que soit le temps testé.

Jamali et Tramu (1999) et Jamali (1998)

En se basant sur les résultats de Jamali et Tramu (1999) et en examinat attentivement les coupes de l'hypothalamus médio-basal réalisées dans leur travail, nous avons pensé que c'est surtout les noyaux arqués qui pouvaient être une structure clef dans les mécanismes d'entrainement des rythmes circannuels par la photopériode. Toutefois, avant d'initier le projet expérimental, il était nécessaire de bien connaitre la nature de cette expression nocturne de c-Fos. Dépend-elle du cycle lumière-obscurité ou bien est-elle le résultat indirect d'un comportement nocturne, par exemple la prise alimentaire ? En effet, il a été rapporté que la

prise alimentaire provoque aussi une augmentation d'expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué (ARC) (Angeles-Castellanos et *al.*, 2010). Du fait du grand nombre d'animaux nécessaires, vérifier cette hypothèse directement chez le hamster d'Europe n'était pas envisageable, d'autant plus que l'obtention d'un grand nombre d'animaux est difficile (reproduction saisonnière). Nous avons donc utilisé des rats Wistar mâles pour répondre à la question posée

Pourquoi le noyau arqué ?

Le noyau arqué est situé dans l'hypothalamus médio basal à la base du cerveau, il se trouve de chaque côté du 3ème ventricule et juste au dessus de l'éminence médiane. Cette structure hypothalamique joue un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie énergétique et dans le contrôle de la reproduction. L'ARC c'est l'une des principales structures du système nerveux central impliqué dans la régulation de la prise alimentaire (Elmquist *et al.*, 1999; Gao & Horvath, 2007; Hill *et al.*, 2008). Il contient au moins deux importantes populations de neurones qui contrôlent avec des effets opposés la prise alimentaire (Parkinson et *al.*, 2008). Dans la partie médiane de l'ARC sont localisés les neurones orexigènes exprimant les neuropeptides NPY et l'AgRP (Agouti Related Protein) (Hahn *et al.*, 1998; Bewick *et al.*, 2005). Les neurones anorexigènes situés dans la partie latérale de l'ARC expriment eux la Pro-Opio-Mélanocortine (POMC), précurseur entre autres de l'Hormone Stimulante de l'alpha-mélanocyte (α MSH), et le CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) (Elias et *al.*, 1998) (**Figure 62**). Dans cette région du cerveau, la barrière hémato encéphalique est de type fenêtrée ce qui permet à ces neurones « appelés neurones de premier ordre » de détecter les taux de leptine, d'insuline et du glucose dans la circulation générale (Cowley *et al.*, 2001; Ibrahim *et al.*, 2003; Faouzi *et al.*, 2007). Les axones de ces neurones projettent sur des neurones de deuxième ordre, dont une partie est localisée dans les PVN, où des molécules anorexigènes telles que l'hormone libératrice de la thyrotropine *pour revue* Cyr et *al.*(2013) (Broberger et *al.*, 1999), l'hormone libératrice de la corticotropine (Yamamoto et *al.*, 2011) et l'ocytocine *pour revue* Valassi et *al.*(2008) sont sécrétées, et les autres parties sont localisées dans l'hypothalamus latéral (LH) et dans l'aire périfornicale (PFA) où les molécules orexigènes telles que l'hormone concentratrice de la Mélanine (MCH) et les orexines sont produites. L'ensemble de ce système agit en régulant le seuil de satiété qui détermine la fin des repas et ajuste ainsi la quantité d'aliments ingérés. Ce phénomène repose également sur les afférences nerveuses en provenance du tractus digestif et

parvenant au niveau du tronc cérébral, dans le noyau du faisceau solitaire (NTS) (Wren & Bloom, 2007; Sam *et al.*, 2012).

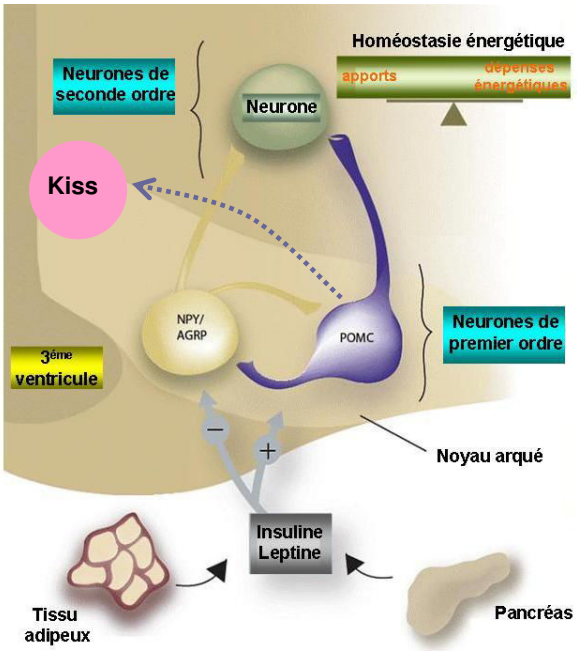

Figure 62 : Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones du noyau arqué.

Dans le noyau arqué, il y'a deux importantes populations de neurones : les neurones AgRP/NPY et POMC/CART. Ces neurones sont régulés par les hormones circulantes. Les neuropeptides AgRP et NPY stimulent la prise alimentaire et diminuent les dépenses énergétiques. Cependant, αMSH et CART sont des neuropeptides qui agissent en inhibant la prise alimentaire et en augmentant les dépenses énergétiques. L'insuline et la leptine sont des hormones circulantes et leurs taux dépendent des réserves adipeuses corporelles. Elles inhibent les neurones AgRP/NPY et stimulent les neurones adjacents POMC/CART. Les niveaux faibles d'insuline et de leptine sont donc prévus pour activer les neurones AgRP/NPY, tout en inhibant les neurones POMC/CART.

d'après Wasan et Looije (2005)

Le noyau arqué intervient également dans le contrôle de la reproduction en particulier via les neurones à kisspeptine (Gottsch et *al.*, 2004) et POMC (Jamali, 1998). Plusieurs études ont démontré que l'injection de la kisspeptine, dans le ventricule latéral provoque la libération des hormones stéroïdiennes chez la souris (Gottsch et *al.*, 2004), chez le rat (Matsui et *al.*, 2004; Navarro et *al.*, 2004; Navarro et *al.*, 2005), chez le mouton (Messager et *al.*, 2005), chez le singe (Shahab *et al.*, 2005; Plant *et al.*, 2006) et également chez l'Homme (Dhillo et *al.*, 2005). Par ailleurs, il a été démontré que les antagonistes de GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) peuvent bloquer la libération des hormones stéroïdiennes induite par les kisspeptines (Gottsch et *al.*, 2004; Irwig et *al.*, 2004; Shahab et *al.*, 2005). Ceci suggère que les kisspeptines semblent agir directement sur les neurones à GnRH pour stimuler la sécrétion de la gonadolibérine (Matsui et *al.*, 2004). Par exemple, les neurones à kisspeptine qui résident dans l'ARC projettent vers la MPOA, où les corps cellulaires des neurones GnRH sont abondants (Canteras et *al.*, 1994; Simonian et *al.*, 1999). Dans l'ARC, les stéroïdes sexuels inhibent l'expression de Kiss-1, ce qui suggère un contrôle de la sécrétion des gonadotrophines par un feedback négatif (Simonneaux & Ancel, 2012) (**Figure 63**). Chez le jerboa « *Jaculus orientalis* », les neuronrs à β-endorphine exercent un effet inhibitoire sur le système neurosécrétoire GnRH surtout en automne (El Ouezzani et *al.*, 2005).

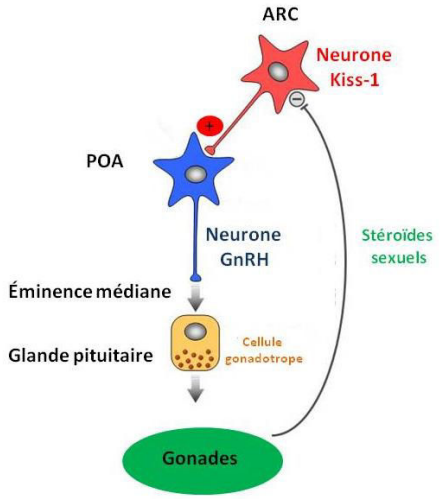

Figure 63 : Contrôle de la reproduction par les neurones Kiss-1 du noyau arqué.

d'après Simonneaux et Ancel (2012)

II. Analyses des données

Les cellules neuronales ont été visualisées en utilisant le microscope Leica DMRB (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France), équipé par une caméra digitale Olympus DP50 (Olympus France, Rungis, France). Les images de coupes de cerveaux ont été prises au grosssisssement X 5 après avoir standardisé tous les paramètres de lumineusité au microscope et à la caméra afin d'assurer un éclairage stable tout au long de la capture des images. Les cellules c-Fos positives ont été comptées dans l'ensemble des noyaux arqués (6-7 coupes/ animal) des hamsters d'Europe en utilisant le logiciel ImageJ sur la base d'une série de sections de cerveau de l'hamster d'Europe colorée au crézyl violet (**Figure 64**). Pour la quantification des cellules c-Fos positives dans l'ARC des rats, nous nous sommes référés à l'atlas du rat (Paxinos & Watson, 2004).

Le nombre des neurones imménoréactifs a été exprimé par animal et par point horaire. Le nombre moyen (± SEM) des neurones exprimant c-Fos a également été représenté. L'analyse statistique des résultats a été assurée en utilisant une ANOVA à un seul facteur suivi par le

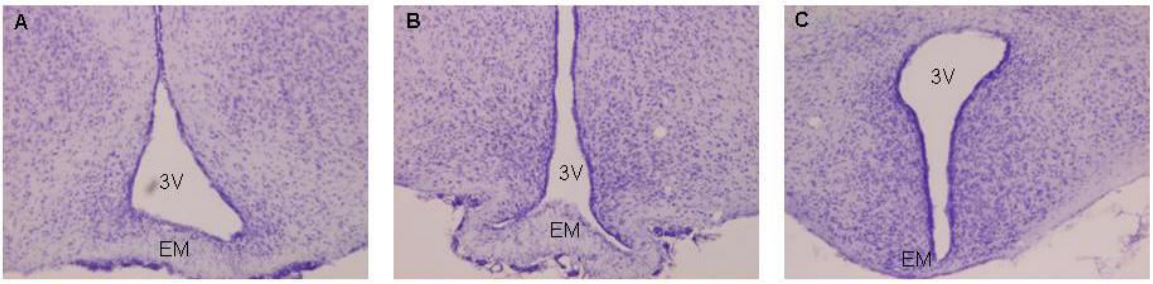

Figure 64 : Coupes frontales de l'hypothalamus de l'hamster d'Europe colorées au crézyl violet.

A : le noyau arqué antérieur, B : le noyau arqué moyen, C : le noyau arqué postérieur. EM : Eminance médiane. 3V : le 3^{éme} ventricule.

test post-hoc de Tukey en utilisant le logiciel STATISTICA 10.0 (StatSoft, France). Un effet est considéré comme significatif si $p \leq 0.05$.

III. Nature de l'expression nocturne de c-Fos dans l'ARC

3.1. Dispositif expérimental

Afin de connaitre la nature de l'expression nocturne de c-Fos dans l'ARC, nous avons étudié sous différentes conditions expérimentales le rythme d'expression de la protéine c-Fos (par immunohistochimie) comme marqueur de l'activité neuronale. Après deux semaines d'adaptation, les rats Wistar utilisés (pour plus de détails voir Matériel et Méthodes) ont été répartis en trois groupes :

Groupe I (groupe témoin) : les animaux ont été maintenus sous un cycle LD 12:12 (l'extinction de la lumière était à 19h00) avec un accès libre à l'eau et à l'alimentation. Après 5 jours sous ces conditions, 4 à 5 rats ont été sacrifiés par point horaire (**Figure 65A**).

Groupe II (groupe à restriction alimentaire) : En gardant les animaux sous la même photopériode artificielle LD 12:12, la prise alimentaire a été imposée exclusivement durant le jour entre ZT4 et ZT10 et ce, pendant 5 jours consécutifs. L'eau a été distribuée *ad libitum*. Au 5^{éme} jour, 4 à 5 animaux ont été sacrifiés par point horaire (**Figure 65B**).

Groupe III (groupe à jeun) : Les animaux ont été exposés à la même photopériode artificielle LD 12:12, avec un accès libre à l'eau et à l'alimentation. Au 5^{éme} jour les animaux ont été mis à jeun (eau *ad libitum*) pendant 24 heures à partir de ZT23, 4 à 5 animaux ont été ensuite sacrifiés par point horaire (**Figure 65C**).

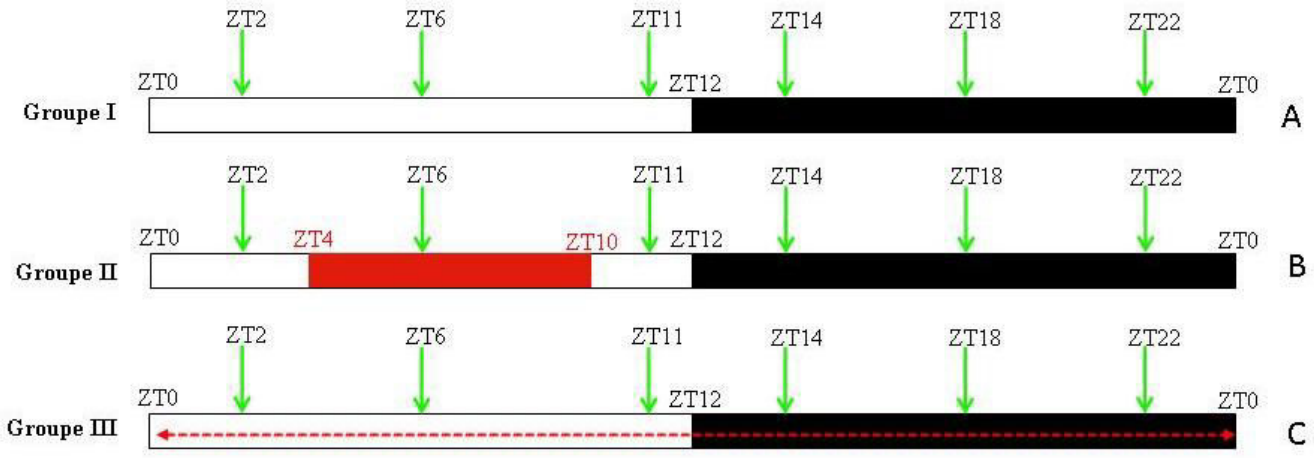

Figure 65 : Les conditions alimentaires et les heures de sacrifices des rats Wistar maintenus sous une photopériode LD 12:12.

A: groupe témoin, B: groupe à restriction alimentaire et C: groupe à jeun. Les flèches vertes indiquent les horaires de sacrifices. Le rectangle rouge indique la période de restriction alimentaire imposée durant le jour entre ZT4 et ZT10 chez le groupe B. La flèche rouge indique la période où les animaux étaient à jeun

3.2. Résultats

Chez le groupe I, les résultats obtenus montrent que sous une photopériode artificielle LD 12:12 et avec un accès libre à la nourriture, un rythme journalier d'expression de la protéine c-Fos dans les neurones de l'ARC existe (**Figure 66A, Figure 67**). Ce résultat confirme donc les observations de Jamali et Tramu (1999) (**Figure 61B**). Ce rythme est maintenu chez le groupe III (à jeun), avec également une forte expression de c-Fos durant la phase obscure. Toutefois, chez le groupe III le pic du rythme apparait à ZT22 plus tardivement que chez le groupe I où il a été noté ZT18 (**Figure 66C, Figure 67**). La persistance du rythme d'expression de c-Fos chez le groupe III en absence du synchroniseur alimentaire, prouve que ce rythme dépend en partie du cycle lumière-obscurité, particulièrement de la phase obscure (**Figure 66C**). Chez le groupe II, deux heures après le début de la prise de nourriture, les neurones de l'ARC montrent une forte immunoréactivité à c-Fos et ce en dehors des périodes normales d'alimentation (**Figure 66B, Figure 67**). Angeles-Castellanos et *al*. (2010) ont démontré une forte expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC à ZT6 correspondant au moment du début de repas. En plus de ce pic corrélé à la prise alimentaire, l'expression nocturne de c-Fos demeure persistante avec un pic noté à ZT18 comme chez le groupe I. Chez le groupe II, les niveaux d'expression de c-Fos est plus élevé par rapport aux autres groupes. Actuellement, on ne peut pas expliquer cette observation. Peut être c'est une conséquence de l'augmentation des glucocorticoides pour anticiper la prise de nourriture journalière.

En combinant ces résultats, nous pouvons désormais comprendre la nature du pic nocturne de c-Fos exprimé par les neurones de l'ARC chez le groupe *ad libitum.* Cette expression nocturne de c-Fos résulte en partie d'un effet direct du cycle lumière-obscurité, plus précisément du signal obscurité et d'un effet indirect lié à la prise alimentaire nocturne.

Après avoir déterminé la nature de ce pic nocturne, il est important de phénotyper les neurones de l'ARC immunopositifs à c-Fos impliqués dans ces deux mécanismes différents. Pour ce faire, nous avons réalisé des doubles immunomarquages par exemple c-Fos/POMC.

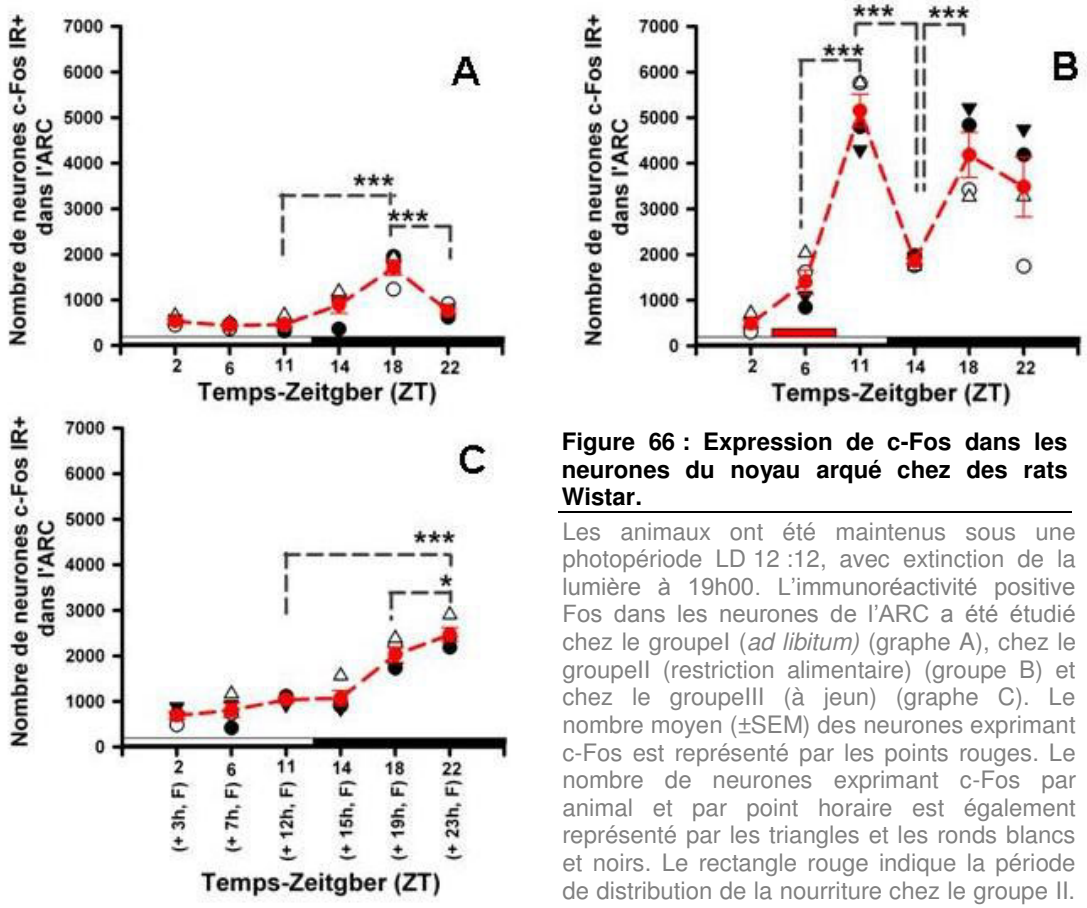

Figure 66 : Expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué chez des rats Wistar.

Les animaux ont été maintenus sous une photopériode LD 12 :12, avec extinction de la lumière à 19h00. L'immunoréactivité positive Fos dans les neurones de l'ARC a été étudié chez le groupeI (*ad libitum)* (graphe A), chez le groupeII (restriction alimentaire) (groupe B) et chez le groupeIII (à jeun) (graphe C). Le nombre moyen (±SEM) des neurones exprimant c-Fos est représenté par les points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par les triangles et les ronds blancs et noirs. Le rectangle rouge indique la période de distribution de la nourriture chez le groupe II. Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD.
* 0.01<p≤0.05, *** p≤ 0.001

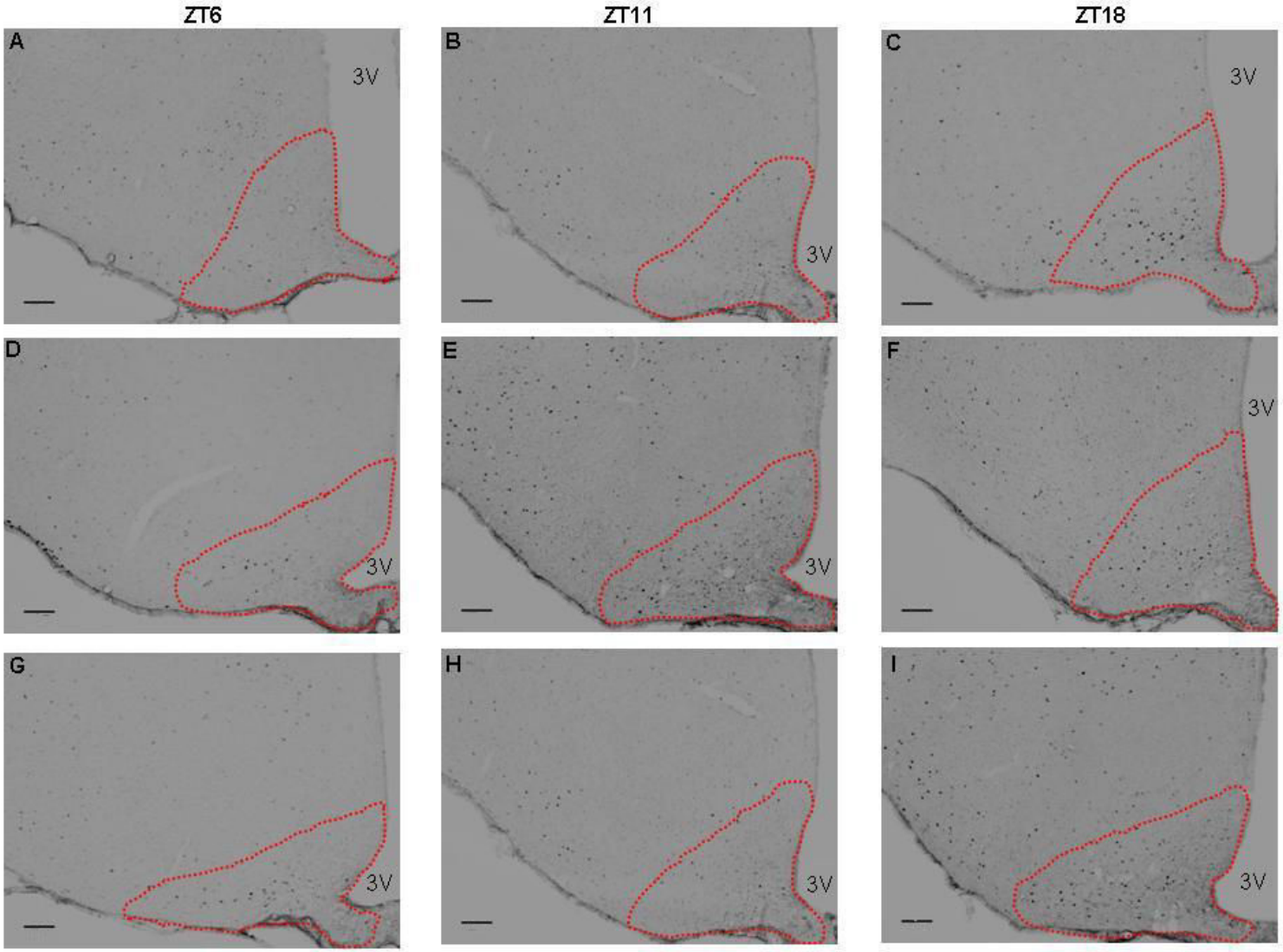

Figure 67 : Visualisation de l'immunoréactivité c-Fos dans les neurones de l'ARC des rats Wistar.

Les animaux ont été maintenus sous une photopériode LD : 12:12, avec extinction de la lumière à 19h00. L'immunoréactivité positive Fos dans les neurones de l'ARC a été visualisée chez le groupe ad libitum (image A, B et C), chez le groupe à restriction alimentaire (image D, E et F) et chez le groupe à jeun (image G, H et I) à ZT6, ZT11 et ZT18. La forme en pointillée rouge délimite la zone du noyau arqué. 3V : le 3éme ventricule. Echelle : 100µm.

Choix du neuropeptide β-endorphine pour les doubles marquages

Le gène *POMC* est connu pour coder un ARNm de 1072 bases dont la traduction abouti à l'expression d'un long précurseur polypeptidique. La maturation de ce précurseur protéique de 241 acides aminés entraine selon le type cellulaire, la production de différentes hormones polypeptidiques telles que l'ACTH (Adrenocorticotropic hormone), la β-endorphine et l'α-MSH. Ces peptides issus du gène *POMC* sont des molécules informatives à large spectre de l'activité biologique. En fonction du site où ils sont produits, les peptides apparentés à la POMC peuvent assurer différentes fonctions. Par exemple, ils jouent un rôle clé dans la régulation de la pression artérielle (Dubinion et *al*., 2013), dans la pigmentation de la peau (Millington, 2006), dans le contrôle de la prise alimentaire,de l'homéostasie énergétique (Pritchard et *al*., 2002) et de la reproduction (Van der Ploeg et *al.*, 2002). C'est pour cette dernière fonction que nous avons choisi la β-endorphine pour phénotyper les neurones immunoreactifs-Fos de l'ARC.

L'immunomarquage double c-Fos/β-endorphine réalisé chez des rats Wistar est présenté dans la **Figure 68.** Sur la base d'une étude ANOVA à une seule variable, l'analyse statistique montre que le nombre de neurones exprimant à la fois c-Fos et β-endorphine dans l'ARC présente une variation statistiquement significative en fonction du ZT ($F_{1,4}$= 24.422, p= 0.008). A ZT18, 17.16% des cellules activées (présence de c-Fos) sont des neurones à β-endorphine, contre 39.35% à ZT 22.

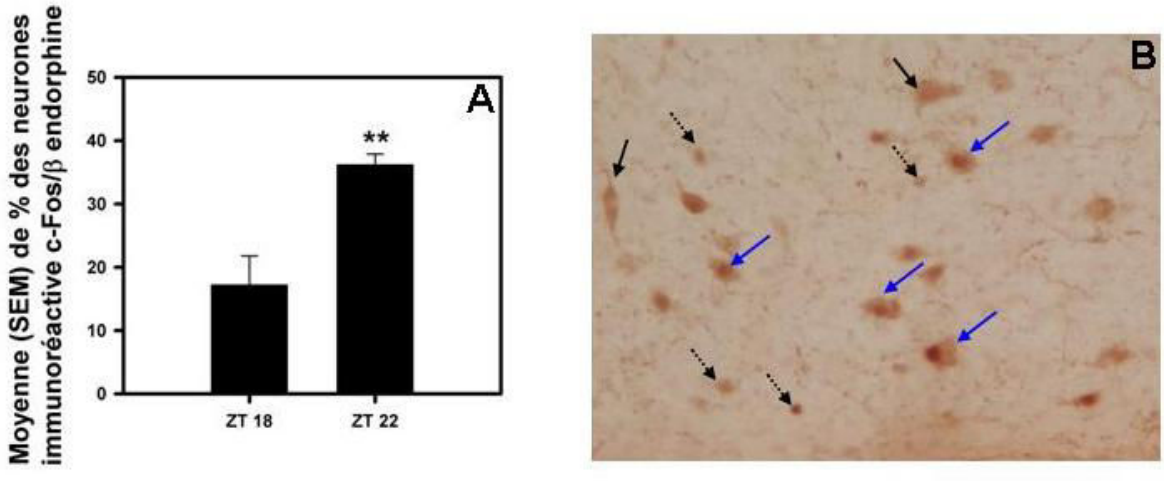

Figure 68 : Co-expression de c-Fos et β-endorphine dans les neurones de l'ARC des rats Wistar

A : Les animaux ont été maintenus sous une photopériode LD : 12 :12, avec extinction de la lumière à 19h00. Le double marquage par immunohistochimie des neurones de l'ARC exprimant c-Fos et β-endorphine chez le groupe ad libitum à ZT18 et ZT 22 a été effectué. B : illustration du double marquage c-Fos/β-endorphine. Les flèches noires indiquent les neurones à β-endorphine, les flèches pointillées montrent les neurones à c-Fos et les flèches bleus montrent les neurones β-endorphine exprimant c-Fos.
** $0.001<p\leq0.01$

Après avoir déterminé la nature de l'expression nocturne de c-Fos dans les neurones de l'ARC chez le rat, nous avons décidé d'aborder notre question chez le hamster d'Europe. Il était tout d'abord nécessaire de vérifier l'existence d'une expression rythmique de la protéine c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe.

IV. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe

4.1. Dispositif expérimental

Afin de vérifier l'existence d'une expression rythmique de c-Fos dans les neurones de l'ARC chez le hamster d'Europe et surtout de voir si la durée de cette expression est corrélée à la durée de la nuit, deux expériences (1 et 2) ont été faites. Des hamsters d'Europe mâles issus de l'élevage de notre laboratoire (Chronobiotron, CNRS-UMS3415, Strasbourg-France) ont été utilisés (voir détails en Matériel et Méthodes, partie hamster d'Europe). Le protocole a été approuvé par la Comité Régionale d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animal de Strasbourg (CREMEAS, N° 00145.01). Toutes les expérimentations ont été menées conformément à la loi nationale française et en accord avec la directive 2010/63/E4 du Conseil Européen.

L'expérience1 : **Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe maintenus sous une photopériode courte (SP) LD 10:14.**

Dans cette expérience, 37 hamsters d'Europe « *Cricetus cricetus* » ont été utilisés. Ces hamsters (**groupe I**) ont été maintenus pendant six mois en LP, LD 16:08 puis transférés le 1er

juillet 2012 en SP (LD 10:14, conditions de l'hiver) (obscurité de 19h à 09h) durant 15 semaines. 4 à 5 animaux ont été sacrifiés par point horaire (**Figure 69A**). La bonne intégration du signal photopériodique (SP) a été vérifiée par l'installation du repos sexuel.

L'expérience 2 : **Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe maintenus sous une photopériode longue (LP) LD 16:08.**

Dans cette expérience 32 hamsters adultes (**groupe II**) ont été utilisés. Ces animaux ont été placés sous une LP, LD 16:08 depuis le 7 janvier 2013 (obscurité de 20h à 4h) pendant 12 semaines. 4 animaux ont été sacrifiés par point horaire (**Figure 69B**). La bonne intégration du signal LP a été vérifiée par l'observation d'une activité sexuelle forte.

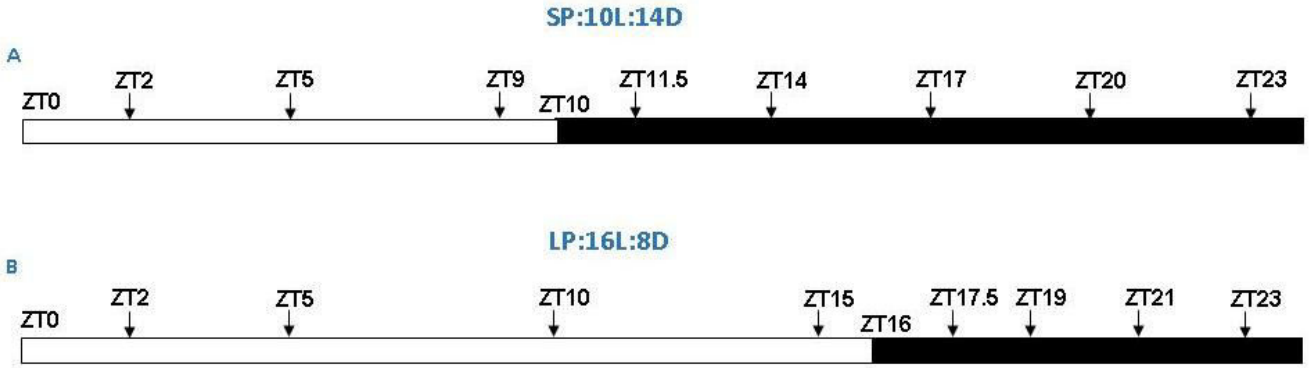

Figure 69 : Les conditions lumineuses et les heures de sacrifices des hamsters d'Europe maintenus sous différentes conditions de photopériode

Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD.

4.2. Résultats

4.2.1. Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe intacts maintenus en SP

Le profil d'expression de la protéine c-Fos (marquée par immunohistochimie) dans les neurones de l'ARC est représenté dans la **Figure 70A**. Les résultats montrent la présence d'un rythme journalier d'expression de c-Fos. Sur la base d'une étude ANOVA à une seule variable, l'analyse statistique montre que le nombre de neurones immunopositifs à c-Fos dans l'ARC présente une variation statistiquement significative en fonction du ZT ($F_{7, 29}$= 3.8116, p= 0.004). Cette expression faible pendant la phase d'éclairement montre une légère augmentation à ZT9 (une heure avant l'extinction de la lumière). Durant la première moitié de la phase obscure, les niveaux d'expression de c-Fos deviennent plus élevés pour culminer à ZT20 (10 heures après l'extinction de la lumière). Le test de comparaison multiple Fisher LSD indique que le nombre de neurones exprimant c-Fos est hautement significatif à ZT20.

Pendant la deuxième moitié de la phase obscure, l'expression diminue progressivement même si le nombre de neurones exprimant c-Fos restent élevé (601.4 ± 81.37 à ZT23). Ce n'est qu'au moment du début de la phase lumineuse que l'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC chute brutalement au cours des 2-5 premières heures après l'exposition à la lumière (entre ZT2 et ZT5). Afin de déterminer la localisation des neurones exprimant une immunoréactivité c-Fos dans l'ARC, une zonation rostro-caudale de ce noyau a été réalisée voir **Figure 64**. Les résultats montrent que la majeure partie des neurones exprimant c-Fos se trouvent dans l'ARC moyen (**Figure 70B**). Pour être certain que ce phénomène soit spécifique à l'ARC, nous avons également quantifié le nombre de neurones exprimant c-Fos dans des structures avoisinantes, en particulier dans le DMH. Les résultats montrent l'absence d'une expression rythmique de cette protéine dans le DMH des hamsters maintenus en SP (**Figure 71**). Cela renforce le rôle clef de l'ARC dans le phénomène étudié.

Nos résultats montrent l'existence d'un rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC chez les hamsters d'Europe maintenus en SP (LD10 :14), avec une forte expression durant la phase nocturne. La plupart des neurones exprimant c-Fos sont localisés dans l'ARC moyen.

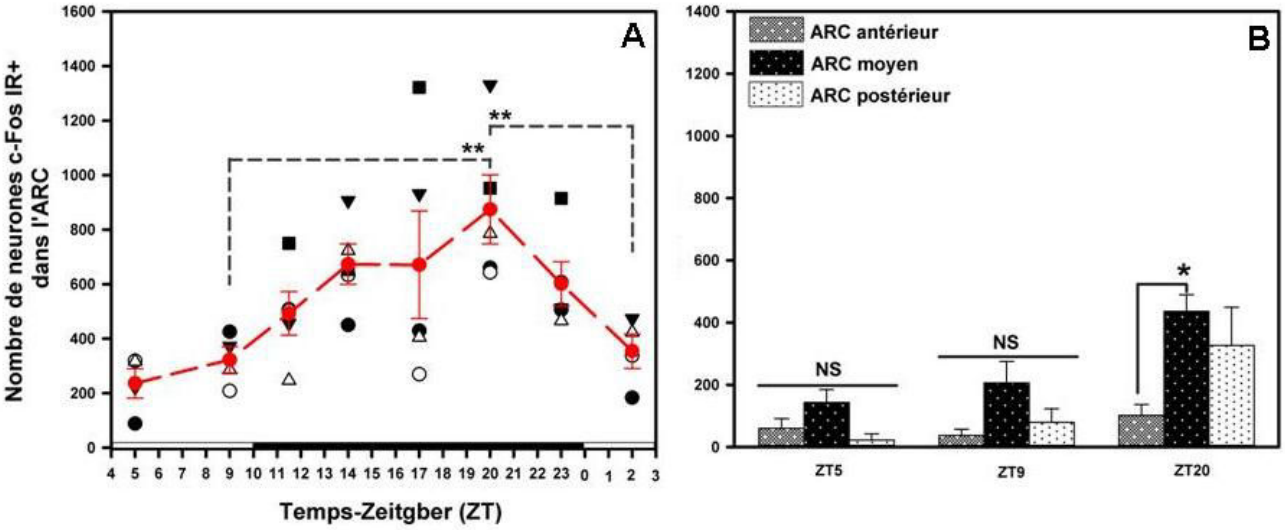

Figure 70 : Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe intacts et maintenus sous une photopériode courte LD 10 :14

A : Le nombre moyen (± SEM) de neurones exprimant c-Fos (marqués par immunohistochimie) dans le noyau arqué est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs) et des carrés (noirs). Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD. B : Le nombre de neurones immunopositifs contre c-Fos dans différentes parties de l'ARC et à différents ZT.
* $0.01<p\leq0.05$, ** $0.001<p\leq0.01$

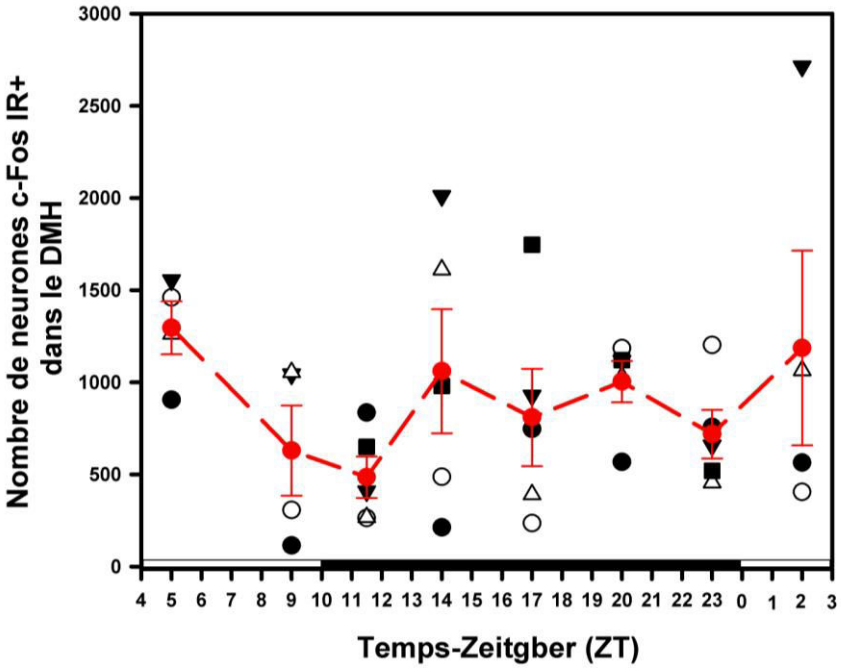

Figure 71 : Expression de c-Fos dans les neurones du DMH chez des hamsters d'Europe maintenus en SP

Le nombre moyen (± SEM) de neurones exprimant c-Fos (marqués par immunohistochimie) dans le DMH est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs) et des carrés (noirs). Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD.

4.2.2. Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe intacts maintenus en LP

Nous avons étudié le rythme d'expression de c-Fos en condition de LP. Le nombre de neurones exprimant une immunoréactivité positive à c-Fos dans l'ARC par animal ainsi que la moyenne (± SEM) en fonction de ZT est représenté dans la (**Figure 72A**). Une ANOVA à un seul facteur (facteur horaire) est effectuée pour déterminer un éventuel effet du temps sur le nombre de neurones exprimant c-Fos. Les niveaux d'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC montrent des variations statistiquement significatives en fonction du ZT ($F_{7, 24}$= 16.408, p= 0.000). Durant la phase d'éclairement les niveaux d'expression de c-Fos sont faibles. Néanmoins, une légère augmentation a été observée une heure avant la fin de cette phase à ZT15. Ce phénomène est important à noter, car comme en SP cette augmentation traduit bien un signal qui vient de l'horloge. Cette augmentation devient plus importante et se prolonge durant la première moitié de la phase obscure pour atteindre son maximum à ZT19, c'est-à-dire 3 heures après l'extinction de la lumière. L'analyse post-hoc (test Fisher LSD) montre que le nombre de neurones exprimant c-Fos dans l'ARC est très hautement significatif à ZT19 ($p \leq 0.001$). Dès lors, l'expression de c-Fos diminue drastiquement entre ZT19 et ZT21 et se maintient à ce niveau pendant le reste de la phase obscure. Avec le début de la phase

d'éclairement, l'expression de c-Fos continue à chuter progressivement. La majorité des neurones exprimant c-Fos sont localisés dans l'ARC moyen (**Figure 72B**).

Les résultats de cette expérience démontrent clairement l'existence d'un rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC chez les hamsters d'Europe maintenus en LP (LD 16:08), avec une forte expression durant la phase nocturne. La plupart des neurones exprimant c-Fos sont localisés dans l'ARC moyen.

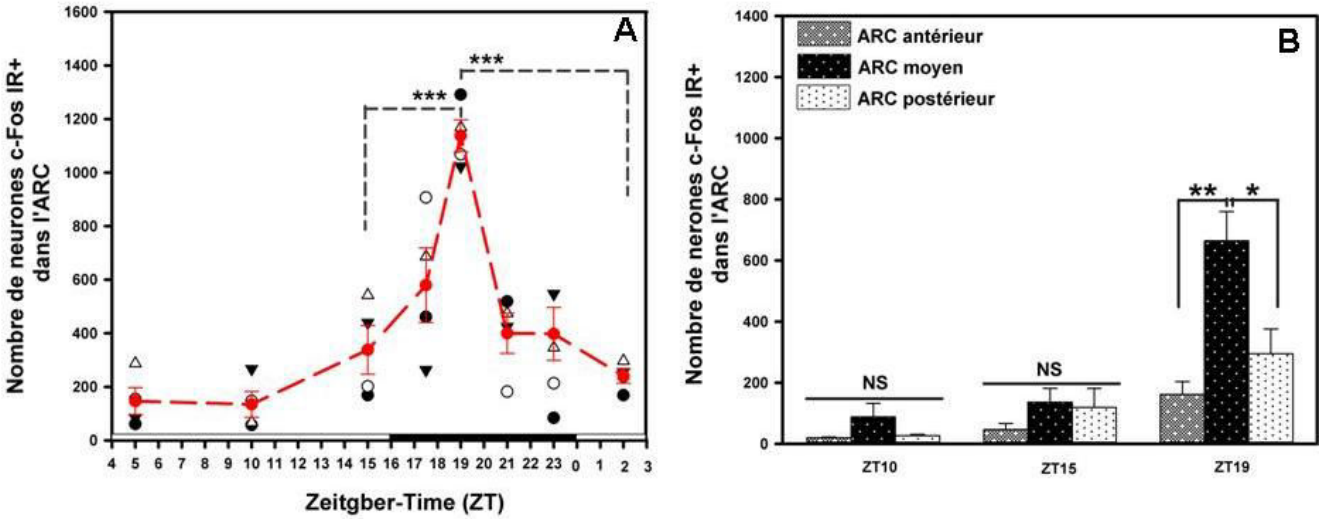

Figure 72 : Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe intacts maintenus sous une photopériode longue : LD 16 :08

A : Le nombre moyen (± SEM) de neurones exprimant c-Fos (marqués par immunohistochimie) dans le noyau arqué est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancd et noird), des ronds (blancd et noird). Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD. B : Le nombre de neurones immunopositifs contre c-Fos dans différentes parties de l'ARC et à différents ZT.
* 0.01<p≤0.05, ** 0.001<p≤0.01, *** p≤0.001

Chez les hamsters d'Europe intacts maintenus en SP ou en LP, la protéine c-Fos s'exprime d'une manière rythmique dans les neurones de l'ARC avec une forte expression durant la phase obscure. La durée d'expression nocturne de c-Fos est-elle corrélée à la durée de la nuit ? Pour répondre à cette question, la courbe représentant le profil d'expression de c-Fos dans l'ARC a été approchée et superposée à la courbe générée par l'équation suivante : f= y0+ (a/ ((1+exp (sl1*(a1-t)))*(1+exp (sl2*(t-a2))))) (**Figure 73A, Figure 73B**), où f est le nombre de neurones immunoréactifs à c-Fos à un point « n » des données réelles, t est le moment de ce point n, y0 est le niveau basal, a est l'amplitude du pic nocturne. a1 est le moment (temps) où la courbe atteint sa demie-montée, a2 est le moment où la courbe atteint sa demie-descente et enfin sl1 et sl2 représentent les pentes de la montée et de la descente. La durée du pic est déterminée comme la différence entre a2 et a1. En SP, la durée du pic nocturne de c-Fos est 11 heures et 34 minutes (a1= 11.9772 et a2= 23.3258). En LP, la durée de ce pic est 2 heures et 17 minutes (a1= 17.9165 et a2= 20.0948). Les résultats montrent que

la durée du pic nocturne de c-Fos dans les neurones de l'ARC varie bien en fonction de la photopériode.

En conclusion, nos résultats démontrent clairement chez les hamsters d'Europe qu'un rythme journalier de la protéine c-Fos est exprimé dans les neurones de l'ARC. Ce rythme est caractérisé par une forte expression durant la phase obscure. La durée d'expression de c-Fos est corrélée à la durée de la nuit. La majorité des neurones impliqués dans cette expression se localisent dans l'ARC moyen.

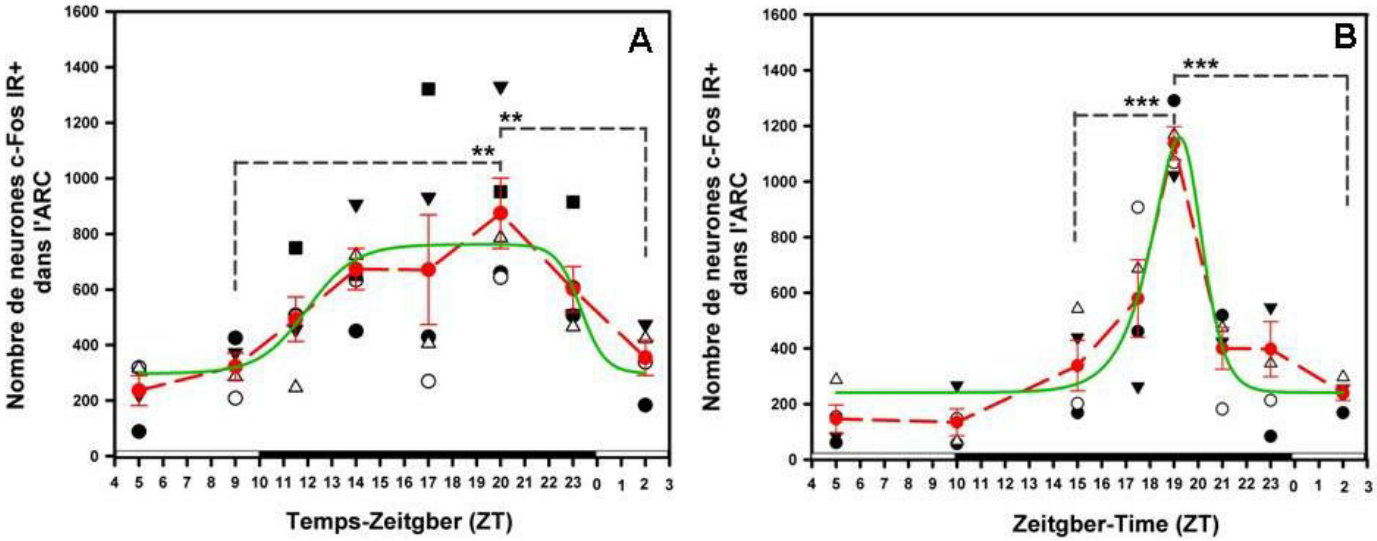

Figure 73 Expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué chez des hamsters d'Europe maintenus en SP et LP

A : En SP, le nombre moyen (± SEM) de neurones, exprimant c-Fos dans l'ARC est représenté par les points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs) et des carrés (noirs). B : En LP, le nombre moyen (± SEM) des neurones exprimant c-Fos dans l'ARC est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs). En A et B, le trait noir en pointillé schématise la longeur du pic nocturne de c-Fos fourni par la courbe logistique. Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD. La ligne verte représente la courbe logistique.
** $0.001<p\leq0.01$, *** $p\leq0.001$

Chez le hamster d'Europe le noyau ARC est donc capable d'intégrer l'information photopériodique courte et longue. Cette capacité dépend-elle de la présence de la mélatonine ?

En s'appuyant sur ces résultats, nous avons planifié deux expériences (expérience 3 et 4) afin de vérifier que la durée d'expression de la protéine c-Fos dans l'ARC est bien dépendante de la longueur de la nuit et en même temps indépendante de la MLT. Pour cela, nous avons travaillé sur des hamsters d'Europe pinéalectomisés. La synchronisation des animaux aux conditions photopériodiques a été vérifiée indirectement par le suivi journalier du rythme circadien de Tb, le suivi continu de l'activité générale de l'animal et le statut reproducteur (en mesurant la taille des testicules).

V. Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe pinéalectomisés

5.1. Dispositif expérimental

Des hamsters d'Europe nés entre le 22 mars et le 16 avril 2013 (120 au total) ont été pinéalectomisés entre le 04 et le 14 juin 2013 (voir détails en Matériel et Méthodes) et ensuite placés dans un environnement photopériodique accéléré (c'est-à-dire un changement annuel de photopériode sur une durée de 6 mois) à partir du 19 juin 2013, en adoptant le protocole de Monecke *et al.,* (2013) qui permet d'obtenir deux cycles annuels en un an. Le protocole a été approuvé par le Comité Régionale d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animal de Strasbourg (CREMEAS, N° 00145.01). Toutes les expérimentations ont été menées conformément à la loi nationale française et en accord avec la directive 2010/63/E4 du Conseil Européen.

L'expérience 3 : **Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe (*Cricetus cricetus*) pinéalectomisés et maintenus sous une photopériode accélérée courte (aSP).**

Cette expérience a été réalisée sur 32 hamsters d'Europe préalablement pinéalectomisés (**groupe III**). Après 3 mois d'exposition en SP (conditions de l'hiver), 4 animaux ont été sacrifiés par point horaire (**Figure 74A**). La bonne intégration de la photopériode a été vérifiée sur le plan physiologique (suivi de l'activité locomotrice, la taille des testicules et la température corporelle).

L'expérience 4 : **Expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe (*Cricetus cricetus*) pinéalectomisés et maintenus sous une photopériode accélérée longue (aLP)**

Des hamsters d'Europe pinéalectomisés (32 au total) (**groupe IV**), ont été utilisés dans cette expérience. A la fin de la période d'augmentation de la longueur des jours aLP (conditions d'été), 4 animaux ont été sacrifiés par point horaire (**Figure 74B**). La bonne intégration de la photopériode a été vérifiée sur le plan physiologique (suivi de l'activité locomotrice, la taille des testicules et la température corporelle).

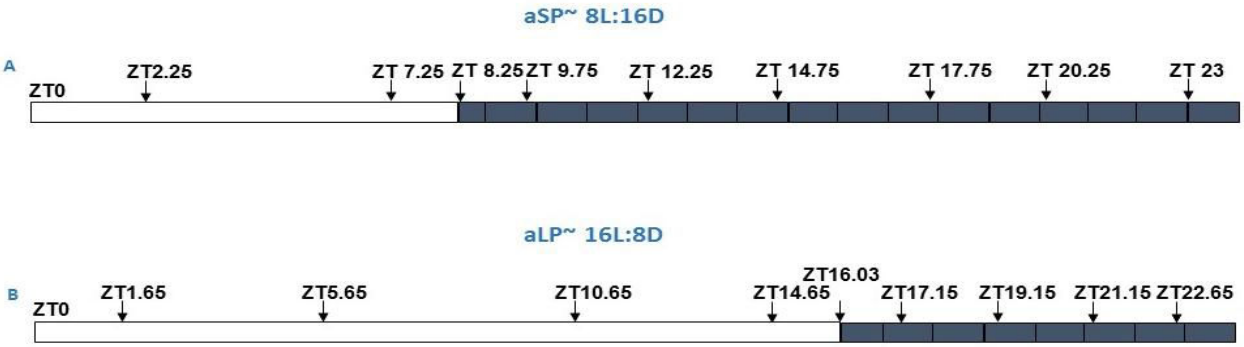

Figure 74 Les conditions lumineuses et les heures de sacrifices des hamsters d'Europe maintenus sous différentes conditions de photopériode

A : Les hamsters d'Europe préalablement pinéalectomisés, maintenus sous une photopériode accélérée courte ~ 8L : 16D (Obscurité 17h30 à 09h15).
B : D'autres hamsters d'Europe pinéalectomisés maintenus sous une photopériode accélérée longue ~ 16L : 8D (Obscurité 20h23 à 04h21).

5.2. Résultats

5.2.1. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en photopériode accélérée courte

Chez les hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus dans un environnement photopériodique accéléré SP, un rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC est présent (**Figure 75A**). Cette expression rythmique similaire à celle trouvée chez les hamsters d'Europe intacts et maintenus en SP, demeure élevée durant la phase obscure et corrélée à la durée de la nuit. L'ANOVA à un seul facteur (facteur horaire) montre que l'expression de c-Fos dans l'ARC présente des variations statistiquement significatives en fonction du ZT ($F_{7, 24}$= 10.549, p= 0.00001). Durant la phase d'éclairement, les niveaux d'expression de c-Fos sont faibles. Toutefois, le nombre de neurones immunopositifs à c-Fos augmente progressivement pendant la première partie de la phase obscure. Le maximum d'expression de la protéine c-Fos a été noté à ZT14.75, c'est-à-dire 6 heures et 30 minutes après l'extinction de la lumière. L'analyse post-hoc (test Fisher LSD) montre que le nombre de neurones exprimant c-Fos dans l'ARC est très hautement significatif à ZT14.75 ($p \leq 0.001$). Par la suite, le nombre de neurones immunoreactifs à c-Fos entame une descente graduelle et continue entre ZT17.75 et ZT20.25 pour se maintenir à ce faible niveau pendant le reste de la phase obscure. Avec le début de la phase d'éclairement, l'expression de c-Fos continue a chuté progressivement. Afin de déterminer la localisation de neurones immunopositifs à c-Fos dans l'ARC, une zonation de ce noyau a été réalisée. Les résultats montrent que la majeure partie des neurones exprimant c-Fos se trouvent dans l'ARC moyen (**Figure 75B**).

Nos résultats montrent l'existence d'un rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC chez le hamster d'Europe pinéalectomisé, avec une forte expression durant la phase nocturne. La plupart des neurones exprimant c-Fos sont localisés dans l'ARC moyen. Le rythme d'expression de c-Fos est donc indépendant de la mélatonine.

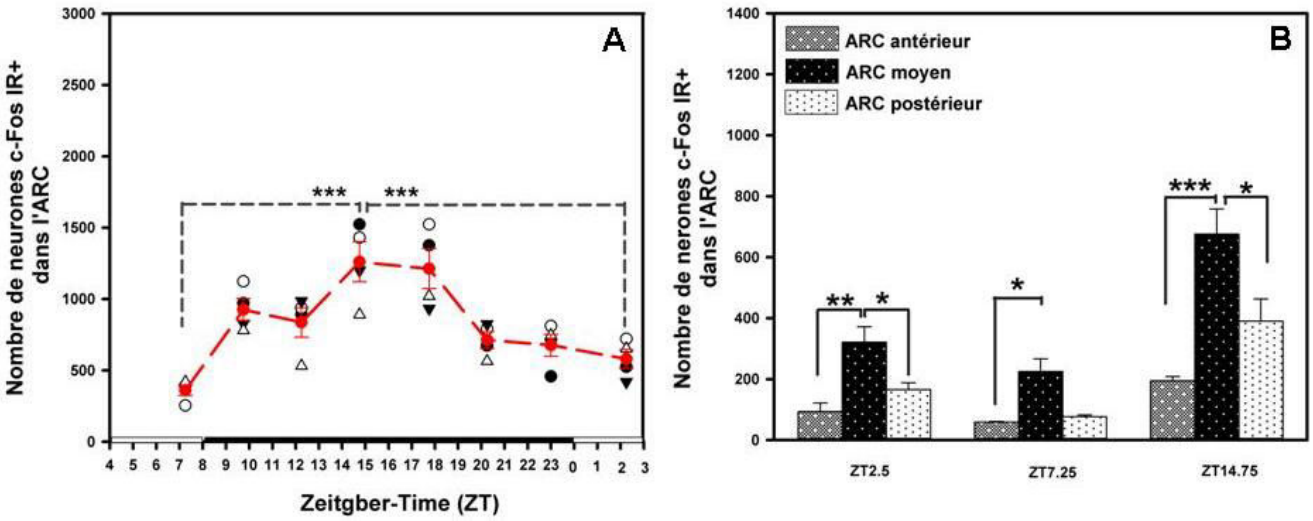

Figure 75 : Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus sous une courte photopériode accélérée

A : Le nombre moyen (± SEM) de neurones exprimant c-Fos (marqués par immunohistochimie) dans le noyau arqué est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs). Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD. B : Le nombre de neurones immunopositifs-Fos dans différentes parties de l'ARC et à différents ZT.
* 0.01<p≤0.05, ** 0.001<p≤0.01, *** p≤0.001

5.2.2. Expression de c-Fos dans les noyaux arqués des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en photopériode accélérée longue.

L'expression de c-Fos dans l'ARC des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en LP est représenté dans la **Figure 76A**. L'analyse de la variance indique que le nombre de neurones montrant une immunoréactivité c-Fos varie significativement en fonction du ZT ($F_{7, 24}$= 4.9705, p= 0.00139). Dans ces conditions expérimentales, l'expression de c-Fos dans l'ARC est rythmique avec un grand nombre de neurones immunopositifs-Fos durant la phase obscure. Ce rythme d'expression de c-Fos se caractérise par un pic qui survient à ZT 21.15, c'est-à-dire 5 heures après l'extinction de la lumière. L'analyse post-hoc (test Fisher LSD) montre que le nombre de neurones exprimant c-Fos est hautement significatif à ZT21.15 (0.001< p ≤0.01). Cette expression de c-Fos est maintenue élevée jusqu'à ZT22.65 avant de commencer à chuter progressivement vers la fin de la phase obscure. La majorité des neurones exprimant c-Fos sont localisés dans l'ARC moyen (**Figure 76B**).

Les résultats de cette expérience démontrent l'existence d'un rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones de l'ARC chez le hamster d'Europe pinéalectomisé et maintenu en photopériode longue, avec forte expression durant la phase nocturne. La plupart des neurones exprimant c-Fos sont localisés dans l'ARC moyen. Dans ces conditions de LP, ce rythme de c-Fos est donc indépendant de la mélatonine.

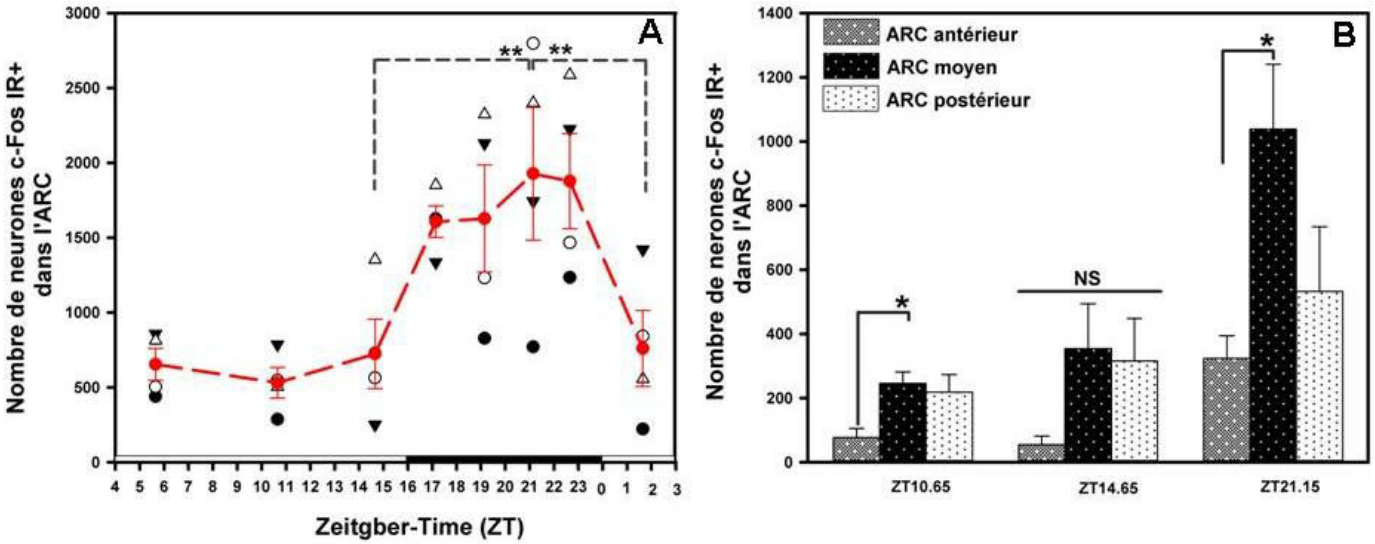

Figure 76 Rythme journalier d'expression de c-Fos dans les neurones des noyaux arqués chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus sous une photopériode accélérée longue

A : Le nombre moyen (± SEM) de neurones exprimant c-Fos (marqués par immunohistochimie) dans le noyau arqué est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs). Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD. B : Le nombre de neurones immunopositifs-Fos dans différentes parties de l'ARC et à différents ZT.
* $0.01<p\leq0.05$, ** $0.001<p\leq0.01$

Nos résultats démontrent, que la protéine c-Fos est exprimée d'une manière rythmique dans les neurones de l'ARC chez le hamster d'Europe pinéalectomisé et maintenu soit en SP ou en LP (régime photopériodique accéléré). Le nombre de neurones immunopositifs-Fos est très élevé durant la phase obscure. Cette expression nocturne de c-Fos est-elle corrélée à la durée de la nuit ? Nous avons déterminé la durée du pic nocturne de c-Fos en utilisant la même équation appliquée sur les données obtenus chez les hamsters maintenus en SP et en LP. La courbe logistique montrent qu'en SP, la durée du pic nocturne de c-Fos est 9 heures et 42 minutes (a1=10.3337 et a2= 19.7588). En LP, la durée ce pic est 8 heures 8 heures et 6 minutes (a1=16.1587 et a2= 24.7938). Nos résultats montrent que la durée du pic nocturne de c-Fos dans les neurones de l'ARC des hamsters pinéalectomisés est corrélée à la durée de la nuit (**Figure 77A, Figure 77B**).

En comparant les résultats obtenus chez les hamsters d'Europe intacts avec ceux des hamsters pinéalectomisés, nous constatons que dans les deux conditions SP et LP les neurones de l'ARC présentent une expression rythmique de c-Fos, caractérisée par un pique nocturne

qui est dépendant au longeur de la nuit. Nos résulats permettent donc de conclure que l'ARC est capable d'intégrer le signal photopériodique indépendamment de la présence de la MLT.

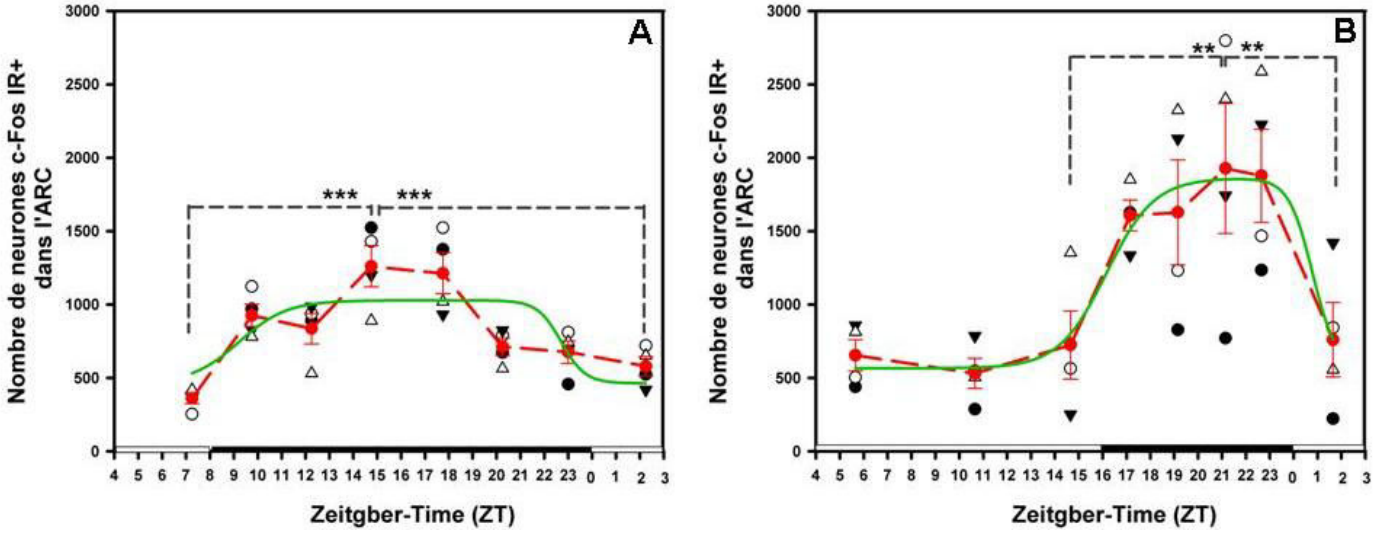

Figure 77 Expression de c-Fos dans les neurones du noyau arqué chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés et maintenus en SP et LP

A : En SP, le nombre moyen (± SEM) de neurones, exprimant c-Fos dans l'ARC est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blancs et noirs), des ronds (blancs et noirs). B : En LP, le nombre moyen (± SEM) des neurones exprimant c-Fos dans l'ARC est représenté par des points rouges. Le nombre de neurones exprimant c-Fos par animal et par point horaire est également représenté par des triangles (blanc et noir), des ronds (blancs et noirs). Dans A et B, le trait noir en pointillé schématise la longeur du pic nocturne de c-Fos fourni par la courbe logistique. Les barres noires et blanches indiquent respectivement la phase obscure et lumineuse du cycle LD. La ligne verte représente la courbe logistique.
** 0.001<p≤0.01, *** p≤0.001

VI. Discussion

Dans ce travail, nous avons identifié une voie indépendante du signal mélatoninergique capable d'intégrer le signal photopériodique. Reste à savoir si ce message construit dans les noyaux arqués a un rôle physiologique ?

Les mammifères mesurent les changements photopériodiques *via* une voie neuroendocrine. Cette voie reliant la rétine à la glande pinéale tout en passant par l'horloge centrale, transforme le signal photique en un rythme circadien de sécrétion de la MLT. Le signal mélatoninergique, qui suit exclusivement l'environnement lumineux, donne ainsi une perception précise du temps (Perreau-Lenz et *al*., 2004b). En effet, la durée de sa sécrétion est corrélée à la longueur de la nuit, qui change au cours de l'année. (Pévet, 2003b). Des travaux récents de notre laboratoire (INCI-UPR 3212 CNRS) (Monecke et *al.*, 2013) démontrent que le signal photopériodique peut être aussi intégré même en absence de la MLT, ce qui jusqu'ici était inconcevable. En effet, chez la majorité des hamsters d'Europe pinéalectomisés, le rythme de Tb, l'activité locomotrice, le poids corporel et le cycle circannuel de reproduction

ont été entrainés par le régime instauré de photopériode accélérée. Ceci démontre que la MLT n'est pas indispensable pour la mesure de la photopériode. Cette découverte soulève un certain nombre de questions sur l'intégration du signal photopériodique et par conséquent de l'adaptation de l'être vivant à son biotope. Comment cet animal saisonnier, le hamster d'Europe adapté au froid, est-il capable d'intégrer le signal photopériodique en absence de la MLT ? Plusieurs études établissent clairement que le signal photopériodique est construit au niveau des SCN (Menet et *al*., 2003; Tournier et *al*., 2003; Tournier et *al*., 2009) et que l'absence de la MLT endogène (après l'ablation de la glande pinéale) n'empêche pas l'intégration de ce signal dans cette structure (Jacob et *al*., 1997). En outre, Jamali et Tramu (1999) ont démontré chez des rats Wistar qu'un rythme journalier de la protéine c-Fos est exprimé dans les neurones de l'hypothalamus médio-basal. Ce rythme de c-Fos est caractérisé par une forte expression durant la phase obscure. La durée d'expression de c-Fos est corrélée à la durée de la nuit même chez des animaux pinéalectomisés. Les travaux de Jamali et Tramu (1999) prouvent que cette expression rythmique de c-Fos dans l'hypothalamus médio-basal est de nature endogène et indépendante de la présence de la MLT. Chez le rat, le message photopériodique agit sur les neurones de l'hypothalamus médio-basal. Puisque cet animal n'est pas saisonnier, il est difficile d'utiliser ce modèle pour comprendre l'utilité de l'intégration de ce message photopériodique dans le contôle des fonctions physiologiques. Nous avons donc conçu ces expériences chez le hamster d'Europe car c'est un modèle saisonnier et puisque le récent travail de Monecke *et al.,* (2013) démontre chez cet animal que le signal photopériodique peut être intégré d'une façon indépendante de la MLT et que la photopériode est capable d'entrainer des rythmes physiologiques saisonniers comme la reproduction. En se basant sur les résultats de Jamali et Tramu (1999) et (Jamali, 1998), démontrant l'existence d'un paramètre qui s'exprime d'une manière photopériodiquement-dépendante (la protéine c-Fos) dans une structure impliquée dans le contrôle des fonctions saisonnières (hypothalamus médio-basal), nous avons choisi les noyaux arqués pour essayer de comprendre les mécanismes impliqués dans l'intégration du signal photopériodique chez le hamster d'Europe (indépendament de la présence de MLT).

Même si jusqu'aujourd'hui il était communément admis que la lecture de la photopériode se fait via le rythme de MLT, nos résultats montrant que l'expression rythmique de c-Fos dans l'ARC persiste chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés (absence de la mélatonine) prouvent que le mécanisme de lecture de la photopériode est plus complexe. Le fait que la durée d'expression nocturne de c-Fos dans les neurones de l'ARC est corrélée à la durée de la nuit, incite à réfléchir sur le rôle de cette structure hypothalamique dans l'intégration des

signaux photopériodiques. Cette spécificité des neurones du noyau ARC dans ce processus est renforcée par l'absence d'un rythme d'expression de c-Fos dans d'autres structures avoisinantes tels que le DMH.

Chez les hamsters intacts maintenus en SP et en LP, l'amplitude du rythme d'expression de c-Fos est faible en comparaison avec les profils d'expression de cette protéine chez les hamsters pinéalectomisés (absence de la MLT). Ceci suggère que la MLT a probablement un rôle modulateur.

Sachant que différentes populations neuronales (e.g. NPY, AgRP, POMC et Kiss) impliquées dans le contrôle de la reproduction, l'homéostasie énergétique (prise alimentaire, poids corporel..) sont présentes dans les noyaux arqués, nous avons envisagé un phénotypage des neurones exprimant c-Fos surtout que nous avons trouvé chez les rats wistar que 40% des neurones actifs dans l'ARC sont des neurones à β-endorphine en ZT22. Par manque du temps et difficulté de technique, nous n'avons pas pu poursuivre dans cette direction mais cela ouvre de grandes perspectives.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

L'intégrité fonctionnelle des organismes vivants, Homme y compris dépend de mécanismes spécifiques de synchronisation anticipant les modifications périodiques et prédictibles de l'environnement. Ces mécanismes fonctionnels appliqués depuis les bases moléculaires jusqu'aux fonctions physiologiques les plus complexes sont connus sous le mot de rythmes biologiques. Au sein du même organisme, ces rythmes présentent une relation de phase caractéristique. La perturbation des rythmes biologiques dûe aux conditions de vie du monde moderne (le travail posté, le voyage transméridian « *jet-lag* », etc) ou des circonstances naturelles (par exemple le vieillissement), peut favoriser l'installation de pathologies spécifiques (troubles du sommeil, perturbations métaboliques tels que l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer, etc) (*pour revue* Pévet (2014)). De nos jours, l'importance de la rythmicité circadienne pour la santé de l'Homme et son bien-être est bien reconnue. Ceci sollicite la communauté scientifique pour l'élaboration des stratégies pointues pour traiter, prévenir et retarder l'apparition de ces troubles. Jusqu'ici la majorité des recherches expérimentales sur les rythmes sont menées principalement dans les pays nordiques et notamment sur des rongeurs nocturnes (rat, hamster, souris…). Étant donné que l'Homme est un mammifère diurne, l'utilisation des résultats obtenus chez les animaux nocturnes pour comprendre son fonctionnement physiologique ou encore leurs utilisation dans des approches biomédicales présente des limites. La conception des projets expérimentaux sur des modèles d'animaux diurnes et des modèles d'animaux vivants dans des biotopes particuliers où l'Homme est présent (zone désertique) présente un intérêt pour le développement des connaissances scientifiques et les approches biomédicales. Les travaux présentés dans cette thèse constitue une suite logique d'un projet de recherche entrepris en coopération entre l'Unité d'Anatomie Comparée de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (URAC-N°49, CNRST) de Rabat (Maroc) et l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (UPR 3212, CNRS-Université de Strasbourg) Strasbourg, (France). Ce projet de recherche s'articulait autour de l'adaptation physiologique des animaux désertiques aux conditions hostiles de l'environnement. Les résultats obtenus à travers cette coopération vont contribuer au développement de la recherche fondamentale particulièrement dans le domaine de la neurobiologie des adaptations à l'environnement. En outre, les données obtenues auront un impact direct sur la gestion et l'amélioration de l'élevage camelin au Maroc, qui figure parmi les grands axes d'action du plan ***Maroc Vert***.

Dans les zones arides et désertiques, les êtres vivants sont exposés à des conditions environnementales extrêmes. Dans ce contexte en plus des changements photopériodique, la Ta présente des variations très importantes aussi bien à l'échelle journalière que saisonnière. Ceci nous a incités à étudier l'effet des fluctuations cycliques de la Ta sur la synchronisation des rythmes circadiens chez le dromadaire.

Les résultats du travail original d'El Allali et *al*. (2013) démontrent clairement que le rythme journalier de Tb chez le dromadaire, persiste sous les conditions constantes de température et de photopériode (LL et DD) avec une période proche de 24-h. Ceci démontre que chez le dromadaire comme chez les autres mammifères, le rythme de Tb est un rythme circadien généré par une horloge biologique centrale. Toutefois dans le milieu naturel, les rythmes circadiens chez la plupart des êtres vivants ne sont pas en libre cours. Les variations cycliques d'un facteur environnemental (synchroniseur) sont capables d'entrainer l'horloge en modulant la période du rythme biologique pour devenir égale à celle du synchroniseur. Chez les mammifères, le cycle lumière-obscurité est connu pour être le synchroniseur le plus puissant (Yamazaki et *al.*, 2000), *pour revue* Golombek et Rosenstein, (2010). Chez le dromadaire, El Allali et *al* (2013) ont démontré que le rythme de Tb est un rythme circadien généré par l'horloge biologique endogène et synchronisé exactement à 24-h par le cycle lumière-obscurité (entrainement photique). Par conséquent, le rythme de Tb peut être considéré comme une sortie de l'horloge centrale. La question majeure est : cette sortie est elle suffisante pour étudier les propriétés circadiennes de l'horloge centrale ?

En plus des variations photopériodiques, le dromadaire est exposé à des changements environnementaux très importants, notamment la température ambiante. Dans son biotope, les cycles de Ta sont caractérisés par des grandes variations d'amplitude aussi bien sur le plan journalier que saisonnier. Ceci incite une réflexion sur le rôle du cycle journalier de la Ta comme facteur d'entrainement possible pour l'horloge circadienne du dromadaire. Le travail d'El Allali et *al* (2013) démontre qu'en absence du cycle LD, le cycle de Ta impose sa propre période au rythme de Tb. Par conséquent, le cycle journalier de Ta est apparemment un synchroniseur capable d'entrainer l'horloge centrale à sa propre période. Connaissant la complexité du système de thermorégulation chez le dromadaire, cette conclusion n'est pas définitive puisqu'il peut s'agir simplement d'une réponse passive sous forme de transfert de chaleur avec l'environnement et pas un véritable entrainement de l'horloge. Afin de confirmer cette conclusion, le suivi en parallèle d'une autre sortie de l'horloge connue pour être indépendante de la Ta est indispensable par exemple le rythme de la MLT. Les résultats de l'article d'El Allali et *al* (2013) montrent qu'en photopériode constante (condition de DD), le

cycle de Ta est capable d'entrainer le rythme de la MLT et le rythme de Tb. Ceci démontre que le cycle journalier de Ta est un véritable *zeitgeber* de l'horloge circadienne, du moins en absence du cycle lumière-obscurité. Cette étude semble être la première démonstration du cycle journalier de Ta comme un facteur synchroniseur chez un mammifère. Désormais, il est nécessaire de considérer la température ambiante comme un candidat possible pour la synchronisation saisonnière notamment de la fonction de reproduction. Chez le dromadaire, le rôle synchroniseur du cycle lumière-obscurité et le cycle de Ta a été démontré séparément (El Allali et *al*., 2013). Toutefois, dans la nature, on assiste à l'interaction de plusieurs facteurs synchroniseurs en même temps. Par conséquent, il est important de comprendre les effets simultanés des synchroniseurs de l'horloge (par exemple : le cycle lumière-obscurité et le cycle de température ambiante) sur les sorties de l'horloge exemple Tb et de MLT. Le travail d'El Allali et *al*., 2013 démontre chez le dromadaire qu'en présence du cycle LD, le cycle de Ta entraine le rythme de Tb mais pas celui de MLT à l'exception chez 3 chamelles sur 7. Ceci met le doigt sur les limites de l'utilisation de certains paramètres pour étudier le fonctionnement de l'horloge centrale, puisque ces paramètres peuvent être eux-mêmes dépendants des variations des paramètres environnementaux. Le suivi en parallèle de plusieurs sorties de l'horloge pour étudier les mécanismes circadiens devrait désormais s'imposer à tous, spécialement aux cliniciens.

Le dromadaire est un animal du désert qui est soumis dans son biotope à des grandes variations de Ta. Sous des Ta très élevées et selon la disponibilité de l'eau de boisson, le système de thermorégulation chez le dromadaire oscille entre l'homéothermie et la poïkilothermie. Le rythme de Tb chez ce mammifère est généré par l'horloge circadienne d'une part et d'autre part c'est la réponse d'une régulation thermique. Ces deux composantes (circadienne et thermorégulatrice) sont contrôlées par les cycles journaliers de Ta. De là, il est primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans l'entrainement de l'horloge circadienne par les cycles journaliers de Ta. Pour cela, il serait nécessaire d'étudier le fonctionnement de l'horloge circadienne sous des états d'hétérothermie tout en suivant deux sorties de l'horloge à savoir le rythme de Tb et le rythme de MLT. Ceci nous permettrait de comprendre le fonctionnement du système circadien sous des états d'hétérothermie. En fonction des saisons, la température ambiante comme la photopériode montre des changements saisonniers, caractérisés par des variations de la durée de la phase chaude (ou froide). La question est de vérifier si ces variations saisonnières du cycle de température ambiante sont capables comme les variations photopériodiques d'induire des modifications saisonnières sur le rythme de MLT et/ou de Tb. Pour répondre à cette question, nous devrons

étudier expérimentalement les variations de la durée de secrétions de la MLT et le rythme de Tb (deux sorties de l'horloge biologique) en fonction des variations de la durée de la phase chaude (ou froide) du cycle de la Ta chez des chamelles placées en DD et parfaitement hydratées. Ceci va nous permettre de démonter si la durée du cycle de Ta est capable d'entrainer des changements de la durée du pic nocturne de la mélatonine. Par la suite, il est nécessaire de vérifier si les variations saisonnières de la Ta pourraient affecter différement le rythme de MLT et de Tb chez des animaux en état d'hétérothermie.

Toutefois avant d'entamer cette partie de projet, il s'est avéré nécessaire de commencer tout d'abord par la vérification de l'existence d'une hétérothermie adaptative chez le dromadaire d'autant plus cet état d'hétérothermie avait été contesté par une autre équipe de chercheur (Al Haidary, 2005).

Nos résultats montrent que lors d'une pénurie hydrique prolongée et sous des Ta très élevées, le dromadaire s'adapte à ces conditions rudes et contraignantes en adoptant un état d'hétérothermie (Bouâouda et *al*., 2014). Ce résultat était rapporté précédemment par de nombreuses équipes de recherches qui travaillent indépendamment les uns aux autres (Schmidt-Nielsen *et al.*, 1957; Dahlborn *et al.*, 1987; Schroter *et al.*, 1989; Zine-Filali, 1991; Ayoub & Saleh, 1998; Bengoumi & Faye, 2002). Grâce à l'utilisation des iButtons® pour l'enregistrement continu de la Tb sans aucune manipulation de l'animal, nous avons démontré et ce pour la première fois l'existence d'une régulation complexe de thermorégulation avec alternance quotidienne de phase de poïkilothermie et d'homéothermie chez le dromadaire privé d'eau de boisson et sujet à un stress thermique. Cette remarquable plasticité du système de thermorégulation chez cet animal semblerait le résultat d'un cycle journalier de Tb entrainée par le cycle de Ta et par la disponibilité de l'eau de boisson. Précédemment, nous avons démontré que le rythme journalier de Tb est un rythme circadien généré par une horloge endogène (El Allali et *al*., 2013). En se basant sur ce résultat, probablement cette plasticité complexe du système de thermorégulation observée chez le dromadaire privé d'eau de boisson et placé sous de hautes Ta est de nature circadienne. Cette interprétation reste toutefois qu'une hypothèse. Sa validation nécessitera des études prolongées sur des dromadaires gardés dans des conditions constantes de photopériode. Dans son biotope, le dromadaire est souvent confronté à de longues périodes de pénurie hydrique, donc il est necessaire avant d'aller plus loin de comprendre le fonctionnement du système circadien sous un état de déshydratation.

Le rythme de Tb est l'une des sorties de l'horloge principale capable de distribuer des signaux puissants pour la synchronisation des oscillateurs périphériques (Brown et *al*., 2002;

Buhr et *al*., 2010). Nos résultats démontrent que la déshydratation provoque un retard de phase de pic du rythme Tb par rapport au cycle lumière-obscurité (Bouâouda et *al*., 2014). Ce retard de phase n'est pas observé quand les dromadaires ont subi une restriction alimentaire. Ce dernier résultat montre que la déshydratation pourrait agir sur le fonctionnement de l'horloge circadienne. Ceci reste a démontré clairement par l'analyse des gènes horloges par exemple. Ce retard de phase de la température corporelle pourrait engendrer un état de désynchronisation interne entre différentes fonctions dans l'organisme. Le rôle de ce « retard de phase » dans les mécanismes d'adaptation aux conditions désertiques reste à comprendre.

Selon la disponibilité de l'eau de boisson et la Ta de son environnement immédiat, le dromadaire adopte une régulation complexe de thermorégulation caractérisée par une alternance quotidienne de phase de poïkilothermie et d'homéothermie. Ceci est un moyen d'adaptation vital pour ce mammifère. Cet état d'hétérothermie adaptative a également été observé chez d'autres espèces notamment les antilopes (Al Johany *et al.*, 1998; Ostrowski *et al.*, 2003; Ostrowski & Williams, 2006), chèvres (Mengistu et al., 2007) et récemment chez l'éléphant asiatique (Weissenbock et *al*., 2012). Cette hétérothermie semble être un processus d'adaptation spécifique aux animaux vivants dans le milieu désertique ou semi-désertique. L'Homme fait partie aussi des êtres vivants occupant ces zones arides en s'accommandant aux conditions environnementales extrêmes. Par conséquent, il est nécessaire de comprendre les mécanismes physiologiques d'adaptation, spécialement la composante rythmique et/ou circadienne puisqu'elle est proposée comme un moyen pour s'adapter aux changements environnementaux extrêmes.

Les dromadaires privés d'eau de boisson et placés dans un environnement à Ta élevée, réduisent également leur prise de nourriture. Cette observation a également été notée dans d'autres études similaires menées chez le dromadaire (Bengoumi, 1992; Ayoub & Saleh, 1998; Al Haidary, 2005). Toutefois cette réduction de la prise de nourriture, spécialement son effet sur l'apparition d'un état d'hétérothermie n'était pas étudié auparavant. Dans le présent travail les chamelles déshydratés et placés dans un environnement à haute Ta, réduisent progressivement leur prise de nourriture. Alors que, la réhydratation a permis une reprise rapide et immédiate de la prise de la ration alimentaire (Bouâouda et *al*., 2014). En se basant sur ce résultat obtenu, nous avons essayé de comprendre si cette diminution progressive de la prise alimentaire durant la phase de déshydratation intervient dans l'instauration du processus d'hétérothermie adaptative chez le dromadaire et si ce phénomène pourrait avoir un effet sur la phase du rythme de Tb par rapport au cycle lumière-obscurité. Les résultats de l'expérience 2 montrent clairement que la diminution de la prise alimentaire imposée à des chamelles

parfaitement hydratées et maintenues sous un stress thermique provoque une augmentation de l'amplitude du rythme de Tb. Par conséquent, la diminution de la prise de la nourriture résultante de la privation hydrique et ou de la Ta élevée est probablement impliquée dans le processus d'installation d'un état d'hétérothermie adaptative chez le dromadaire déshydraté et maintenu sous en stress thermique. Ceci ouvre la discussion sur le rôle respectif de la diminution progressive de la prise alimentaire et de la privation hydrique dans l'apparition d'un état d'hétérothermie. Il est difficile de répondre globalement à cette question, mais nous pouvions au moins étudier l'effet de la restriction alimentaire seul sur le rythme de Tb. Toutefois, pratiquement il est impossible de dissocier la privation hydrique de la diminution progressive de la prise alimentaire. D'une manière générale, nos résultats démontrent clairement que ces deux facteurs externes (la privation hydrique et la prise alimentaire) sont impliqués dans le processus d'hétérothermie adaptative probablement par différents mécanismes agissant à divers niveaux. Ceci est en faveur avec le déphasage du pic du rythme de Tb observé chez les dromadaires déshydratés n'est pas décelable chez les chamelles sujets à une restriction alimentaire imposée. De là nous pouvons conclure que l'hétérothermie adaptative chez le dromadaire est donc une combinaison de plusieurs facteurs qui interagissent le long du cycle lumière-obscurité, à savoir la Ta élevée, la privation hydrique et la prise alimentaire. De nombreux travaux seraient nécessaires pour comprendre complètement ces processus d'adaptation.

L'indisponibilité brutale des dromadaires ne nous a pas permis de continuer nos travaux dans la direction programmée, nous avons donc réorienté notre sujet de thèse pour étudier dans d'autres conditions environnementales extrêmes (grand froid de l'hivers) les mécanismes particulières impliqués dans la synchronisation du système circadien et saisonnier. Nous avons abordé spécifiquement chez le hamster d'Europe « *Cricetus cricetus* » l'étude des mécanismes physiologiques non-classiques du système de mesure de temps. En plus des mécanismes physiologiques classiques d'intégration du signal photopériodique, les travaux de Monecke et *al.,* 2013 démontrent que les hamsters d'Europe pinéalectomisés sont capables d'exprimer les rythmes circannuels de reproduction, de la masse corporelle, de la température corporelle et de l'activité locomotrice comme chez les hamsters intacts. Le signal photopériodique peut donc être intégré d'une façon indépendante de la MLT, ce qui jusqu'ici était inconcevable. Des travaux ultérieurs (Jamali, 1998; Jamali & Tramu, 1999) réalisés chez le rat Wistar ont également démontré que le message photopériodique agit sur les neurones de l'hypothalamus médio-basal particulièrement sur les neurones à POMC. Toutefois, la fonctionnalité de ce système non-classique de mesure de temps chez le rat n'a jamais était

démontré. Chez les hamsters d'Europe pinéalectomisés, les fonctions physiologiques en particulier la reproduction sont entrainées. Ceci nous a incités à identifier une (ou des) structure (s) dans le cerveau qui serait (seraient) capable (s) de traduire l'information sur la durée de la période d'éclairement et ensuite de la distribuer même en absence de la MLT.

En utilisant l'immunoréactivité-c-Fos comme marqueur d'activité cellulaire nous avons démontré clairement chez les hamsters d'Europe maintenus en SP et LP qu'un rythme journalier de c-Fos est exprimé dans les neurones de l'ARC. Ce rythme est caractérisé par une forte expression durant la phase obscure. La durée d'expression de c-Fos est corrélée à la durée de la nuit. Nos résultats démontrent clairement que chez le hamster d'Europe le noyau ARC est capable d'intégrer l'information photopériodique courte et longue. Nous avons ensuite cherché à savoir si cette capacité de l'ARC à intérgré le signal photopériodique est liée ou pas à la présence de la mélatonine. Nos résultats montrant que l'expression rythmique de c-Fos dans l'ARC persiste chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés (absence de la mélatonine), prouvent que le mécanisme de lecture de la photopériode est très complexe de ce qui est communément admis. Le fait que la durée d'expression nocturne de c-Fos dans les neurones de l'ARC est corrélée à la durée de la nuit, pose la question de son rôle.

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que les neurones des noyaux arqués sont impliqués dans l'intégration du signal photopériodique (même en absence de la MLT). Les noyaux arqués sont ils ensuite capables d'entrainer les fonctions physiologiques circannuelles, entre autres la reproduction et si oui par quels mécanismes ? Sachant que différentes populations neuronales (e.g. NPY, AgRP, POMC et Kiss) impliquées dans le contrôle de la reproduction, l'homéostasie énergétique (prise alimentaire, poids corporel...) sont présentes dans les noyaux arqués, il est tout d'abord nécessaire de phénotyper les neurones exprimant c-Fos surtout que nous avons trouvé chez les rats wistar que 40% des neurones actifs dans l'ARC sont des neurones à β-endorphine en ZT22. Identifier ces neurones est un élement clef pour comprendre comment le noyau ARC est capable d'intéger le signal photopériodique, mais il reste à comprendre comment les noyaux arqués entrainnent les fonctions physiologiques saisonnières (reproduction, poids corporel, activité locomotrice…). Chez des hamsters d'Europe pinéalectomisés, la réalisation des immunohistochimies-double c-Fos/POMC et des hybridations in situ pour NPY sans oublier les kisspeptines est indispensable. En 2013, à l'occasion du 39ème colloque de la Scociète de Neuroendocrinologie qui a eu lieu à Fès-Maroc, dans un abstract intitulé « β-endorphin influence on kisspeptin neurones of the ewes under long day or short day photoperiodic treatment » de Dufourny et ses collaborateurs ont démontré chez la brebis qu'en SP un grand

nombre de fibres à β-endorphine dans l'ARC projettent sur les neurones à kisspeptine. Ce résultat nous conforte dans nos persepectives, car il permet d'expliquer le rôle de ces neurones de l'ARC dans l'entrainement des fonctions physiologiques saisonnières en particulier la reproduction. Il est nécessaire de vérifier ce résultat chez le hamster d'Europe (**Figure 78**).

Probablement le signal photopériodique est transmis indirectement via des projections rétiniennes vers les noyaux arqués en passant par les SCN. Il est donc important de vérifier chez le hamster d'Europe l'existence des intercations entre les noyaux arqués, connus pour être le site principal d'intégration de l'information métabolique et les SCN, prouvés pour être l'horloge biologique principale. Chez le rat, Guzman-Ruiz et *al*.(2014) ont démontré que les SCN ont la capacité de contôler l'activité des neurones α-MSH de l'ARC probablement par stimulation et/ou inhibition selon le moment du cycle circadien, via des projections neuronales directes. En injectant la toxine cholérique B dans les SCN, Guzman-Ruiz et ses collaborateurs.(2014) ont révélé que les terminisons des neurones à VIP et des neurones à GRP sont en position étroite avec les corps cellulaires des neurones α-MSH dans l'ARC. La lésion des SCN supprime complétement toutes les innervations VIP dans l'ARC, ce qui suggère que toutes les terminisons VIP dans l'ARC sont dérivées des SCN Guzman-Ruiz et *al*.(2014). Toutefois, la lésion des SCN provoque une diminution des terminisons de GRP dans l'ARC mais pas une complète disparaition comme le cas du VIP. Ceci suggère que les fibres de GRP provenant d'autres sources que les SCN peuvent affecter les noyaux arqués (Guzman-Ruiz et *al*., 2014). D'autres études sur le rôle de la GRP dans l'ARC ont montré que les peptides bombesin (homologue de la GRP et la noromédine B) augmentent l'activité des neurones NPY et POMC (Lin & Pan, 1994; Van den Pol *et al.*, 2009). Ceci suggère que les neurones GRP provenant des SCN peuvent activer les neurones α-MSH dans l'ARC. Toutefois, les neurones VIP et GRP dans les SCN sont activés par la lumière (Castel *et al.*, 1997; Guillaumond *et al.*, 2007; Francl *et al.*, 2010), condition dans laquelle les neurones α-MSH dans l'ARC sont inhibés (Guzman-Ruiz et *al*., 2014). Dans les SCN, l'ARNm du VIP et du GRP ont été trouvés plus élevés la nuit que le jour durant un cycle LD (Stopa et *al*., 1988) ce qui suggère que les neurones VIP et GRP pourraient être responsable de l'inhibition de l'activité des neurones α-MSH dans l'ARC notée pendant le début du jour subjectif (Guzman-Ruiz et *al*., 2014). Ceci rejoint le résultat indiquant que les neurones à VIP inhibent les neurones dopaminergiques dans l'ARC (Gerhold et *al*., 2002). Via des expériences de lésions bilatérales et/ou unilatérales des SCN et le suivi de l'activité des neurones de l'ARC (POMC et NPY), il serait nécessaire de vérifier l'existence des interactions entre les neurones

des SCN et ceux des noyaux arqués chez le hamster d'Europe (**Figure 78**). Également, des injections dans les SCN avec le traceur neuronal, la toxine cholérique B par exemple, pourraient determiner si les neurones de l'ARC, précisement POMC et NPY, reçoivent des projections directes des SCN chez le hamster d'Europe.

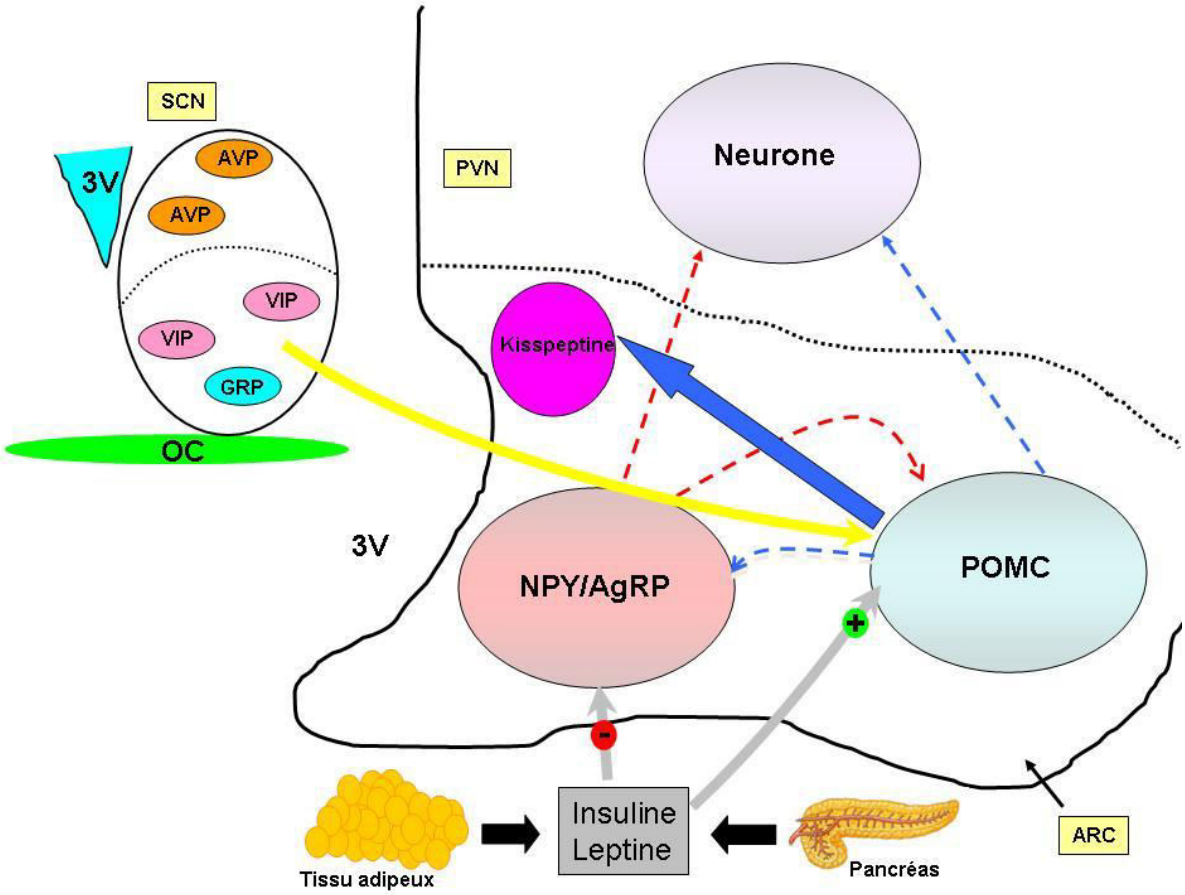

Figure 78 Schématisation des voies proposées pour l'intégration du signal photopériodique dans les neurones du noyau arqué afin de contrôler certaines fonctions physiologiques saisonnières toute en passant par les SCN

OC : chiasma optique ; 3V : 3éme ventricule ; SCN : noyaux suprachiasmatique ; VIP : vasoactive intestinal peptide ; GRP : gastrin releasing peptide ; AVP : vasopressine PVN : noyau paraventriculaire ; ARC : POMC : Pro-Opio-Mélanocortine ; NPY : neuropeptude Y; AgRP : Agouti Related Protein.
Les fibres à β-endorphine dans l'ARC projettent sur les neurones à kisspeptine chez le mouton (flèche beu), Dufourny et al. (Data non publié).
Intérations entre les neurones des SCN (VIP et GRP) et ceux des noyaux arqués (POMC) (flèche jaune), (Guzman-Ruiz et *al.*, 2014)

En conclusion notre travail de thèse sur le hamster d'Europe est la suite logique des travaux de Masson-Pévet, M. et ses collaborateurs (1994b) et récemment de Monecke, *et al.,* (2013). Par la présente thèse de doctorat nous avons démontré chez le hamster d'Europe que les neurones des noyaux arqués sont capables d'intégrer le signal photopériodique et cela indépendamment de la présence de la mélatonine, afin d'entrainer plusieurs fonctions physiologiques saisonnières entre autres la reproduction. Ce mécanisme particulier est-il spécifique au hamster d'Europe ou aux quelques rongeurs des régions nordiques ou bien existe-t-il chez d'autres mammifères en particulier ceux qui vivent dans des biotopes difficiles où les variations environnementales sont multiples et de grandes amplitudes (e.g. le dromadaire). Les travaux de Jamali et Tramu (1999) démontrant chez le rat Wistar que l'immunoréactivité c-Fos dans l'hypothalamus médio-basal est corrélée à la durée de la nuit et ne dépend pas de la mélatonine endogène, semblent renforncer notre suggestion sur la vérification de l'existence de ce mécanisme particulier d'intégration de la photopériode dans les neurones de l'ARC chez d'autres mammifères.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdoun, K.A., Samara, E.M., Okab, A.B. & Al-Haidary, A.A. (2012) Regional and circadian variations of sweating rate and body surface temperature in camels (Camelus dromedarius). *Anim Sci J*, 83, 556-561.

Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y. (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res*, 916, 172-191.

Achaaban, M.R. (1998) Fluid balance and its central hormonal control in the dromedary camel (*camelus dromedarius*). *PhD Thesis Imperial College, London University, UK*.

Achaaban, M.R., Forsling, M.L., Ouhsine, A. & Schroter, R.C. (1992) Plasma AVP and water balance in camels subjected to dehydration and rehydration in hot dry and hot humid environments. *Proc 1st Int Camel Conf UAE*, 297-299.

Adolph, E.F. & Dill, D.B. (1938) Observations on water metabolism in the desrt. *Am J Physiol*, 123, 369-378.

Akashi, M. & Takumi, T. (2005) The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 441-448.

Al Haidary, A. (2005) Effect of dehydration on Core Body Temperature of Young Arabian Camels (Camelus dromedarius). *J. King Saud Univ. Agric.Sci.*, 18, 1-7.

Al Johany, A., Al Toum, M. & Nader, I. (1998) Effect of tempertaure and water deprivation on body temperature in Idemi Gazelle, *Gazella gazella*. *Saudi J Bio Sci*, 5, 24-32.

Albers, H.E., Liou, S.Y., Stopa, E.G. & Zoeller, R.T. (1991) Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J Neurosci*, 11, 846-851.

Alvarez-Salas, E., Aceves, C., Anguiano, B., Uribe, R.M., Garcia-Luna, C., Sanchez, E. & de Gortari, P. (2012) Food-restricted and dehydrated-induced anorexic rats present differential TRH expression in anterior and caudal PVN. Role of type 2 deiodinase and pyroglutamyl aminopeptidase II. *Endocrinology*, 153, 4067-4076.

Angeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R., Rodriguez, K., Buijs, R.M. & Escobar, C. (2010) The suprachiasmatic nucleus participates in food entrainment: a lesion study. *Neuroscience*, 165, 115-1126.

Antoch, M.P., Song, E.J., Chang, A.M., Vitaterna, M.H., Zhao, Y., Wilsbacher, L.D., Sangoram, A.M., King, D.P., Pinto, L.H. & Takahashi, J.S. (1997) Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, 89, 655-667.

Arendt, J. (2005) Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms*, 20, 291-303.

Arendt, J. & Skene, D.J. (2005) Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*, 9, 25-39.

Arendt, J., Skene, D.J., Middleton, B., Lockley, S.W. & Deacon, S. (1997) Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness. *J Biol Rhythms*, 12, 604-617.

Aschoff, J., Gerecke, U. & Wever, R. (1967) Desynchronization of human circadian rhythms. *Jap J Physiol*, 17, 450-457.

Aschoff, J. & Tokura, H. (1986) Circadian activity rhythms in squirrel monkeys: entrainment by temperature cycles. *J Biol Rhythms*, 1, 91-99.

Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J. & Herzog, E.D. (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, 8, 476-483.

Axelrod, J. (1983) Regulation of circadian rhythms of indolamines in the pineal gland. *In The pineal gland and its endocrine role. Eds: Axelrod J; Fraschini F and Velo GP, Plenum Press, New-York*, 1-13.

Axelrod, J. & Weissbach, H. (1961) Purification and properties of hydroxyindole-O-methyl transferase. *J Biol Chem*, 236, 211-213.

Ayoub, M.A. & Saleh, A.A. (1998) A comparative physiological study between camels and goats during water deprivation. *In Proceedings of the 3rd Annual Meeting for Animal Production under Arid Conditions*, 1, 71-87.

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

Balemans, M.G. (1979) Indole metabolism in the pineal gland of the rat; some regulatory aspects. *Prog Brain Res*, 52, 221-229.

Baler, R., Covington, S. & Klein, D.C. (1997) The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem*, 272, 6979-6985.

Balsalobre, A. (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, 309, 193-199.

Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93, 929-937.

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

Bartell, P.A., Miranda-Anaya, M. & Menaker, M. (2004) Period and phase control in a multioscillatory circadian system (Iguana iguana). *J Biol Rhythms*, 19, 47-57.

Bartness, T.J. & Goldman, B.D. (1989) Mammalian pineal melatonin: a

clock for all seasons. *Experientia*, 45, 939-945.

Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L. & Goldman, B.D. (1993) The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res*, 15, 161-190.

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

Bartsch, H., Buchberger, A., Franz, H., Bartsch, C., Maidonis, I., Mecke, D. & Bayer, E. (2000) Effect of melatonin and pineal extracts on human ovarian and mammary tumor cells in a chemosensitivity assay. *Life Sci*, 67, 2953-2960.

Bengoumi, M. (1992) Biochimie clinique du Dromadaire et mécanismes de son adaotation à la déshydratation *Thèse Doct Sciences Agronomiques. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, MAROC*, 184.

Bengoumi, M. & Faye, B. (2002) Adaptation du dromadaire à la déshydratation. *Science et changements planétaires/ Sécheresse*, 13, 121-129.

Bengoumi, M., Riad, F., Giry, J., de la Farge, F., Safwate, A., Davicco, M.J. & Barlet, J.P. (1993) Hormonal control of water and sodium in plasma and urine of camels during dehydration and rehydration. *Gen Comp Endocrinol*, 89, 378-386.

Benstaali, C., Mailloux, A., Bogdan, A., Auzeby, A. & Touitou, Y. (2001) Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle. *Life Sci*, 68, 2645-2656.

Berson, D.M. (2003) Strange vision: ganglion cells as circadian photoreceptors. *Trends Neurosci*, 26, 314-320.

Bewick, G.A., Dhillo, W.S., Darch, S.J., Murphy, K.G., Gardiner, J.V., Jethwa, P.H., Kong, W.M., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2005) Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and agouti-related protein (AgRP) neurons coexpress the NOP1 receptor and nociceptin alters CART and AgRP release. *Endocrinology*, 146, 3526-3534.

Bicego, K.C., Barros, R.C. & Branco, L.G. (2007) Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147, 616-639.

Bittman, E.L. (1984) Melatonin and photoperiodic time measurement. Evidence from rodents and ruminants. *In The pineal gland. Ed: Reiter RJ, Raven Press, New-York*, 155-192.

Bittman, E.L., Dempsey, R.J. & Karsch, F.J. (1983a) Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology*, 113, 2276-2283.

Bittman, E.L., Karsch, F.J. & Hopkins, J.W. (1983b) Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding

and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 113, 329-336.

Block, C.H., Santos, R.A., Brosnihan, K.B. & Ferrario, C.M. (1988) Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. *Peptides*, 9, 1395-1401.

Boenisch, T. (2001) Immunochemical staining Methods. *In staining Methods (Handbook of mmunochemical staining Methods), Eds: Boenisch, Dako corporation carpinteria, CA, USA.*, 26-31.

Boissin, J. & Canguilhem, B. (1988) Les rythmes circannuels chez les mammifères (Circannual rhythms in mammals). *Arch Int Physiol Biochim*, 96, 289-345.

Boissin, J. & Canguilhem, B. (1998) Les rythmes du vivant, origine et contrôle des rythmes biologiques. *Nathan, ed. (Paris, France)*, 320.

Bonnet, P. (1998) Dromadaires et chameaux, animaux laitiers *Actes du colloque, Noakchott, Mauritanie, 24-26 octobre 1994.*, 304.

Borjigin, J., Wang, M.M. & Snyder, S.H. (1995) Diurnal variation in mRNA encoding serotonin N-acetyltransferase in pineal gland. *Nature*, 378, 783-785.

Bosler, O. (1989) Ultrastructural relationships of serotonin and GABA terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. Evidence for a close interconnection between the two afferent systems. *J Neurocytol*, 18, 105-113.

Bosler, O. & Beaudet, A. (1985) VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol*, 14, 749-763.

Bouâouda, H., Achaaban, M.R., Ouassat, M., Oukassou, M., Piro, M., Challet, E., El Allali, A. & Pévet, P. (2014) Daily regulation of body temperature rhythm in the camel (*Camelus dromedarius*) exposed to experimental desert conditions. *Physiological Reports*.

Boué, A. (1949) Essai de barymetrie chez le dromadaire nord-africain. *Revue Elev Med Vet Pays Trop*, 3, 13-16.

Broberger, C., Visser, T.J., Kuhar, M.J. & Hokfelt, T. (1999) Neuropeptide Y innervation and neuropeptide-Y-Y1-receptor-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of the mouse. *Neuroendocrinology*, 70, 295-305.

Bronson, F.H. & Heidaran, P.D. (1994) Seasonal regulation of reproduction in mammals. *In The physiology of reproduction. Knobil, E. and Neill, J.D. (Eds). New York: Raven Press*, 541-583.

Brown, S.A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N. & Schibler, U. (2002) Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol*, 12, 1574-1583.

Buhr, E.D., Yoo, S.H. & Takahashi, J.S. (2010) Temperature as a universal resetting cue for

mammalian circadian oscillators. *Science*, 330, 379-385.

Buijs, R.M. (1996) The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res*, 111, 229-240.

Buijs, R.M. & Kalsbeek, A. (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*, 2, 521-526.

Buijs, R.M., Pevet, P., Masson-Pevet, M., Pool, C.W., de Vries, G.J., Canguilhem, B. & Vivien-Roels, B. (1986) Seasonal variation in vasopressin innervation in the brain of the European hamster (Cricetus cricetus). *Brain Res*, 371, 193-196.

Buijs, R.M., Scheer, F.A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V.D. & Kalsbeek, A. (2006) Organization of circadian functions: interaction with the body. *Prog Brain Res*, 153, 341-360.

Bünning, E. (1936) Die endonome Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reakation. *Berichte der Deutchen Botanischen Gesllschaft*, 54, 590-607.

Canguilhem, B., Vaultier, J.P., Pevet, P., Coumaros, G., Masson-Pevet, M. & Bentz, I. (1988) Photoperiodic regulation of body mass, food intake, hibernation, and reproduction in intact and castrated male European hamsters, Cricetus cricetus. *J Comp Physiol A*, 163, 549-557.

Canguilhem, B., Vivien-Roels, B., Demeinex, B., Miro, J.L., Masson-Pevet, M. & Pévet, P. (1986) Seasonal and endogenous variations of plasma testosterone, thyroxine and triidothyronine in the European hamster. *In Endocrine Rgulations as Adaptive Mechanisms to the Environment,. Assenmacher, I. and Boissin, J. (Eds.), CNRS, Paris.*, 291-295.

Canteras, N.S., Simerly, R.B. & Swanson, L.W. (1994) Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, 348, 41-79.

Card, J.P., Fitzpatrick-McElligott, S., Gozes, I. & Baldino, F., Jr. (1988) Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res*, 252, 307-315.

Card, J.P. & Moore, R.Y. (1984) The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience*, 13, 415-431.

Card, J.P. & Moore, R.Y. (1988) Neuropeptide Y localization in the rat suprachiasmatic nucleus and periventricular hypothalamus. *Neurosci Lett*, 88, 241-246.

Card, J.P. & Moore, R.Y. (1989) Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol*, 284, 135-147.

Cardinali, D.P. & Pévet, P. (1998) Basic aspects of melatonin action. *Sleep Med Rev*, 2, 175-190.

Cassone, V.M. (1998) Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiol Int*, 15, 457-473.

Cassone, V.M., Roberts, M.H. & Moore, R.Y. (1987) Melatonin inhibits metabolic activity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett*, 81, 29-34.

Cassone, V.M., Roberts, M.H. & Moore, R.Y. (1988) Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-14C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. *Am J Physiol*, 255, R332-337.

Castel, M., Belenky, M., Cohen, S., Wagner, S. & Schwartz, W.J. (1997) Light-induced c-Fos expression in the mouse suprachiasmatic nucleus: immunoelectron microscopy reveals co-localization in multiple cell types. *Eur J Neurosci*, 9, 1950-1960.

Challet, C. (2010) Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J comp Physiol B*, 180, 631-644.

Challet, E. (2007) [Clock genes, circadian rhythms and food intake]. *Pathol Biol (Paris)*, 55, 176-177.

Challet, E. & Pevet, P. (2003) Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front Biosci*, 8, s246-257.

Challet, E., Pevet, P. & Malan, A. (1996) Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neurosci Lett*, 216, 214-218.

Challet, E., Pevet, P. & Malan, A. (1997) Lesion of the serotonergic terminals in the suprachiasmatic nuclei limits the phase advance of body temperature rhythm in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms*, 12, 235-244.

Challet, E., Scarbrough, K., Penev, P.D. & Turek, F.W. (1998) Roles of suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflets in mediating the phase-shifting effects of a serotonergic agonist and their photic modulation during subjective day. *J Biol Rhythms*, 13, 410-421.

Chandrasena, L.G., Emmanuel, B. & Gilanpour, H. (1979a) A comparative study of glucose metabolism between the camel (Camelus dromedarius) and the sheep (Ovis aries). *Comp Biochem Physiol* 62A, 837-840.

Chandrasena, L.G., Emmanuel, B., Hamar, D.W. & Howard, B.R. (1979b) A comparative study of ketone body metabolism between the camel (Camelus dromedarius) and the sheep (Ovis aries). *Comp Biochem Physiol B*, 64, 109-112.

Chemineau, P., Malpaux, B., Pelletier, J., Lebouef, B., Delgadillo, J.A., Deletang, F., Pobel, T. & Brice, G. (1996) Emploi des implants de mélatonine et des traitements photopériodiques pour maîtriser la reproduction saisonnière chez les ovins et les caprins *INRA Prod Anim*, 9, 45-60.

Chen, B.X. & Yuen, Z.X. (1979) Reproductive pattern of the Bacterian camel. . *In The Camelid. An All Prupose Animal, 1. Ed: Cockrill, W.R. Scandinavian Institute Of African Studies, Uppsala.*, 364-396.

Chen, X.M., Hosono, T., Yoda, T., Fukuda, Y. & Kanosue, K. (1998) Efferent projection from the preoptic area for the control of non-shivering thermogenesis in rats. *J Physiol*, 512 (Pt 3), 883-892.

Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M. & Zhou, Q.Y. (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417, 405-410.

Cheung, P.W. & McCormack, C.E. (1982) Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. *Am J Physiol*, 242, R261-264.

Claustrat, B., Geoffriau, M., Brun, J. & Chazot, G. (1996) [Melatonin: from hormone to drug?]. *Pathol Biol (Paris)*, 44, 645-653.

Colwell, C.S., Ralph, M.R. & Menaker, M. (1990) Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Res*, 523, 117-120.

Coon, S.L., Roseboom, P.H., Baler, R., Weller, J.L., Namboodiri, M.A., Koonin, E.V. & Klein, D.C. (1995) Pineal serotonin N-acetyltransferase: expression cloning and molecular analysis. *Science*, 270, 1681-1683.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D. & Low, M.J. (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411, 480-484.

Craft, C.M., Murage, J., Brown, B. & Zhan-Poe, X. (1999) Bovine arylalkylamine N-acetyltransferase activity correlated with mRNA expression in pineal and retina. *Brain Res Mol Brain Res*, 65, 44-51.

Crumbley, C. & Burris, T.P. (2011) Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS One*, 6, e17290.

Csaki, A., Kocsis, K., Halasz, B. & Kiss, J. (2000) Localization of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus studied by retrograde transport of [3H]D-aspartate autoradiography. *Neuroscience*, 101, 637-655.

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

Cyr, N.E., Toorie, A.M., Steger, J.S., Sochat, M.M., Hyner, S., Perello, M., Stuart, R. & Nillni, E.A. (2013) Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic α-MSH and TRH. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304, 640-650.

Dahlborn, K., Benlamlih, S., Zine-Filali, R., Gueroulali, A., Hossaini-Hilali, J. & Oukessou, M. (1992) Food deprivation and refeeding in the camel (Camelus dromedarius). *Am J Physiol*, 262, R1000-1005.

Dahlborn, K., Robertshaw, D., Schroter, R.C. & Zine-Filali, R. (1987) Effects of dehydration and heat stress on brain and body temperature in camel. *J Physiol*, 338, 28.

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

Dark, J.G. & Asdourian, D. (1975) Entrainment of the rat's activity rhythm by cyclic light following lateral geniculate nucleus lesions. *Physiol Behav*, 15, 295-301.

Darrow, J.M., Duncan, M.J., Bartke, A., Bona-Gallo, A. & Goldman, B.D. (1988) Influence of photoperiod and gonadal steroids on hibernation in the European hamster. *J Comp Physiol A*, 163, 339-348.

Darwent, D., Zhou, X., van den Heuvel, C., Sargent, C. & Roach, G.D. (2011) The validity of temperature-sensitive ingestible capsules for measuring core body temperature in laboratory protocols. *Chronobiol Int*, 28, 719-726.

Delavaud, C., Bengoumi, M., Faye, B., Levieux, D. & Chilliard, Y. (2013) Plasma leptin, glucose and non-esterified fatty acid variations in dromedary camels exposed to prolonged periods of underfeeding or dehydration. *Comp Biochem Physiol*, Part A 166, 177-185.

Dhillo, 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, 6609-6615.

Dholpuria, S., Vyas, S., Purohit, G.N. & Pathak, K.M. (2012) Sonographic monitoring of early follicle growth induced by melatonin implants in camels and the subsequent fertility. *J of Ultrasound*, 15, 135-141.

Dibner, C., Schibler, U. & Albrecht, U. (2010) The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu Rev Physiol*, 72, 517-549.

Dickmeis, T. (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol.*, 200, 3-22.

Drijfhout, W.J., van der Linde, A.G., de Vries, J.B., Grol, C.J. & Westerink, B.H. (1996) Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. *Neurosci Lett*, 202, 185-188.

Dubinion, J.H., do Carmo, J.M., Adi, A., Hamza, S., da Silva, A.A. & Hall, J.E. (2013) Role of

proopiomelanocortin neuron Stat3 in regulating arterial pressure and mediating the chronic effects of leptin. *American Heart Association*, 61, 1066-1074.

Dubocovich, M.L., Cardinali, D.P., Guardiola-Lemaitre, B., Vanhoutte, P.M. & Yocca, F.D. (1998) Melatonin receptors. The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification. *IUPHAR Media, London*, 187-193.

Duncan, M.J., Takahashi, J.S. & Dubocovich, M.L. (1988) 2-[125I]iodomelatonin binding sites in hamster brain membranes: pharmacological characteristics and regional distribution. *Endocrinology*, 122, 1825-1833.

Dunlap, J.C., Loros, J.J. & DeCoursey, P.J. (2004) Chronobiology: biological timekeeping. *Sunderland, MA: Sinauer Associates,* , 406

Durand, D. (1979) la systémique. *P.U.F. (nouvelle d'édition, 1983). Paris*, 19.

Eastman, C.I., Mistlberger, R.E. & Rechtschaffen, A. (1984) Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav*, 32, 357-368.

Ebisawa, T., Karne, S., Lerner, M.R. & Reppert, S.M. (1994) Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from Xenopus dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 6133-6137.

Edelstein, K. & Amir, S. (1999) The intergeniculate leaflet does not mediate the disruptive effects of constant light on circadian rhythms in the rat. *Neuroscience*, 90, 1093-1101.

El Allali, K. (2009) Mélatonine, Rythme de la Température Corporelle et Organisation de l'Hypothalamus et des Noyaux Suprachiasmatiques chez le Dromadaire (Camelus dromedarius) Démonstration de l'Entraînement de l'Horloge Circadienne par la Photopériode et par la Température Ambiante. . *Thèse en vue d'obtention du titre de Docteur d'Université de Strasbourg, Discipline: Science du Vivant, Spécialité: Neurosciences*.

El Allali, K., Achaaban, M.R., Bothorel, B., Piro, M., Bouaouda, H., El Allouchi, M., Ouassat, M., Malan, A. & Pevet, P. (2013) Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (Camelus dromedarius). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.

El Allali, K., Achaaban, M.R., Vivien-Roels, B., Bothorel, B., Tligui, N.S. & Pevet, P. (2005) Seasonal variations in the nycthemeral rhythm of plasma melatonin in the camel (Camelus dromedarius). *J Pineal Res*, 39, 121-128.

El Allali, K., Sinitskaya, N., Bothorel, B., Achaaban, R., Pevet, P. & Simonneaux, V. (2008) Daily Aa-nat gene expression in the camel (Camelus dromedarius) pineal gland. *Chronobiol Int*, 25, 800-807.

El Ouezzani, S., Tramu, G. & Magoul, R. (2005) Seasonal variations of the beta-endorphin neuronal system in the mediobasal hypothalamus of the jerboa (Jaculus orientalis). *Neurosci Lett*, 376, 107-110.

Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B. & Elmquist, J.K. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21, 1375-1385.

Elkhawad, A.O. (1992) Selective brain cooling in desert animals: the camel (Camelus dromedarius). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 101, 195-201.

Elliott, J.A., Stetson, M.H. & Menaker, M. (1972) Regulation of testis function in golden hamsters: a circadian clock measures photoperiodic time. *Science*, 178, 771-773.

Elmquist, J.K., Elias, C.F. & Saper, C.B. (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22, 221-232.

Emery, P. & Reppert, S.M. (2004) A rhythmic Ror. *Neuron*, 43, 443-446.

Emmanuel, B. (1980) Oxidation of butyrate to ketone bodies and CO2 in the rumen epithelium, liver, kidney, heart and lung of camel (Camelus dromedarius), sheep (Ovis aries) and goat (Capra hircus). *Comp Biochem Physiol*, 65B, 699-704.

Emmanuel, B. (1981a) Further metabolic studies in the rumen epithelium of camel (Camelus dromedarius) and sheep (Ovis aries). *Comp Biochmi Physiol*, 68B, 155-158.

Emmanuel, B. (1981b) Glucokinase, hexokinase, gluconeogenesis, glycogenesis and glycolysis in camel (Camelus dromedarius) and sheep (Ovis aries). *Comp Biochem Physiol*, 68B, 547-550.

Emmanuel, B. (1984) Comparative biochemical studies. *In Proc Khartoum workshop on camels (Dec 1979) "The camelid, and all purpose animals". Ed: Cokrill W R , Scand Inst, Afr Studies, Uppsala*, I, 449-478.

Faouzi, M., Leshan, R., Bjornholm, M., Hennessey, T., Jones, J. & Munzberg, H. (2007) Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology*, 148, 5414-5423.

Faye, B., Saint-Martin, G., Cherrier, R. & Ruffa, A. (1992) The influence of high dietary protein, energy and mineral intake on deficient young camel (Camelus dromedarius)--I. Changes in metabolic profiles and growth performance. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 102, 409-416.

Ferkin, M.H. & Zucker, I. (1991) Seasonal control of odour preferences of meadow voles (Microtus pennsylvanicus) by photoperiod and ovarian hormones. *J Reprod Fertil*, 92, 433-441.

Fite, K.V., Janusonis, S., Foote, W. & Bengston, L. (1999) Retinal

afferents to the dorsal raphe nucleus in rats and Mongolian gerbils. *J Comp Neurol*, 414, 469-484.

Fletcher, G.L., Hew, C.L. & Davies, P.L. (2001) Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu Rev Physiol*, 63, 359-390.

Foster, R.G. & Hankins, M.W. (2002) Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Prog Retin Eye Res*, 21, 507-527.

Francl, J.M., Kaur, G. & Glass, J.D. (2010) Roles of light and serotonin in the regulation of gastrin-releasing peptide and arginine vasopressin output in the hamster SCN circadian clock. *Eur J Neurosci*, 32, 1170-1179.

Francois-Bellan, A.M. & Bosler, O. (1992) Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. *Brain Res*, 595, 149-153.

Fukuhara, C., Suzuki, N., Matsumoto, Y., Nakayama, Y., Aoki, K., Tsujimoto, G., Inouye, S.I. & Masuo, Y. (1997) Day-night variation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) level in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 229, 49-52.

Gai, W.P., Geffen, L.B. & Blessing, W.W. (1990) Galanin immunoreactive neurons in the human hypothalamus: colocalization with vasopressin-containing neurons. *J Comp Neurol*, 298, 265-280.

Ganguly, S., Gastel, J.A., Weller, J.L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M.A., Coon, S.L., Hickman, A.B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J.A. & Klein, D.C. (2001) Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8083-8088.

Gao, Q. & Horvath, T.L. (2007) Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci*, 30, 367-398.

Garidou, M.L., Diaz, E., Calgari, C., Pevet, P. & Simonneaux, V. (2003a) Transcription factors may frame Aa-nat gene expression and melatonin synthesis at night in the Syrian hamster pineal gland. *Endocrinology*, 144, 2461-2472.

Garidou, M.L., Gauer, F., Vivien-Roels, B., Sicard, B., Pevet, P. & Simonneaux, V. (2002) Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent, Arvicanthis ansorgei. *Eur J Neurosci*, 15, 1632-1640.

Garidou, M.L., Vivien-Roels, B., Pevet, P., Miguez, J. & Simonneaux, V. (2003b) Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R1043-1052.

Gastel, J.A., Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L. & Klein, D.C. (1998) Melatonin production: proteasomal proteolysis in

serotonin N-acetyltransferase regulation. *Science*, 279, 1358-1360.

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

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

Gauer, F., Poirel, V.J., Garidou, M.L., Simonneaux, V. & Pevet, P. (1999) Molecular cloning of the arylalkylamine-N-acetyltransferase and daily variations of its mRNA expression in the Syrian hamster pineal gland. *Brain Res Mol Brain Res*, 71, 87-95.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. & Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280, 1564-1569.

Gerhold, L.M., Sellix, M.T. & Freeman, M.E. (2002) Antagonism of vasoactive intestinal peptide mRNA in the suprachiasmatic nucleus disrupts the rhythm of FRAs expression in neuroendocrine dopaminergic neurons. *J Comp Neurol*, 450, 135-143.

Gihad, E.A., El-Gallad, T.T., Sooud, A.E., Farid, M.F.A. & Abou-El-Nasr, H.M. (1989) Feed and water intake, digestibility and nitrogen utilization by camels compared to sheep and goats fed low protein desert by-products. *Options Méditerranéennes*, 2, 75-81.

Gillette, M.U. & McArthur, A.J. (1996) Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. *Behav Brain Res*, 73, 135-139.

Glaser, F.T. & Stanewsky, R. (2005) Temperature synchronization of the Drosophila circadian clock. *Curr Biol*, 15, 1352-1363.

Goel, N., Governale, M.M., Jechura, T.J. & Lee, T.M. (2000) Effects of intergeniculate leaflet lesions on circadian rhythms in Octodon degus. *Brain Res*, 877, 306-313.

Goel, N., Lee, T.M. & Smale, L. (1999) Suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the diurnal rodent Octodon degus: retinal projections and immunocytochemical characterization. *Neuroscience*, 92, 1491-1509.

Goldman, B.D. (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*, 16, 283-301.

Goldman, M.R. & Nelson, R.J. (1993) Melatonin and seasonality in mammals. *In Yu, H.S. and Reiter, R.J. (Eds), Melatonin, Boca Raton, FL: CRC Press*, 226-252.

Golombek, D.A. & Rosenstein, R.E. (2010) Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol Rev*, 90, 1063-1102.

Gorman, M.R., Goldman, B.D. & Zucker, I. (2001) Mammalian photoperiodism. *In handbook of*

Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks, Takahashi, J.S., Turek, F.W. and Moore, R.Y. (Eds), New York: Kluwer Acacemic/ Plenum Publishers., 481-508.

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

Graber, M. (1966) Etude de certains conditions africaines de l'utilisation anti-parasitaire du thiabendazole sur divers helminthes des animaux domestiques II Dormadaire. *Revue Elev Med Vet Pays Trop*, 19, 527-543.

Green, D.J. & Gillette, R. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res*, 245, 198-200.

Groos, G. & Hendriks, J. (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett*, 34, 283-288.

Gueroulali, A. (1980) Effets de la restriction d'eau sur les mécanismes thermorégulateurs et sur l'équilibre hydrique chez le mouton. *Thèse de Dctorat Vétérinaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, MAROC*

Guillaume, D., Arnaud, G., Camillo, F., Duchamp, G. & Palmer, E. (1995) Effect of melatonin implants on reproductive status of mares. *Biol Reprod Mon*, 1, 435-442.

Guillaumond, F., Becquet, D., Blanchard, M.P., Attia, J., Moreno, M., Bosler, O. & Francois-Bellan, A.M. (2007) Nocturnal expression of phosphorylated-ERK1/2 in gastrin-releasing peptide neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurochem*, 101, 1224-1235.

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.

Guy, J., Bosler, O., Dusticier, G., Pelletier, G. & Calas, A. (1987) Morphological correlates of serotonin-neuropeptide Y interactions in the rat suprachiasmatic nucleus: combined radioautographic and immunocytochemical data. *Cell Tissue Res*, 250, 657-662.

Guzman-Ruiz, M., Saderi, N., Cazarez-Marquez, F., Guerrero-Vargas, N.N., Basualdo, M.C., Acosta-Galvan, G. & Buijs, R.M. (2014) The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus α-MSH neurons in male rats. *Endocrinology*, 155, 525-535.

Gwinner, E. (1986) Circannual rhythms *Springer-verlag, Berlin*.

Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G. & Schwartz, M.W. (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic

neurons. *Nat Neurosci*, 1, 271-272.

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.

Harlow, H.J., Phillips, J.A. & Ralph, C.L. (1982) Circadian rhythms and the effects of exogenous melatonin in the nine-banded armadillo, Dasypus novemcinctus: a mammal lacking a distinct pineal gland. *Physiol Behav*, 29, 307-313.

Harrington, M.E. & Rusak, B. (1986) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, 1, 309-325.

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, 1065-1070.

Hay-Schmidt, A., Vrang, N., Larsen, P.J. & Mikkelsen, J.D. (2003) Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Chem Neuroanat*, 25, 293-310.

Heigl, S. & Gwinner, E. (1999) Periodic food availability synchronizes locomotor and feeding activity in pinealectomized house sparrows. *Zoology*, 102, 1-9.

Heikens, M.J., Gorbach, A.M., Eden, H.S., Savastano, D.M., Chen, K.Y., Skarulis, M.C. & Yanovski, J.A. (2011) Core body temperature in obesity *Am J Clin Nutr*, 93, 963-967.

Heldmaier, G. & Steinlechner, S. (1981) Seasonal control of energy requirement for thermoregulation in the Djungarian hamster, living in natural photoperiod. *J Comp Physiol* 142.

Hetem, R.S., Strauss, W.M., Fick, L.G., Maloney, S.K., Rodney-Meyer, L.C., Shobrak, M., Fuller, A. & Mitchell, D. (2010) Variation in the daily rhythm of body temperature of free-living Arabian oryx (Oryx leucoryx): doses water limitation drive heterothermy? *J cOMP pHYsiol B*, 180, 1111-1119.

Hill, J.W., Elmquist, J.K. & Elias, C.F. (2008) Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E827-832.

Hirata, F., Hayaishi, O., Tokuyama, T. & Seno, S. (1974) In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*, 249, 1311-1313.

Hoffman, K. (1969) Die relative Wirksamkeit von Zeitgebem. *Oecologia (Berl)*, 3.

Hoffmann, K. (1981) Photoperiodism in vertebrates. *In handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks, Aschoff, J.*

(Ed), New York, NY: Plenum Publishers., 449-473.

Hoffmann, K. (1982) The critical photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *In Vertebrate circadian systems, Aschoff, J., Daan, S. and Groos, G.A. (Eds), Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.*, 197-304.

Honma, K., Honma, S. & Wada, T. (1987) Phase-dependent shift of free-running human circadian rhythms in response to a single bright light pulse. *Experientia*, 43, 1205-1207.

Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y. & Honma, K. (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 419, 841-844.

Hunt, A.E., Al-Ghoul, W.M., Gillette, M.U. & Dubocovich, M.L. (2001) Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C110-118.

Ibata, Y., Okamura, H., Tanaka, M., Tamada, Y., Hayashi, S., Iijima, N., Matsuda, T., Munekawa, K., Takamatsu, T., Hisa, Y., Shigeyoshi, Y. & Amaya, F. (1999) Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol*, 20, 241-268.

Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Ronnekleiv, O.K., Low, M.J. & Kelly, M.J. (2003) Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology*, 144, 1331-1340.

Ikeda, M. & Allen, C.N. (2003) Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 17, 1111-1118.

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

Inouye, S.T. & Shibata, S. (1994) Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res*, 20, 109-130.

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

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

Jacomy, H., Burlet, A. & Bosler, O. (1999) Vasoactive intestinal peptide neurons as synaptic targets for vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus. Double-label immunocytochemical

demonstration in the rat. *Neuroscience*, 88, 859-870.

Jamali, K.A. (1998) Neurones hypothalamiques à proopiomélanocortine: composante effectrice d'une horloge circadienne entrainée par l'obscurité. *Thèse en vue d'obtention du titre de Docteur d'Université de Bordeaux I, Spécialité: Neurosciences et pharmacologie*.

Jamali, K.A. & Tramu, G. (1999) Control of rat hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons by a circadian clock that is entrained by the daily light-off signal. *Neuroscience*, 93, 1051-1061.

Janik, D. & Mrosovsky, N. (1994) Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res*, 651, 174-182.

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

Johnson, C.H. & Egli, M. (2014) Metabolic compensation and circadian resilience in Prokaryotic and Cyanobacteria. *Annu Rev Biochem*, 83, 221-247.

Johnson, M. (1939) Effect of continuous light on period spontaneous activity of white footed mice (*Peromyscus*). *J Exp Zool*, 82, 315-328.

Jolkkonen, J., Tuomisto, L., van Wimersma Greidanus, T.B. & Riekkinen, P.J. (1988) Vasopressin levels in the cerebrospinal fluid of rats with lesions of the paraventricular and suprachiasmatic nuclei. *Neurosci Lett*, 86, 184-188.

Jouany, J.P. (2000) La digestion chez les camélidés; comparaison avec les ruminants. *INRA Prod Anim*, 13, 165-176.

Kalsbeek, A. & Buijs, R.M. (2002) Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res*, 309, 109-118.

Kalsbeek, A., Cutrera, R.A., Van Heerikhuize, J.J., Van Der Vliet, J. & Buijs, R.M. (1999) GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. *Neuroscience*, 91, 453-461.

Kalsbeek, A., Teclemariam-Mesbah, R. & Pevet, P. (1993) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (Mesocricetus auratus). *J Comp Neurol*, 332, 293-314.

Kamili, A., Bengoumi, M., Oukessou, M., Faye, B. & Lefebvre, H. (2013) Assessment of glomerular filtration rate in normally hydrated and dehydrated dromedary camel by plasma exogenous creatinine clearance test. *Emir J Food Agri*, 25, 314-319.

Karsch, F.J. (1986) A role for melatonin as a timekeeping hormone in the ewe. *J Neural Transm Suppl*, 21, 109-124.

Kashefi, K. & Lovley, D.R. (2003) Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301, 934.

Kawamoto, T., Noshiro, M., Sato, F., Maemura, K., Takeda, N., Nagai, R., Iwata, T., Fujimoto, K., Furukawa, M., Miyazaki, K., Honma, S., Honma, K. & Kato, Y. (2004) A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 117-124.

Kelly, G. (2006) Body temperature variability (Part 1): a review of the history of body temperature and its variability due to site selection, biological rhythms, fitness, and aging. *Altern Med Rev*, 11, 278-293.

Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Begay, V., Falcon, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M. & Baler, R. (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res*, 52, 307-357; discussion 357-308.

Klein, D.C. & Moore, R.Y. (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 174, 245-262.

Klein, D.C., Moore, R.Y. & Reppert, S.M. (1991) The Suprachiasmatic nucleus, mind's clock. *New York: Oxford University Press.*

Klein, D.C. & Weller, J.L. (1970) Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169, 1093-1095.

Ko, C.H. & Takahashi, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2, R271-277.

Konopka, R.J. & Benzer, S. (1971) Clock mutants of Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 2112-2116.

Kopin, I.J., Pare, C.M., Axelrod, J. & Weissbach, H. (1961) The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem*, 236, 3072-3075.

Kramer, A., Yang, F.C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C. & Weitz, C.J. (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, 294, 2511-2515.

Kramer, A., Yang, F.C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C. & Weitz, C.J. (2003) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signalling. *Novartis Found Symp*, 253, 250-262; discussion 102-259, 263-256, 281-254.

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.

Kuwabara, N., Seki, K. & Aoki, K. (1986) Circadian, sleep and brain temperature rhythms in cats under sustained daily light-dark cycles and constant darkness. *Physiol Behav*, 38, 283-289.

Leak, R.K., Card, J.P. & Moore, R.Y. (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res*, 819, 23-32.

Leak, R.K. & Moore, R.Y. (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J Comp Neurol*, 433, 312-334.

Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S. & Reppert, S.M. (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107, 855-867.

Lee, D.G. & Schmidt, K. (1962) The skin, sweat glands and hair follicles of the camles (Camelus dromedarius) *Anat Rese*, 143, 71-94.

Lehman, M.N., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M. & Bittman, E.L. (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*, 7, 1626-1638.

Lerner, A.B., case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H. & Mori, W. (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens mélanocytes. *J Amer Chem Soc*, 80, 2587.

LeSauter, J. & Silver, R. (1998) Output signals of the SCN. *Chronobiol Int*, 15, 535-550.

Letz, B., Schomerus, C., Maronde, E., Korf, H.W. & Korbmacher, C. (1997) Stimulation of a nicotinic ACh receptor causes depolarization and activation of L-type Ca2+ channels in rat pinealocytes. *J Physiol*, 499 (Pt 2), 329-340.

Lewy, A.J., Tetsuo, M., Markey, S.P., Goodwin, F.K. & Kopin, I.J. (1980) Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab*, 50, 204-205.

Lima, F.B., Machado, U.F., Bartol, I., Seraphim, P.M., Sumida, D.H., Moraes, S.M., Hell, N.S., Okamoto, M.M., Saad, M.J., Carvalho, C.R. & Cipolla-Neto, J. (1998) Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. *Am J Physiol*, 275, E934-941.

Lin, J.Y. & Pan, J.T. (1994) Stimulatory effects of bombesin-like peptides on hypothalamic arcuate neurons in rat brain slices. *Brain Res Bull*, 35, 241-246.

Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K. & Ueki, S. (1986) Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull*, 16, 527-531.

Liu, A.C., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Welsh, D.K. & Kay, S.A. (2008) Redundant function of REV-ERBalpha and beta and

non-essential role for Bmal1 cycling in transcriptional regulation of intracellular circadian rhythms. *PLoS Genet*, 4, e1000023.

Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K. & Reppert, S.M. (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 19, 91-102.

Mahoney, M., Bult, A. & Smale, L. (2001) Phase response curve and light-induced fos expression in the suprachiasmatic nucleus and adjacent hypothalamus of Arvicanthis niloticus. *J Biol Rhythms*, 16, 149-162.

Mai, J.K., Kedziora, O., Teckhaus, L. & Sofroniew, M.V. (1991) Evidence for subdivisions in the human suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol*, 305, 508-525.

Malpaux, B., Daveau, A., Maurice, F., Gayrard, V. & Thiery, J.C. (1993) Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod*, 48, 752-760.

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

Malpaux, B., Thiery, J.C. & Chemineau, P. (1999) Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev*, 39, 355-366.

Markwald, R.R., Lee-Chiong, T.L., Burke, T.M., Snider, J.A. & Wright, K.P., Jr. (2010) Effects of the melatonin MT-1/MT-2 agonist ramelteon on daytime body temperature and sleep. *Sleep*, 33, 825-831.

Masson-Pévet, M., Bianchi, L. & Pevet, P. (1996) Circadian photic regulation of melatonin receptor density in rat suprachiasmatic nuclei: comparison with light induction of fos-related protein. *J Neurosci Res*, 43, 632-637.

Masson-Pévet, M. & Gauer, F. (1994) Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol Signals*, 3, 63-70.

Masson-Pévet, M., George, D., Kalsbeek, A., Saboureau, M., Lakhdar-Ghazal, N. & Pevet, P. (1994a) An attempt to correlate brain areas containing melatonin-binding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. *Cell Tissue Res*, 278, 97-106.

Masson-Pévet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D. & Pevet, P. (1994b) Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (Cricetus cricetus) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J Pineal Res*, 17, 151-163.

Masson-Pévet, M., Pévet, P. & Vivien-Roels, B. (1987) Pinealectomy and constant release of melatonin or 5-methoxytryptamine induce testicular atrophy in the European hamster (Cricetus cricetus). *J Pineal Res*, 4, 79-88.

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H. & Ohtaki, T. (2004) Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 320, 383-388.

Maywood, E.S., O'Brien, J.A. & Hastings, M.H. (2003) Expression of mCLOCK and other circadian clock-relevant proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol*, 15, 329-334.

Mc Farlane, W.V. (1977) Survival in an arid land. *Aust Nat His*, 29, 18-23.

Mc Farlane, W.V., Morris, R.J.H. & HOWArd, B. (1963) Turn-over and distribution of water in desert camels, sheep, cattle and kangaroos. *Nature*, 197, 270-272.

McArthur, A.J., Gillette, M.U. & Prosser, R.A. (1991) Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res*, 565, 158-161.

McArthur, A.J., Hunt, A.E. & Gillette, M.U. (1997) Melatonin action and signal transduction in the rat suprachiasmatic circadian clock: activation of protein kinase C at dusk and dawn. *Endocrinology*, 138, 627-634.

McCarter, R.J. & McGee, J.R. (1989) Transient reduction of metabolic rate by food restriction. *Am J Physiol*, 257, E175-179.

McCord, C.P. & Allen, F.P. (1917) Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool*, 23, 207-224.

Mefford, I.N., Chang, P., Klein, D.C., Namboodiri, M.A., Sugden, D. & Barchas, J. (1983) Reciprocal day/night relationship between serotonin oxidation and N-acetylation products in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 113, 1582-1586.

Meijer, J.H. & Rietveld, W.J. (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*, 69, 671-707.

Menaker, M., Moreira, L.F. & Tosini, G. (1997) Evolution of circadian organization in vertebrates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30, 305-313.

Menet, J.S., Vuillez, P. & Pevet, P. (2003) Calbindin expression in the hamster suprachiasmatic nucleus depends on day-length. *Neuroscience*, 122, 591-598.

Mengistu, U., Dahlborn, K. & Olsson, K. (2007) Mechanisms of water economy in lactating Ethiopian Somali goats during repeated cycles of intermittent watering. *Animal*, 1, 1009-1017.

Messager, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A. & Aparicio, S.A. (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1761-1766.

Messager, S., Garabette, M.L., Hastings, M.H. & Hazlerigg, D.G. (2001) Tissue-specific abolition of Per1

expression in the pars tuberalis by pinealectomy in the Syrian hamster. *Neuroreport*, 12, 579-582.

Messager, S., Hazlerigg, D.G., Mercer, J.G. & Morgan, P.J. (2000) Photoperiod differentially regulates the expression of Per1 and ICER in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *Eur J Neurosci*, 12, 2865-2870.

Messager, S., Ross, A.W., Barrett, P. & Morgan, P.J. (1999) Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9938-9943.

Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S.I., Markuns, J.F., Lehman, M.N. & Bittman, E.L. (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*, 140, 207-218.

Meyer-Bernstein, E.L. & Morin, L.P. (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci*, 16, 2097-2111.

Miguez, J.M., Simonneaux, V. & Pevet, P. (1997) The role of the intracellular and extracellular serotonin in the regulation of melatonin production in rat pinealocytes. *J Pineal Res*, 23, 63-71.

Mikkelsen, J.D., Larsen, P.J., O'Hare, M.M. & Wiegand, S.J. (1991) Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience*, 40, 55-66.

Miller, J.D., Morin, L.P., Schwartz, W.J. & Moore, R.Y. (1996) New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep*, 19, 641-667.

Millington, G.W. (2006) Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clin Exp Dermatol*, 31, 407-412.

Mintz, E.M., Marvel, C.L., Gillespie, C.F., Price, K.M. & Albers, H.E. (1999) Activation of NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus produces light-like phase shifts of the circadian clock in vivo. *J Neurosci*, 19, 5124-5130.

Miyamoto, Y. & Sancar, A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6097-6102.

Miyazaki, Y., Nisimura, T. & Numata, H. (2005) A phase response curve for circannual rhythm in the varied carpet beetle Anthrenus verbasci. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 191, 883-887.

Moga, M.M. & Moore, R.Y. (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 389, 508-534.

Mohawk, J.A., Green, C.B. & Takahashi, J.S. (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 35, 445-462.

Monecke, S., Saboureau, M., Malan, A., Bonn, D., Masson-Pevet, M. & Pevet, P. (2009) Circannual phase response curves to short and long photoperiod in the European hamster. *J Biol Rhythms*, 24, 413-426.

Monecke, S., Sage-Ciocca, D., Wollnik, F. & Pevet, P. (2013) Photoperiod can entrain circannual rhythms in pinealectomized European hamsters. *J Biol Rhythms*, 28, 278-290.

Monecke, S. & Wollnik, F. (2004) European hamsters (Cricetus cricetus) show a transient phase of insensitivity to long photoperiods after gonadal regression. *Biol Reprod*, 70, 1438-1443.

Monecke, S. & Wollnik, F. (2005) Seasonal variations in circadian rhythms coincide with a phase of sensitivity to short photoperiods in the European hamster. *J Comp Physiol B*, 175, 167-183.

Montgomery, J.C. & Macdonald, J.A. (1990) Effects of temperature on nervous system: implications for behavioral performance. *Am J Physiol*, 259, R191-196.

Moore, R.Y. (1983) Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc*, 42, 2783-2789.

Moore, R.Y. (1992) The fourth C.U. Ariens Kappers lecture. The organization of the human circadian timing system. *Prog Brain Res*, 93, 99-115; discussion 115-117.

Moore, R.Y. (1995) Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp*, 183, 88-99; discussion 100-106.

Moore, R.Y. (1996) Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res*, 73, 125-130.

Moore, R.Y. & Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42, 201-206.

Moore, R.Y. & Speh, J.C. (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett*, 150, 112-116.

Moore, R.Y., Speh, J.C. & Leak, R.K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, 309, 89-98.

Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E. & Helliwell, R. (1994) Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int*, 24, 101-146.

Morin, L.P. (1994) The circadian visual system. *Brain Res Brain Res Rev*, 19, 102-127.

Morin, L.P. (2012) Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol*.

Morin, L.P. & Allen, C.N. (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 51, 1-60.

Morin, L.P., Blanchard, J. & Moore, R.Y. (1992) Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Vis Neurosci*, 8, 219-230.

Morin, L.P., Shivers, K.Y., Blanchard, J.H. & Muscat, L. (2006) Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 137, 1285-1297.

Morin, L.P. & Wood, R.I. (2001) A stereotaxic atlas of the olden hamster brain. *Academic Press, San Diego*.

Mrosovsky, N., Salmon, P.A., Menaker, M. & Ralph, M.R. (1992) Nonphotic phase shifting in hamster clock mutants. *J Biol Rhythms*, 7, 41-49.

Murphy, B.A., Elliott, J.A., Sessions, D.R., Vick, M.M., Kennedy, E.L. & Fitzgerald, B.P. (2007) Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *J Circadian Rhythms*, 5, 5.

Musa, B.E. & Abusineina, M.E. (1978) The oestrous cycle of the camel (Camelus dromedarius). *Vet Rec*, 103, 556-557.

Nakajima, Y., Ikeda, M., Kimura, T., Honma, S., Ohmiya, Y. & Honma, K. (2004) Bidirectional role of orphan nuclear receptor RORalpha in clock gene transcriptions demonstrated by a novel reporter assay system. *FEBS Lett*, 565, 122-126.

Nascimento, E.S., Jr., Souza, A.P., Duarte, R.B., Magalhaes, M.A., Silva, S.F., Cavalcante, J.C., Cavalcante, J.S. & Costa, M.S. (2010) The suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the rock cavy (Kerodon rupestris): retinal projections and immunohistochemical characterization. *Brain Res*, 1320, 34-46.

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

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. & Tena-Sempere, M. (2005) Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 146, 1689-1697.

Nelson, R.J., Badura, L.L. & Goldman, B.D. (1990) Mechanisms of seasonal cycles of circadian cycles in golden-mantled ground squirrel. *Annual Review of Psychology*, 41, 81-108.

Nelson, W. & Halberg, F. (1986) Meal-timing, circadian rhythms and life span of mice. *J Nutr*, 116, 2244-2253.

Noshiro, M., Furukawa, M., Honma, S., Kawamoto, T., Hamada, T.,

Honma, K. & Kato, Y. (2005) Tissue-specific disruption of rhythmic expression of Dec1 and Dec2 in clock mutant mice. *J Biol Rhythms*, 20, 404-418.

Nosjean, O., Ferro, M., Coge, F., Beauverger, P., Henlin, J.M., Lefoulon, F., Fauchere, J.L., Delagrange, P., Canet, E. & Boutin, J.A. (2000) Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 275, 31311-31317.

Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M., Kudo, T., Shimizu, Y., Yano, M., Monden, M., Machida, K., Matsuda, J., Horie, S., Todo, T. & Ishida, N. (2003) Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem*, 278, 41519-41527.

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

Okamura, H., Murakami, S., Uda, K., Sugano, T., Takahashi, Y., Yanaihara, C. & Ibata, Y. (1986) Coexistence of vasoactif intestinal peptide (VIP)-, peptide histidine isoleucine amide (PHI)-, and gastrin releasing peptide (GRP)-like immunoreactivity in neurons of rat suprachiasmatic nucleus. *Biomed Res*, 7, 295-299.

Okamura, H., Tominaga, K., Ban, Y., Tanaka, M., Tamada, Y., Inouye, S.T. & Ibata, Y. (1994) Morphological survey of the suprachiasmatic nucleus in slice culture using roller tube method: 1. Architecture of the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Acta Histochemica et Cystochemica*, 27.

Okamura, H., Yamaguchi, S. & Yagita, K. (2002) Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*, 309, 47-56.

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

Oshima, I., Yamada, H., Goto, M., Sato, K. & Ebihara, S. (1989) Pineal and retinal melatonin is involved in the control of circadian locomotor activity and body temperature rhythms in the pigeon. *J of Comp Physio A*, 166, 217-226.

Ostrowski, S. & Williams, J.B. (2006) Heterothermy of free-living Arabian sand gazelles (Gazella subgutturosa marica) in a desert environment. *J Exp Biol*, 209, 1421-1429.

Ostrowski, S., Williams, J.B. & Ismael, K. (2003) Heterothermy and the water economy of free-living Arabian oryx (Oryx leucoryx). *J Exp Biol*, 206, 1471-1478.

Palkova, M., Sigmund, L. & Erkert, H.G. (1999) Effect of ambient temperature on the circadian activity rhythm in common

marmosets, Callithrix j. jacchus (primates). *Chronobiol Int*, 16, 149-161.

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

Park, H.T., Baek, S.Y., Kim, B.S., Kim, J.B. & Kim, J.J. (1993) Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive (CGRPI) elements in the circadian system of the mouse: an immunohistochemistry combined with retrograde transport study. *Brain Res*, 629, 335-341.

Parkinson, J.R., Dhillo, W.S., Small, C.J., Chaudhri, O.B., Bewick, G.A., Pritchard, I., Moore, S., Ghatei, M.A. & Bloom, S.R. (2008) PYY3-36 injection in mice produces an acute anorexigenic effect followed by a delayed orexigenic effect not observed with other anorexigenic gut hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E698-708.

Paul, M.J., Zucker, I. & Schwartz, W.J. (2008) Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363, 341-361.

Paxinos, G. & Watson, C. (2004) Tha rat brain in stereotaxic coordinates, 5th edition. *Academic Press, Sedeny*, 2009.

Pengelly, E.T. (1974) Circannual rhythmicity in hibernating mammals. *In Circannual Clocks: Annual Biological Rhythms, Pengelley, ET. (Ed), New York, NY: Academic Press.*, 95-160.

Pengelly, E.T. & Fisher, K.C. (1963) The effect of temperature and photoperiod on the yearly hibernating behavior of captive golden-mantled ground squirrel (*Citellus lateralis tescorum*). *Can J Zool*, 41, 1103-1120.

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

Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Pevet, P. & Buijs, R.M. (2004a) Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci*, 19, 318-324.

Perreau-Lenz, S., Pevet, P., Buijs, R.M. & Kalsbeek, A. (2004b) The biological clock: the bodyguard of temporal homeostasis. *Chronobiol Int*, 21, 1-25.

Pévet, P. (1988) The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod Nutr Dev*, 28, 443-458.

Pévet, P. (2002) Melatonin. *Dialogues Clin Neurosci*, 4, 57-72.

Pévet, P. (2003a) Melatonin in animal models. *Dialogues Clin Neurosci*, 5, 343-352.

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

Pévet, P. (2006) [The melatoninergic system]. *Encephale*, 32, S826-833.

Pévet, P. (2014) The internal time-giver role of melatonin. A key for our health. *Rev Neurol (Paris)*, 1-7.

Pévet, P., Bothorel, B., Slotten, H. & Saboureau, M. (2002) The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res*, 309, 183-191.

Pévet, P. & Challet, E. (2011) Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. *J Physiol Paris*, 105, 170-182.

Pévet, P., Pitrosky, B., Simonneaux, V., Vivien-Roels, B. & Masson-Pévet, M. (1999) Pineal gland and biological rhythms: physiological effects of melatonin. *in In Comparative Endocrinology and Reproduction. Eds: Joly K P, Krishna A and Haldar C, Narosa Publishing House, New Delhi, INDIA*, 507-528.

Pévet, P., Vivien-Roels, B. & Masson-Pevet, M. (1991) Annual changes in the daily pattern of melatonin synthesis and release. *In Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation, Fraschini, F. and Reiter, R. (Eds), New York : Plenum Press*, 147-157.

Pévet, P., Vivien-Roels, B., Masson-Pevet, M., Steinlechner, S., Skene, D. & Canguilhem, B. (1989) Melatonin, serotonin, 5-hydroxyindole-3-acetic acid and N-acetyltransferase in the pineal of the European hamster (Cricetus cricetus) kept under natural environmental conditions: lack of a day/night rhythm in melatonin formation in spring and early summer. *J Pineal Res*, 6, 233-242.

Piccione, G., Caola, G. & Refinetti, R. (2002) The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biological Rhythm Research* 33(1), 113-119.

Pickard, G.E. (1994) Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. *Neuroreport*, 5, 2186-2188.

Pickard, G.E., Kahn, R. & Silver, R. (1984) Splitting of the circadian rhythm of body temperature in the golden hamster. *Physiol Behav*, 32, 763-766.

Pickard, G.E., Ralph, M.R. & Menaker, M. (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J Biol Rhythms*, 2, 35-56.

Piggins, H.D., Samuels, R.E., Coogan, A.N. & Cutler, D.J. (2001) Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse, and rat. *J Comp Neurol*, 438, 50-65.

Piro, M., Bouazzati, O., Bengoumi, M., El Allali, K., Achaaban, M.R., Benjouad, A., Nabich, A. & Ouragh, L. (2011) Genetic characterisation of moroccan camel populations using microsatellites markers. *J Camel Pract Res*, 18, 167-172.

Pitrosky, B., Kirsch, R., Malan, A., Mocaer, E. & Pevet, P. (1999) Organization of rat circadian rhythms during daily infusion of melatonin or S20098, a melatonin agonist. *Am J Physiol*, 277, R812-828.

Pitrosky, B., Kirsch, R., Vivien-Roels, B., Georg-Bentz, I., Canguilhem, B. & Pevet, P. (1995) The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol*, 7, 889-895.

Pittendrigh, C.S. (1954) On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40, 1018-1029.

Plant, T.M., Ramaswamy, S. & Dipietro, M.J. (2006) Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology*, 147, 1007-1013.

Poirel, V.J., Cailotto, C., Streicher, D., Pevet, P., Masson-Pevet, M. & Gauer, F. (2003) MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol Lett*, 24, 33-38.

Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. & Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110, 251-260.

Pritchard, L.E., Turnbull, A.V. & White, A. (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol*, 172, 411-421.

Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P. & Rollag, M.D. (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 340-345.

Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F. & Rollag, M.D. (2000) A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, 20, 600-605.

Provencio, I., Rollag, M.D. & Castrucci, A.M. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, 415, 493.

Rajaratnam, S.M. & Arendt, J. (2001) Health in a 24-h society. *Lancet*, 358, 999-1005.

Rajaratnam, S.M. & Redman, J.R. (1998) Entrainment of activity rhythms to temperature cycles in diurnal palm squirrels. *Physiol Behav*, 63, 271-277.

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

Randall, C.F., Bromage, N.R., Duston, J. & Symes, J. (1998) Photoperiod-

induced phase-shifts of the endogenous clock controlling reproduction in the rainbow trout: a circannual phase-response curve. *J Reprod Fertil*, 112, 399-405.

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

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

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

Refinetti, R. (2006) Circadian physiology. *In Circadian physiology: second edition, Refinetti, R. (Ed), CRC Taylor and Frabcis Group, Boca Raton, London, New York*, 667.

Refinetti, R. (2010a) The circadian rhythm of body temperature. *Front Biosci*, 15, 564-594.

Refinetti, R. (2010b) Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *J Biol Rhythms*, 25, 247-256.

Refinetti, R., Kaufman, C.M. & Menaker, M. (1994) Complete suprachiasmatic lesions eliminate circadian rhythmicity of body temperature and locomotor activity in golden hamsters. *J Comp Physiol A*, 175, 223-232.

Refinetti, R. & Menaker, M. (1992) The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav*, 51, 613-637.

Reiter, R.J. (1972) Evidence for refractoriness of the pituitary-gonadal axis to the pineal gland in golden hamsters and its possible implications in annual reproductive rhythms. *Anat Rec*, 173, 365-371.

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

Reiter, R.J. (2003) Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 17, 273-285.

Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G. & Acuna-Castroviejo, D. (1995) A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res*, 18, 1-11.

Rensing, L. & Ruoff, P. (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int*, 19, 807-864.

Reppert, S.M., Artman, H.G., Swaminathan, S. & Fisher, D.A. (1981) Vasopressin exhibits a rhythmic daily pattern in cerebrospinal fluid but not in blood. *Science*, 213, 1256-1257.

Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A. & Gusella, J.F. (1995a) Molecular characterization of a

second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 8734-8738.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2000) Comparing clockworks: mouse versus fly. *J Biol Rhythms*, 15, 357-364.

Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 63, 647-676.

Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.M., Godson, C. & Kolakowski, L.F., Jr. (1995b) Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron*, 15, 1003-1015.

Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Ebisawa, T. (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13, 1177-1185.

Reuss, S. (2003) The clock in the brain: anatomy of the mammalian circadian timing system. *In: Peschke, E. (Ed.), (org) Endokrinologie Leipzig*, 9-48.

Ribelayga, C., Garidou, M.L., Malan, A., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P. & Simonneaux, V. (1999a) Photoperiodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its effect on melatonin synthesis. *J Biol Rhythms*, 14, 105-115.

Ribelayga, C., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P. & Simonneaux, V. (1999b) Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology*, 140, 1375-1384.

Ritzenthaler, T., Nighoghossian, N., Berthiller, J., Schott, A.M., Cho, T.H., Derex, L., Brun, J., Trouillas, P. & Claustrat, B. (2009) Nocturnal urine melatonin and 6-sulphatoxymelatonin excretion at the acute stage of ischaemic stroke. *J Pineal Res*, 46, 349-352.

Robinson, I.C. & Coombes, J.E. (1993) Neurohypophysial peptides in cerebrospinal fluid: an update. *Ann N Y Acad Sci*, 689, 269-284.

Roenneberg, T. & Foster, R.G. (1997) Twilight times: light and the circadian system. *Photochem Photobiol*, 66, 549-561.

Roenneberg, T. & Merrow, M. (2003) The network of time: understanding the molecular circadian system. *Curr Biol*, 13, R198-207.

Romijn, H.J., Sluiter, A.A., Pool, C.W., Wortel, J. & Buijs, R.M. (1997) Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 9, 2613-2623.

Romijn, H.J., Sluiter, A.A., Wortel, J., Van Uum, J.F. & Buijs, R.M. (1998) Immunocytochemical evidence for a diurnal rhythm of neurons showing colocalization of VIP with GRP in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol*, 391, 397-405.

Romijn, H.J., van Uum, J.F., Emmering, J., Goncharuk, V. & Buijs, R.M. (1999) Colocalization of VIP with AVP in neurons of the human paraventricular, supraoptic and suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 832, 47-53.

Roseboom, P.H., Coon, S.L., Baler, R., McCune, S.K., Weller, J.L. & Klein, D.C. (1996) Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 137, 3033-3045.

Roseboom, P.H. & Klein, D.C. (1995) Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol Pharmacol*, 47, 439-449.

Roseboom, P.H., Namboodiri, M.A., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Rodriguez, I.R., Gastel, J.A. & Klein, D.C. (1998) Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res*, 63, 189-197.

Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C. & O'Hara, B.F. (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, 298, 2211-2213.

Rusak, B. & Yu, G.D. (1993) Regulation of melatonin-sensitivity and firing-rate rhythms of hamster suprachiasmatic nucleus neurons: pinealectomy effects. *Brain Res*, 602, 200-204.

Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Canguilhem, B. & Pevet, P. (1999) Circannual reproductive rhythm in the European hamster (Cricetus cricetus): demonstration of the existence of an annual phase of sensitivity to short photoperiod. *J Pineal Res*, 26, 9-16.

Sakamoto, K., Nagase, T., Fukui, H., Horikawa, K., Okada, T., Tanaka, H., Sato, K., Miyake, Y., Ohara, O., Kako, K. & Ishida, N. (1998) Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem*, 273, 27039-27042.

Sakanaka, M., Magari, S., Inoue, N. & Lederis, K. (1990) Co-localization of arginine vasopressin- and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res*, 260, 549-554.

Sakowski, S.A., Geddes, T.J., Thomas, D.M., Levi, E., Hatfield, J.S. & Kuhn, D.M. (2006) Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res*, 1085, 11-18.

Sam, A.H., Troke, R.C., Tan, T.M. & Bewick, G.A. (2012) The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*, 63, 46-56.

Sanchez-Vazquez, F.J., Iigo, M., Madrid, J.A. & Tabata, M. (2000) Pinealectomy does not affect the entrainment to light nor the generation of the circadian demand-feeding rhythms of rainbow trout. *Physiol Behav*, 69, 455-461.

Sandu, C., Dumas, M., Malan, A., Sambakhe, D., Marteau, C., Nizard, C., Schnebert, S., Perrier, E., Challet, E., Pevet, P. & Felder-Schmittbuhl, M.P. (2012) Human skin keratinocytes, melanocytes, and fibroblasts contain distinct circadian clock machineries. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3329-3339.

Satinoff, E., Liran, J. & Clapman, R. (1982) Aberrations of circadian body temperature rhythms in rats with medial preoptic lesions. *Am J Physiol*, 242, R352-357.

Satinoff, E. & Prosser, R.A. (1988) Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of body temperature, in male rats. *J Biol Rhythms*, 3, 1-22.

Sato, F., Kawamoto, T., Fujimoto, K., Noshiro, M., Honda, K.K., Honma, S., Honma, K. & Kato, Y. (2004a) Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem*, 271, 4409-4419.

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

Schaad, N.C., Vanecek, J., Rodriguez, I.R., Klein, D.C., Holtzclaw, L. & Russell, J.T. (1995) Vasoactive intestinal peptide elevates pinealocyte intracellular calcium concentrations by enhancing influx: evidence for involvement of a cyclic GMP-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*, 47, 923-933.

Schmidt-Nielsen, B. (1964a) Organ systems in adaptation: The excretory system. *In Handbook of Physiology, Ch 13. Eds: Dill, D B; Adolf, E F and Wilber, C G, American Physiological Society, Washington*.

Schmidt-Nielsen, B., Schmidt-Nielsen, K., Houpt, T.R. & Jarnum, S.A. (1956) Water balance of the camel. *Am J Physiol*, 185, 185-194.

Schmidt-Nielsen, K. (1964b) Desert Animals: Physiological Problems of Heat and Water. *Oxford, Clarendon*, 1-277.

Schmidt-Nielsen, K., B.Schmidt-Nielsen, S.A.Jarnum & Houpt, T.R. (1957) Body temperature of the camel and its relation to water economy. *Am. J. Physiol*, 188, 103 -112.

Schmidt-Nielsen, K., Crawford, J.E.C., Newsome, A.E., Rawson, K.S. & Hammel, H.T. (1967) Metabolic

rate of camels: effect of body temperature and dehydration *Am. J. Physiol*, 212, 341-346.

Schomerus, C. & Korf, H.W. (2005) Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. *Ann N Y Acad Sci*, 1057, 372-383.

Schomerus, C., Korf, H.W., Laedtke, E., Weller, J.L. & Klein, D.C. (2000) Selective adrenergic/cyclic AMP-dependent switch-off of proteasomal proteolysis alone switches on neural signal transduction: an example from the pineal gland. *J Neurochem*, 75, 2123-2132.

Schomerus, C., Laedtke, E. & Korf, H.W. (1995) Calcium responses of isolated, immunocytochemically identified rat pinealocytes to noradrenergic, cholinergic and vasopressinergic stimulations. *Neurochem Int*, 27, 163-175.

Schottner, K., Simonneaux, V., Vuillez, P., Steinlechner, S., Pevet, P. & Weinert, D. (2011) The daily melatonin pattern in Djungarian hamsters depends on the circadian phenotype. *Chronobiol Int*, 28, 873-882.

Schroter, R.C., Robertshaw, D. & Zine-Filali, R. (1989) Brain cooling and respiratory heat exchange in camels during rest and exrcise. *Respir Physiol*, 78, 95-105.

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

Schwartz, W.J. & Reppert, S.M. (1985) Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci*, 5, 2771-2778.

Sehgal, A. (2004) Molecular biology of circadian rhythms. *Ed Sehgal, A. by John Wiley & Sons, Inc, Philadelphia, Pennsylvania*.

Semo, M., Lupi, D., Peirson, S.N., Butler, J.N. & Foster, R.G. (2003) Light-induced c-fos in melanopsin retinal ganglion cells of young and aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur J Neurosci*, 18, 3007-3017.

Sghiri, A. & Driancourt, M.A. (1999) Seasonal effects on fertility and ovarian follicular growth and maturation in camels (Camelus dromedarius). *Anim Reprod Sci*, 55, 223-237.

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, 2129-2134.

Shearman, L.P., Sriram, S., Weaver, D.R., Maywood, E.S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C.C., van der Horst, G.T., Hastings, M.H. & Reppert, S.M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288, 1013-1019.

Shearman, L.P., Zylka, M.J., Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 89, 387-397.

Shen, H. & Semba, K. (1994) A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res*, 635, 159-168.

Shibata, S., Cassone, V.M. & Moore, R.Y. (1989) Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett*, 97, 140-144.

Shirakawa, T., Honma, S. & Honma, K. (2001) Multiple oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*, 18, 371-387.

Silver, R., LeSauter, J., Tresco, P.A. & Lehman, M.N. (1996a) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*, 382, 810-813.

Silver, R., Romero, M.T., Besmer, H.R., Leak, R., Nunez, J.M. & LeSauter, J. (1996b) Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced Fos. *Neuroreport*, 7, 1224-1228.

Simonian, S.X., Spratt, D.P. & Herbison, A.E. (1999) Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol*, 411, 346-358.

Simonneaux, V. & Ancel, C. (2012) RFRP neurons are critical gatekkepers for the photoperiodic control of reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 3, 1-9.

Simonneaux, V. & Ribelayga, C. (2003) Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*, 55, 325-395.

Skene, D.J. & Arendt, J. (2006) Human circadian rhythms: physiological and therapeutic relevance of light and melatonin. *Ann Clin Biochem*, 43, 344-353.

Skene, D.J., Timbers, S.E., Middleton, B., English, J., Kopp, C., Tobler, I. & Ioannides, C. (2006) Mice convert melatonin to 6-sulphatoxymelatonin. *Gen Comp Endocrinol*, 147, 371-376.

Skidmore, J.A. (2011) Reproductive physiology in female Old World Camelids. *Anim Reprod Sci*, 124, 3-4.

Skofitsch, G. & Jacobowitz, D.M. (1985) Immunohistochemical Mapping of Galanin-Like Neurons in the Rat Central Nervous-System. *Peptides*, 6, 509-546.

Slotten, H.A., Krekling, S., Sicard, B. & Pevet, P. (2002a) Daily infusion of melatonin entrains circadian activity rhythms in the diurnal rodent Arvicanthis ansorgei. *Behav Brain Res*, 133, 11-19.

Slotten, H.A., Pitrosky, B., Krekling, S. & Pevet, P. (2002b) Entrainment of circadian activity rhythms in

rats to melatonin administered at T cycles different from 24 hours. *Neurosignals*, 11, 73-80.

Smale, L. & Boverhof, J. (1999) The suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet of Arvicanthis niloticus, a diurnal murid rodent from East Africa. *J Comp Neurol*, 403, 190-208.

Snyder, S.H., Axelrod, J. & Zweig, M. (1967) Circadian rhythm in the serotonin content of the rat pineal gland: regulating factors. *J Pharmacol Exp Ther*, 158, 206-213.

Stehle, J., Vanecek, J. & Vollrath, L. (1989) Effects of melatonin on spontaneous electrical activity of neurons in rat suprachiasmatic nuclei: an in vitro iontophoretic study. *J Neural Transm*, 78, 173-177.

Stehle, J.H., von Gall, C. & Korf, H.W. (2002) Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res*, 309, 173-182.

Stehle, J.H., von Gall, C., Schomerus, C. & Korf, H.W. (2001) Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signaling mechanisms. *J Biol Rhythms*, 16, 312-325.

Steinlechner, S. (1992) Melatonin: an endocrine signal for the night length. *Verh Dtsch Zool Ges*, 85, 217-229.

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

Stetson, M.H., Matt, K.S. & Watson-Whitmyre, M. (1976) Photoperiodism and reproduction in golden hamsters: circadian organization and the termination of photorefractoriness. *Biol Reprod*, 14, 531-537.

Stopa, E.G., Minamitani, N., Jonassen, J.A., King, J.C., Wolfe, H., Mobtaker, H. & Albers, H.E. (1988) Localization of vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine immunoreactivity and mRNA within the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*, 464, 319-325.

Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H. & Weitz, C.J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417, 78-83.

Taha, A.A.M. & Abdalla, A.B. (1980) Light and electron microscopy of the sweat glands of the dromedary camel. *J Acta Veterinaria Brno*, 49, 31-35.

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, 764-775.

Tamarkin, L., Hollister, C.W., Lefebvre, N.G. & Goldman, B.D. (1977) Melatonin induction of gonadal quiescence in pinealectomized Syrian hamsters. *Science*, 198, 953-955.

Tamarkin, L., Westrom, W.K., Hamill, A.I. & Goldman, B.D. (1976) Effect of melatonin on the reproductive systems of male and female Syrian hamsters: a diurnal rhythm in sensitivity to melatonin. *Endocrinology*, 99, 1534-1541.

Tanaka, M., Okamura, H., Matsuda, T., Shigeyoshi, Y., Hisa, Y., Chihara, K. & Ibata, Y. (1996) Somatostatin neurons form a distinct peptidergic neuronal group in the rat suprachiasmatic nucleus: a double labeling in situ hybridization study. *Neurosci Lett*, 215, 119-122.

Thomas, M.A., Fleissner, G., Stohr, M., Hauptfleisch, S. & Lemmer, B. (2004) Localization of components of the renin-angiotensin system in the suprachiasmatic nucleus of normotensive Sprague-Dawley rats: part A. angiotensin I/II, a light and electron microscopic study. *Brain Res*, 1008, 212-223.

Tibary, A. & Anouassi, A. (1996) Ultrasonographic changes of the reproductive tract in the female camel (Camelus dromedarius) during the follicular cycle and pregnancy. *J Camel Pract Res*, 3, 71-90.

Tibary, A. & Anouassi, A. (1997) Reproductive physiology of the Male. *In Theriogenology in camelidae. Abu Dhabi Printing and Publishing Company, Mina, Abu Dhabi, UAE*, 49-78.

Torres-Farfan, C., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, G.J. & Seron-Ferre, M. (2011) A circadian clock entrained by melatonin is ticking in the rat fetal adrenal *Endocrinology*, 152, 1891-1900.

Tosini, G. & Fukuhara, C. (2002) The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res*, 309, 119-126.

Tosini, G. & Menaker, M. (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*, 272, 419-421.

Tosini, G. & Menaker, M. (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*, 789, 221-228.

Tournier, B.B., Birkenstock, J., Pevet, P. & Vuillez, P. (2009) Gene expression in the suprachiasmatic nuclei and the photoperiodic time integration. *Neuroscience*, 160, 240-247.

Tournier, B.B., Menet, J.S., Dardente, H., Poirel, V.J., Malan, A., Masson-Pevet, M., Pevet, P. & Vuillez, P. (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience*, 118, 317-322.

Tousson, E. & Meissl, H. (2004) Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, 24, 2983-2988.

Turek, F.W. & Losee-Olson, S. (1986) A benzodiazepine used in the treatment of insomnia phase-shifts the mammalian circadian clock. *Nature*, 321, 167-168.

Turek, F.W. & Van Cauter, E. (1994) Rhythms in reproduction *In*

Knobil, E. and Neill J.D. (eds), The physiology of reproduction, New York, Raven Press., 487-540.

Uchiyama, M., Mayer, G., Okawa, M. & Meier-Ewert, K. (1995) Effects of vitamin B12 on human circadian body temperature rhythm. *Neurosci Lett*, 192, 1-4.

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

Underwood, H. (1983) Circadian pacemakers in lizards: phase-response curves and effects of pinealectomy. *Am J Physiol*, 244, R857-864.

Underwood, H. (2001) Circadian organization in non-mammalian vertebrates. *In Circadian Clocks (Handbook of Behavioral Neurobiology), Eds: Takahashi, J.S., Turek, F.W. and Moore, R.Y. Kluwer/Plenum, New York.*, 12, 111-140.

Vakkuri, O., Lamsa, E., Rahkamaa, E., Ruotsalainen, H. & Leppaluoto, J. (1984) Iodinated melatonin: preparation and characterization of the molecular structure by mass and 1H NMR spectroscopy. *Anal Biochem*, 142, 284-289.

Valassi, E., Scacchi, M. & Cavagnini, F. (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 18, 158-168.

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

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

Van den Pol, A.N., Yao, Y., Fu, L.Y., Foo, K., Huang, H., Coppari, R., Lowell, B. & Broberger, C. (2009) Neuromedin B and gastrin releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong renilla GFP in NPY neurons. *J Neurosci*, 29, 4622–4639.

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

Van der Ploeg, L.H., Martin, W.J., Howard, A.D., Nargund, R.P., Austin, C.P., Guan, X., Drisko, J., Cashen, D., Sebhat, I., Patchett, A.A., Figueroa, D.J., DiLella, A.G., Connolly, B.M., Weinberg, D.H., Tan, C.P., Palyha, O.C., Pong, S.S., MacNeil, T., Rosenblum, C., Vongs, A., Tang, R., Yu, H., Sailer, A.W., Fong, T.M., Huang, C., Tota, M.R., Chang, R.S., Stearns, R., Tamvakopoulos, C., Christ, G., Drazen, D.L., Spar, B.D., Nelson, R.J. & MacIntyre, D.E. (2002) A role for the melanocortin 4 receptor in sexual

function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11381-11386.

Vanecek, J., Pavlik, A. & Illnerova, H. (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res*, 435, 359-362.

Vanecek, J., Sugden, D., Weller, J. & Klein, D.C. (1985) Atypical synergistic alpha 1- and beta-adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. *Endocrinology*, 116, 2167-2173.

Viswanathan, M., Laitinen, J.T. & Saavedra, J.M. (1990) Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 6200-6203.

Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W. & Takahashi, J.S. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, 264, 719-725.

von Gall, C., Weaver, D.R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J.H. & Korf, H.W. (2005) Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann N Y Acad Sci*, 1040, 508-511.

Vrang, N., Mrosovsky, N. & Mikkelsen, J.D. (2003) Afferent projections to the hamster intergeniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res Bull*, 59, 267-288.

Walker, J.M., Haskell, E.H., Berger, R.J. & Heller, H.C. (1980) Hibernation and circannual rhythms of sleep. *physiological Zoology*, 53, 8-11.

Walker, R.F. & Aloyo, V.J. (1985) Norepinephrine stimulates serotonin secretion from rat pineal glands, in vitro. *Brain Res*, 343, 188-189.

Walsberg, G.E. (2000) Small mammals in hot deserts: some generalizations revesited. *BioScience*, 50, 109-1120.

Wasan, K.M. & Looije, N.A. (2005) Emerging pharmacological approaches to the treatment of obesity. *J Pharm Pharm Sci*, 8, 259-271.

Watts, A.G. & Boyle, C.N. (2010) The functional architecture of dehydration-anorexia. *Physiol Behav*, 100, 472-477.

Watts, A.G., Swanson, L.W. & Sanchez-Watts, G. (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol*, 258, 204-229.

Weaver, D.R., Liu, C. & Reppert, S.M. (1996) Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol*, 10, 1478-1487.

Webb, A.B., Angelo, N., Huettner, J.E. & Herzog, E.D. (2009) Intrinsic,

nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 16493-16498.

Weissenbock, N.M., Arnold, W. & Ruf, T. (2012) Taking the heat: thermoregulation in Asian elephants under different climatic conditions. *j Comp Physiol B*, 182, 311-319.

Wensvoort, J., Kyle, D.J., Orskov, E.R. & Bourke, D.A. (2001) Biochemical adaptation of camelids during periods where feed is withheld. *Rangifer*, 21, 45-48.

Wetterberg, L. (1999) Melatonin and clinical application. *Reprod Nutr Dev*, 39, 367-382.

Wever, R.A. (1980) Phase shifts of human circadian rhythms due to shifts of artificial Zeitgebers. *Chronobiologia*, 7, 303-327.

Wickland, C. & Turek, F.W. (1994) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Res*, 660, 293-300.

Wilson, R.T. (1984) The camel. *Longman Group Etd, (London, New York)*, 223.

Wren, A.M. & Bloom, S.R. (2007) Gut hormones and appetite control. *Gastroenterology*, 132, 2116-2130.

Wurtman, R.J. & Anton-Tay, F. (1969) The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog Horm Res*, 25, 493-522.

Yagil, R. (1986) Self-sufficiency in animal protein in drought-stricken areas. *World Anim Rev (FAO)*, 57, 2-10.

Yagil, R. (1993) Renal function and water metabolism in the dromedary. *Contrib Nephrol*, 102, 161-170.

Yagil, R. & Berlyne, G.M. (1976) Sodium and potassium metabolism in the dehydrated and rehydrated Bedouin camel. *J Appl Physiol*, 41, 457-461.

Yamamoto, R., Akazawa, H., Fujihara, H., Ozasa, Y., Yasuda, N., Ito, K., Kudo, Y., Qin, Y., Ueta, Y. & Komuro, I. (2011) Angiotensin II Type 1 Receptor Signaling Regulates Feeding Behavior through Anorexigenic Corticotropin-releasing Hormone in Hypothalamus. *J Biol Chem*, 286, 21458-21465.

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. & Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288, 682-685.

Yasin, S.A. & Wahid, A. (1957) A preliminary survey. *Pakistan camels*, 8, 289-297.

Yi, C.X., van der Vliet, J., Dai, J., Yin, G., Ru, L. & Buijs, R.M. (2006) Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology*, 147, 283-294.

Yoo, S.H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr,

E.D., Siepka, S.M., Hong, H.K., Oh, W.J., Yoo, O.J., Menaker, M. & Takahashi, J.S. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5339-5346.

Yu, H., Tsin, A.T.C. & Reiter, R.J. (1993) Melatonin: history, biosynthesis, and assay methodology. *In Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects, and Clinical Applications. Eds: Yu HS and Reiter RJ, CRC, Press, Boca Raton, Florida*, 1-16.

Zguigal, H. & Ghoshal, N.G. (1991) Dural sinuses in the camel and their extracranial venous connections. *Anat Histol Embryol*, 20, 253-260.

Zhao, X.X., Li, X.L. & Chen, B.X. (2001) Isolation of ovulation-inducing factors in the seminal plasma of Bactrian camel (Camelus bactrianus) by DEAE-cellulose chromatography. *Reprod Domest Anim*, 36, 177-181.

Zine-Filali, R. (1991) Température corporelle du Dromadaire: effet de la privation d'eau d'abreuveument *Maghr Vet*, 5, 37-40.

Zine-Filali, R., Soubai, N. & Gueroulali, A. (1995) Fasting and basal metabolism in the camel (*Camelus dromedarius*). *Actes Inst Agron Vet*, 15, 5-9.

Zucker, I. (2001) Circannual rhythms: mammals. *In handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian Clocks, Takahashi, J.S., Turek, F.W. and Moore, R.Y. (Eds), New York: Kluwer Acacemic/ Plenum Publishers.*, 509-528.

Zucker, I., Lee, T.M. & Dark, J. (1991) The suprachiasmatic nucleus and annual rhythms of mammals. *In The suprachiasmatic nucleus:The mind's clock. Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, S.M. (Eds), New-York: Oxford University Press.*, 246-259.

ANNEXES

Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (Camelus dromedarius)

Khalid El Allali, Mohamed R. Achaâban, Béatrice Bothorel, Mohamed Piro, Hanan Bouâouda, Morad El Allouchi, Mohammed Ouassat, André Malan and Paul Pévet

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 304:R1044-R1052, 2013. First published 13 March 2013; doi: 10.1152/ajpregu.00466.2012

You might find this additional info useful...

This article cites 31 articles, 7 of which you can access for free at:
http://ajpregu.physiology.org/content/304/11/R1044.full#ref-list-1

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
http://ajpregu.physiology.org/content/304/11/R1044.full

Additional material and information about ***American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*** can be found at:
http://www.the-aps.org/publications/ajpregu

This information is current as of June 26, 2013.

American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology publishes original investigations that illuminate normal or abnormal regulation and integration of physiological mechanisms at all levels of biological organization, ranging from molecules to humans, including clinical investigations. It is published 24 times a year (twice monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2013 the American Physiological Society. ESSN: 1522-1490. Visit our website at http://www.the-aps.org/.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 304: R1044–R1052, 2013.
First published March 13, 2013; doi:10.1152/ajpregu.00466.2012.

Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (*Camelus dromedarius*)

Khalid El Allali,[1] Mohamed R. Achaâban,[1] Béatrice Bothorel,[2] Mohamed Piro,[3] Hanan Bouâouda,[1,2] Morad El Allouchi,[1] Mohammed Ouassat,[1] André Malan,[2] and Paul Pévet[2]

[1]*Comparative Anatomy Unit (Unité de recherché associée au Centre National de la Recherche Scientifique et Technique), Hassan II Agronomy and Veterinary Institute, Rabat Instituts, Rabat, Morocco;* [2]*Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, Centre National de la Recherche Scientifique, University of Strasbourg, Strasbourg, France; and* [3]*Medicine and Surgical Unit of domestic animals, Hassan II Agronomy and Veterinary Institute-Rabat, Rabat-Instituts, Rabat, Morocco*

Submitted 11 October 2012; accepted in final form 6 March 2013

Allali KE, Achaâban MR, Bothorel B, Piro M, Bouâouda H, Allouchi ME, Ouassat M, Malan A, Pévet P. Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (*Camelus dromedarius*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R1044–R1052, 2013. First published March 13, 2013; doi:10.1152/ajpregu.00466.2012.—In mammals the light-dark (LD) cycle is known to be the major cue to synchronize the circadian clock. In arid and desert areas, the camel (*Camelus dromedarius*) is exposed to extreme environmental conditions. Since wide oscillations of ambient temperature (T_a) are a major factor in this environment, we wondered whether cyclic T_a fluctuations might contribute to synchronization of circadian rhythms. The rhythm of body temperature (T_b) was selected as output of the circadian clock. After having verified that T_b is synchronized by the LD and free runs in continuous darkness (DD), we submitted the animals to daily cycles of T_a in LL and in DD. In both cases, the T_b rhythm was entrained to the cycle of T_a. On a 12-h phase shift of the T_a cycle, the mean phase shift of the T_b cycle ranged from a few hours in LD (1 h by cosinor, 4 h from curve peaks) to 7–8 h in LL and 12 h in DD. These results may reflect either true synchronization of the central clock by T_a daily cycles or possibly a passive effect of T_a on T_b. To resolve the ambiguity, melatonin rhythmicity was used as another output of the clock. In DD melatonin rhythms were also entrained by the T_a cycle, proving that the daily T_a cycle is able to entrain the circadian clock of the camel similar to photoperiod. By contrast, in the presence of a LD cycle the rhythm of melatonin was modified by the T_a cycle in only 2 (or 3) of 7 camels: in these specific conditions a systematic effect of T_a on the clock could not be evidenced. In conclusion, depending on the experimental conditions (DD vs. LD), the daily T_a cycle can either act as a zeitgeber or not.

camel; circadian clock; body temperature; daily ambient temperature; melatonin; nonphotic entrainment

RHYTHMICITY in physiological processes is a fundamental property of all living organisms (32). A number of biological functions display daily and seasonal variations in a way to anticipate and adapt to the upcoming cycling changes in environment (light, temperature, food availability, etc.). In mammals, the circadian clock, located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN), is central for these adaptive processes. This clock is a strong autonomous oscillator cycling with a period close to 24 h under constant conditions (23) and entrained by environmental cues to an exact period of 24 h. Thus SCN play a pivotal role to control numerous circadian biological rhythms such as those of body temperature (T_b), melatonin, or behavioral features. In all mammals studied, the light-dark cycle is the most powerful synchronizer (zeitgeber) of the master clock (for a review see Ref. 15). T_b rhythm represents a robust output of the clock, widely used in clinical research to determine properties of the circadian clock. However, regarding this parameter Refinetti and Menaker (25) pointed out that it is essential to distinguish endothermic from ectothermic. In large ectothermic species (e.g., crocodile, turtle, etc.) oscillations in body temperature are mainly generated by changes in the ambient tempterature (T_a) gradient without interference from the circadian clock. In contrast, in endotherms (e.g., mammals), T_b rhythms are stable and endogenously regulated by the circadian clock, with the T_a cycle apparently having no or only very weak "zeitgeber" properties (6, 22, 24). To date, most chronobiological studies in mammals have been performed on laboratory mammals and on species living in temperate regions. In arid and desert areas animals are exposed to extreme environmental conditions like dryness, rarity of water points, scarcity in food availability, and especially wide changes in T_a. In such habitats, species such as the camel, which show specific responses to T_a, are very interesting to consider. The camel is a perfect thermoregulator (homeothermic) only when hydrated. On exposure to dehydration and heat, the amplitude of T_b rhythm becomes very pronounced (6–8°C over 24 h) and follows that of T_a (29). In such conditions the camel is heterothermic, displaying adaptations to dehydration that allows this animal to save water (31, 35). We therefore assumed that T_a would be a strong environmental factor in this species, able to act on the biological clock.

The present study first investigated the existence of an endogenous clock in the camel, second, explored the response of this clock to light/dark (L/D) and T_a cycles, and third, checked whether T_b rhythm can really be considered a reliable clock output to study the circadian properties of the SCN.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

All the experimental procedures reported in this study were carried out in accordance with the recommendations for animal farm husbandry, experimentation, and surgery from the Hassan II Agronomy and Veterinary Institute of Rabat and Moroccan Ministry of Agriculture.

All animals used were adult female camels (7–12 yr) of local variety from Morocco, healthy and nonpregnant. Experiments were done in different experimental sites for agricultural research in Morocco. In the outdoor enclosures, shaded areas were present. When indoors, animals were reared in controlled sheltered stables designed

Address for reprint requests and other correspondence: P. Pévet, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, Neurobiology of Rhythms' unit UPR 3212 CNRS, Strasbourg Univ., 5 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France (e-mail: pevet@inci-cnrs.unistra.fr).

 0363-6119/13 Copyright © 2013 the American Physiological Society

to monitor photoperiod (~350 lux when lighting) and to provide either a constant temperature (± 0.3°C to 0.6°C) or temperature cycles with an amplitude of 5.98°C to 10.24°C. During the experiments, the locomotor activity was limited, and camels could only stand or sit in sternal recumbency. During *experiment 2* and to avoid the presentation of a conspicuous 24-h temporal cue, camels received a food diet four times a day (total amount equal to the normal daily intake, 19) as it is currently done in experiments on rodents. In *experiments 1, 3, 4, 5,* and *6* they received a food diet one time a day in the morning. Because of the uncertainty on the time needed to eat the food ration and especially on the delay of the transfer of nutrient energy to the body (rumination), no systematic control of a possible zeitgeber effect of feeding could be performed. Water was given ad libitum.

Three groups of camels were used in this study. *Group I* contained six females receiving a food diet of olive cake, crushed barley, wheat bran, and a cattle compound feed. They were reared in outdoor conditions in a farm located near Dakhla (latitude 23° 43′N, 15° 57′O). *Group II* consisted of eight females receiving a diet of alfalfa hay, straw, barley, and corn. Depending on the experiments, they were reared in outdoor or indoor experimental conditions in the breeding station of Ain Jamâa (latitude, 33° 34 ′N, 7° 40′W). *Group III* contained seven females receiving a diet of a specific camel compound feeding stuff (Maraa, Alf Sahel, Morocco) and straw. They were reared at the Hassan II Agronomy and Veterinary Institute in Rabat (latitude 34° 03′N, 6° 46′O) either outside or in specific animal facilities.

Temperature Measurements

For *groups I* and *II*, calibrated digital thermometers (range, 32–42°C; accuracy, 0.1°C) were inserted at a depth of 8 to 10 cm into the rectum and pressed against the back wall. Body temperature was recorded every 2 h.

For *group III*, data loggers (Thermochron, iButton, DS1922L, Dallas Maxim Integrated Products, Dallas Semi-Conductor) were used. iButtons were programmed over 28 days (16-bit resolution ± 0.0625°C; records every 10 min) and coated with silicone elastomer (Rhodorsil RTV141). For longer experiments, several sensors programmed to start at different times to cover 112 days in all were implanted in the same animal. To avoid severe surgery and to reflect correctly the internal temperature, the iButtons were implanted in the left flank (between the internal oblique and transversus abdominis muscles). This implantation site was validated beforehand by comparison with rectal temperature (data not shown). It was located midway between the last rib and the angle of the hip. Camels were anesthetized intravenously with 0.05 mg/kg of xylasine (Rompun, Bayer, Germany). Linear analgesia using 2% lidocaine (xylocaine, Astrazeneca) at a dose of 10 mg/kg was infiltrated at the site of operation. The following layers were incised: skin, cutaneus muscle, abdominal tunic, external oblique muscle, and internal oblique muscle. After iButtons implantation and suturing was completed, local disinfection was performed with neomycin spray, and the incision was protected by a bandage. Each animal was given postoperative therapy for 5 days with penicillin-streptomycin (Shotapen, Virbac, France) at a dose rate of 30,000 IU/kg for the penicillin and 10 mg/kg streptomycin, plus anti-inflammatory injections of dexamethasone 0.5 mg/10 kg (Cortaméthazone, IPV, Morocco).

Blood Samples and Melatonin Assay

As with humans, the animals were trained to accept venous sampling without analgesia. Blood samples (10 ml) were collected in heparinized vacutainer tubes, alternately from both right and left jugular veins. Samples were immediately centrifuged at 1,760 *g* for 30 min, and then plasma was stored at −20°C for subsequent melatonin assay. Plasma melatonin levels were determined by radioimmunoassay as already described for the camel (8). The inter- and intra-assay coefficients of variation were 4.4 and 5.5% for 5 pg/ml, 5.9 and 7.2 for 50 pg/ml, and 9.9 and 5.2% for 200 pg/ml, respectively. The detection limit of the assay was 1 pg per tube (10 pg/ml plasma).

Experimental Design

Experiment 1 was designed to verify whether the cyclic heat production resulting from rhythmic locomotor activity might be responsible for the T_b rhythm or would mask the endogenous rhythm. Animals (*group I*, 6 camels) were kept in outdoor enclosures under the natural photoperiod during the summer solstice (around 13.5 h-10.5 h LD cycle), and locomotor activity was totally restricted by forcing camels to sternal recumbency for 3 consecutive days (sitting up on the brisket with the legs tucked under the body, the natural sitting position).

Experiment 2 was designed to demonstrate the existence of a biological clock driving the T_b rhythm. Camels (*group II*, 8 camels) were housed in indoor stables. They were first kept for 5 days (*stage 1*) under a photoperiod mimicking the natural one at the time of the experiment, termed "indoor natural photoperiod" (summer solstice, 13.5L- 10.5D) and a T_a fixed at 22°C. Then the camels were kept under constant conditions for 5 days (*stage 2*); i.e., under DD and Ta fixed at 22°C. At the end the animals recovered for several months in an outdoor enclosure under natural photoperiod (13.5L-10.5D) and temperature. Body temperature was recorded on the first 2 days (*stage 3*, 7 camels).

Experiment 3 served to demonstrate the entrainment of the T_b rhythm by the LD cycle. Seven camels (*group III*) were placed for 10 days (*stage 1*) in a sheltered room, under an indoor photoperiod (14L-10D) without any T_a regulation. Then, during 14 consecutive days (*stage 2*), the animals were exposed to an artificial photoperiod (12L-12D, dark onset at 18:00 h) and T_a was kept constant at 22°C. Thereafter, a phase advance of 6 h was performed (onset of the dark period at 12:00 h), and the animals were maintained for 21 days under this regime (*stage 3*), the T_a being kept at 22°C. Finally, camels were placed during 8 days (*stage 4*) in the outdoor enclosure.

Experiment 4 was conducted to check if the T_b rhythm was entrained by the T_a cycle. During a 5-day adaptive period, camels (*group III*) were placed in an indoor natural photoperiod (10:45L-13:15D). The uncontrolled room temperature presented a variation of about 5°C between day and night. After these 5 days, the experiment was conducted in five stages as follows. *Stage 1*: camels were under constant light (LL) and constant temperature (CT) fixed at 22°C, for 10 days. *Stage 2*: camels were kept during 29 days under LL and an artificial daily cycle of T_a (mean of maximal and minimal temperature, respectively, 24.21°C and 18.23°C), with the heat peak during the second half of the day. *Stage 3*: camels were kept during 20 days with a 12-h phase advance of the T_a cycle (maximum 27.31°C minimum 18.19°C). *Stage 4*: camels were returned during 13 days to a T_a cycle regime similar to *stage 2*. *Stage 5*: finally during 20 days camels were placed outdoors under natural external conditions (recovery period) T_b was recorded on the first 10 days.

Experiment 5 was similar to *experiment 4* except that it was conducted under constant dim red light (DD) throughout experimentation (except *stage 1*). After adaption in outdoor conditions, camels were exposed to four experimental stages. *Stage 1*: animals were kept under a photoperiod of 12L-12D and constant T_a (22°C) for 4 days. *Stage 2*: during 17 days the camels were kept under constant T_a (22°C). *Stage 3*: the camels were submitted for 13 days to a 24-h artificial cycle of T_a (mean of maximum and minimum temperature respectively 33.08°C and 17.06°C) with heat peak during the second half of the subjective day. *Stage 4*: animals were exposed to a phase advance of 12 h of the T_a cycle (heat peak advanced by 12 h, maximum 31.91°C minimum 17.15°C) during 12 days. In this experiment another circadian clock output, melatonin rhythm was followed. Blood samples were taken in all animals every 3 h during 1 day at the end of *stage 2* (16th day), *stage 3* (12th day), and *stage 4* (11th day).

Experiment 6 was designed to investigate the relative zeitgeber impacts of the two environmental cues combined (LD and T_a cycles). Seven animals (*group III*) were kept under a photoperiodic regime of 12L-12D throughout experimentation while the T_a daily cycle was modified. *Stage 1*: camels were placed for 28 days under an artificial diurnal cycle of T_a (mean of maximal and minimal temperature respectively 29.38°C and 19.14°C). *Stage 2*: the daily T_a cycle was reversed (heat peak advanced of 12 h) for 20 days. Melatonin was also monitored during this experiment. Blood samples were taken every 3 h during 1 day at the end of *stage 1* (27th day) and *stage 2* (19th day). To avoid carry over between experiments, washout periods of several weeks in outdoor conditions were provided between *experiments 3* and *6*.

Data Analysis

Temperature data. Results are presented as means (or parameter value) ± SE. Data were treated as independent draws. All the fittings were performed by nonlinear least squares regression, with the help of Sigmaplot (Systat, Chicago, IL) or Acro software (Refinetti R, Circadian Rhythm Laboratory, University of South Carolina, http://www.circadian.org/softwar.html). Whenever possible, cosinor analysis was performed, according to the equation $f = y_0 + a \times \cos[2\pi \times (t - \varphi)/\tau]$ where f is the body temperature (°C) at time t, y_0 is the mesor of the rhythm, a is the amplitude, φ is acrophase, and τ the period (fixed to 24.0 h). The analysis was complicated by the great instability of T_b in the camel. Even within the same animal and in constant conditions, wide and unpredictable fluctuations of T_b could be observed. In addition, T_b curves often diverged notably from sinewave curves (see below), and the fittings were then rather poor. Therefore, except where indicated, results below have been obtained on pooled data, combining all animals and a given number of days for each animal When cosinor fittings were too approximate, acrophase and amplitude were concurrently determined from direct inspection of the average curves, as indicated.

When needed, period was calculated by the Lomb-Scargle periodogram procedure (27), which gives the circadian period associated with the highest statistically significant Q_p (Q_p expresses the strength of the rhythm or its robustness). Calculation was performed with τ (Refinetti R, 23).

In all experiments in which a zeitgeber was modified, the attainment of a new steady state of the temperature rhythm (after 8 days on average) was checked by nonlinear least squares procedure as above.

Melatonin data. Here, the dispersion between individuals did not allow pooling. The differences between treatments were evaluated separately for each individual. The data for each camel and each condition was fitted to a logistic peak:

$$y = y_0 + a/(\{1 + \exp[sl_1 \cdot (t_1 - t)]\} \cdot \{1 + \exp[sl_2 \cdot (t - t_2)]\})$$

where y_0 was the intercept; a is the peak height; t_1 and t_2 are the onset and offset (inflection points at half the peak height); and sl_1 and sl_2, respectively, are the onset and offset slopes at the inflection points. To simplify the process, arbitrary constant values were assigned to sl_1 and sl_2. The equation was chosen because it minimizes the dispersion of the abscissas of the inflection points and their collinearities with other parameters. The algorithm provided an asymptotic estimate (by excess) of the standard error of each parameter. It also provided a global ANOVA for the regression, which was tested with F-test. Shapiro-Wilk's test was used to test the homogeneity of residuals and Bartlett's test for the homogeneity of variances. The values obtained on this first step for the parameters y_0 and a were used as constants in further calculations. The second step consisted in comparing the (t_1, t_2) sets between the two conditions of the periodicity of T_a. A combined regression analysis was performed on the two corresponding data sets, to fit either two (t_1, t_2) sets or a single common one. The ANCOVA that followed determined whether two sets reduced the residual variance compared with the common set. This was checked by F test, with Shapiro-Wilk and Bartlett's tests to control the conditions as above. A similar procedure was employed when only the amplitudes a (peak heights) were compared.

RESULTS

Presence of an Endogenous Circadian Clock in the Camel

To make sure that the known daily T_b rhythm in the camel (29) did not result from heat production induced by locomotor activity, we first analyzed the daily rhythm of T_b in camels in forced inactivity (3 days sternal recumbent) under natural conditions (*experiment 1*). As presented in Fig. 1, these conditions they presented a daily rhythm characterized by a mesor of 37.91 ± 0.27°C, an amplitude of 2.50 ± 0.43°C, an acrophase at 18:00 ± 0.43 h, and a period of exactly 24.0 h. T_b showed its lowest level around 8:00 in the morning and then gradually increased to achieve the acrophase early in the evening. T_b acrophase was delayed by 4 h compared with T_a maximum. T_a decreased rapidly early in the night and was then stable for few hours, whereas T_b decreased slowly during the night. In all cases, T_b peaked around T_a transition. A large fraction of the T_b cycle thus occurred close to the nadir of the T_a cycle. This excluded a simple masking effect of the T_a cycle on the T_b cycle.

The circadian nature of this rhythm was demonstrated in *experiment 2*. We observed that the T_b rhythm (24.0 h period), first observed under indoor conditions with constant temperature (22°C) and indoor photoperiod mimicking the natural one, persisted when the animals were kept under DD with a period close to but clearly different from 24 h (24.5 ± 0.05 h) (Fig. 2). When the camels were replaced under outdoor natural conditions, the rhythm recovered its 24-h period. Interestingly, the amplitude of T_b rhythm increased under outdoor conditions, from 1.21 ± 0.16°C to 2.50 ± 0.35°C, suggesting that T_a can also affect directly the T_b rhythm amplitude.

Responses to Light-Dark and Ambient Temperature Cycles

In 7 camels kept under constant temperature (CT, *experiment 3*) a 6-h phase advance of LD (12 h/12 D) induced a 4-h advance in T_b acrophase estimated from the T_b rhythm curves

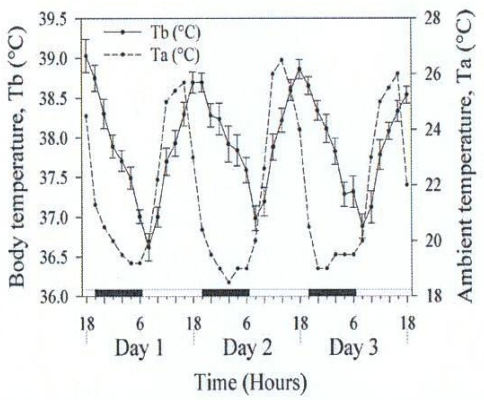

Fig. 1. Daily oscillations of body temperature (T_b) in camels exposed to natural photoperiod and fluctuations of ambient temperature (T_a) with a totally restricted locomotor activity (sternal recumbency). Solid line, average rhythm of T_b. Data points are means ± SE of 6 camels (pooled data). Dashed line, T_a. Bottom white and black bars: durations of the light and dark phases. A large fraction of the T_b peak occurred after the decline of the T_a peak. The T_b rhythm thus cannot result from a masking by T_a.

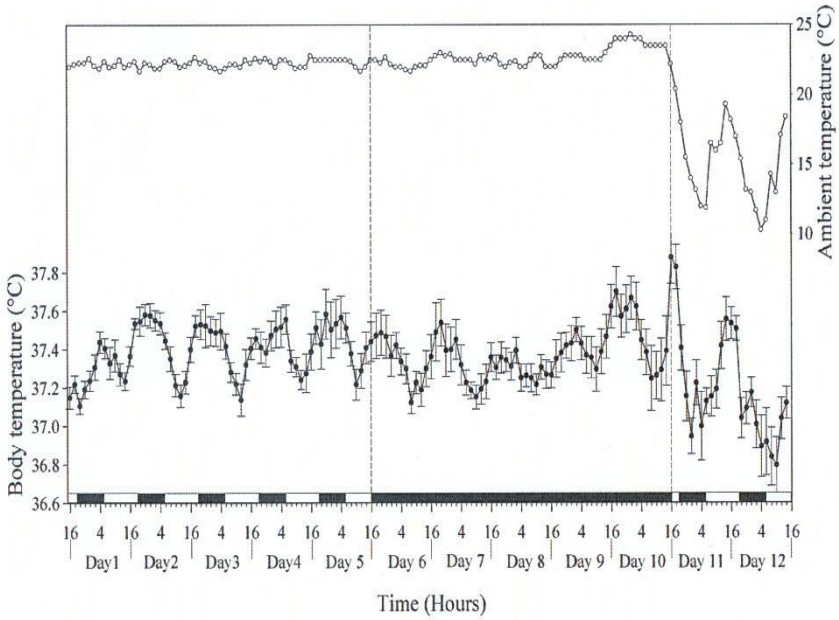

Fig. 2. Synchronization of T_b rhythm by the photoperiod, followed by free run. Solid circles, average T_b of 8 camels housed at a constant temperature, first under light-dark (LD) and then under contiuous dark (DD). Data points are means ± SE (pooled data). Open circles, T_a. Bottom white and black bars: durations of the light and dark phases. At the end of the experiment the animals recovered for 2 days in an outdoor enclosure. Under LD, period was 24.0 ± 0.01 h, acrophase 0:12 h ± 17 min, amplitude 0.86 ± 0.16°C, and mesor 37.39 ± 0.13°C. Under DD, period was 24.5 ± 0.05 h, acrophase 21:24 h ± 36 min, amplitude 1.21 ± 0.16°C and mesor 37.37 ± 0.12°C (cosinor analysis on pooled data).

(Fig. 3). When calculated by cosinor method this advance was only 1 h, but the fitting was poor with reduced amplitude. Regardless of the exact value of the phase shift of T_b, T_b was entrained by the LD cycle. Full synchronization of the T_b rhythm to the new LD cycle took about 10 days. Since the T_b rhythm was present in the absence of T_a cycle and was shifted after a phase advance of the LD cycle, it was not generated by changes in T_a but was endogenously built and entrained by the LD cycle. As previously noted in *experiment 2*, at the end of the experiment when animals returned to natural outdoor conditions T_a clearly affected the amplitude of the T_b rhythm from 0.73 ± 0.08°C to 3.55 ± 0.28°C (Fig. 3).

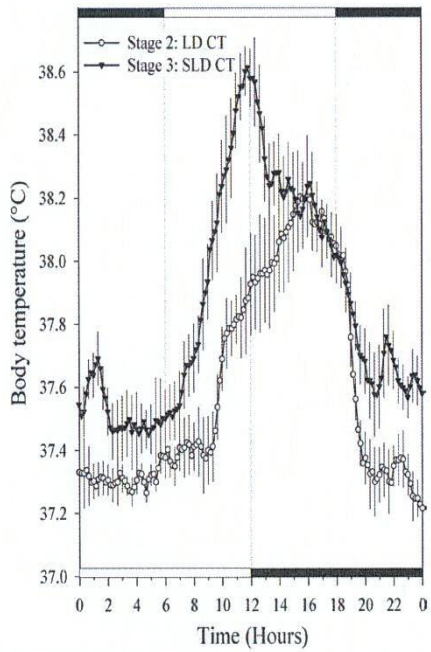

Fig. 3. Shift of the T_b rhythm induced by a shift of the LD cycle. Average 24-h rhythms of T_b of 7 camels kept under constant T_a (CT), first under a given LD schedule (*stage 2*, dark onset 18:00 h, open circles) and then after a 6-h phase advance of the LD cycle (*stage 3*, shifted light schedule, SLD, dark onset 12:00 h, closed triangles). Data points are means ± SE (pooled data), averaged for each animal over the last 5 days of each stage. White and black bars: durations of the light and dark phases, respectively in *stage 2* (*top*) and *stage 3* (*bottom*). From the first to the second LD schedule, the acrophase of T_b was shifted by 4:10 h from 16:00 to 11:50 (measured on mean curve). By cosinor analysis, the shift was only 1:00 h, from 14:43 ± 0:50 to 13:43 ± 0:58, but the fit was poor. In the first schedule, mesor was 37.59 ± 0.24°C and amplitude 0.63 ± 0.08°C. In the second, mesor was 37.86 ± 0.25°C, and amplitude 0.73 ± 0.08°C.

Under LL and constant temperature (22°C), a daily rhythm of T_b was still observed with a circadian period of 23.8 ± 0.05 h. We then tested the effects of cycling T_a on the T_b rhythm in these lighting conditions (*experiment 4*). With cycling T_a the period of T_b rhythm was exactly 24 h, suggesting that the T_a daily cycle entrained the T_b rhythm. This was confirmed by the fact that a 12-h phase advance of the T_a daily cycle led to a phase advance of the T_b rhythm after a few days. A T_b phase delay was also observed when the animals returned to the former T_a cycle (*stage 4*, Fig. 4).

A similar experimental schedule was repeated under DD (*experiment 5*). The daily T_a cycle entrained the T_b rhythm to 24 h within 3 days. When the T_a cycle was phase advanced for 12 h, the T_b rhythm followed within 6–7 days (Fig. 5).

Mesors and amplitudes of T_b differed somewhat between the above experiments. Whether the differences simply resulted from the instability of T_b or were affected by the particular conditions to which the animals were exposed could not be ascertained.

Plasma Melatonin Rhythm

Experiments 4 and *5* suggested that the T_a cycle entrained the phase and the periods of the T_b rhythm under LL or DD. T_a daily cycle thus seemed to be an environmental factor driving the rhythm of T_b. However, considering the specific flexibility of the thermoregulation in the camel, we chose to confirm these data by using in the same experimental conditions another representative output of clock activity, plasma melatonin. This was done in *experiment 5* under DD conditions. The 24-h rhythms of plasma melatonin and T_b were followed simultaneously in longitudinal studies of seven camels taken individually with each animal serving as its own control. Despite the large variations between individuals in the pattern of the melatonin rhythm (Fig. 6), a

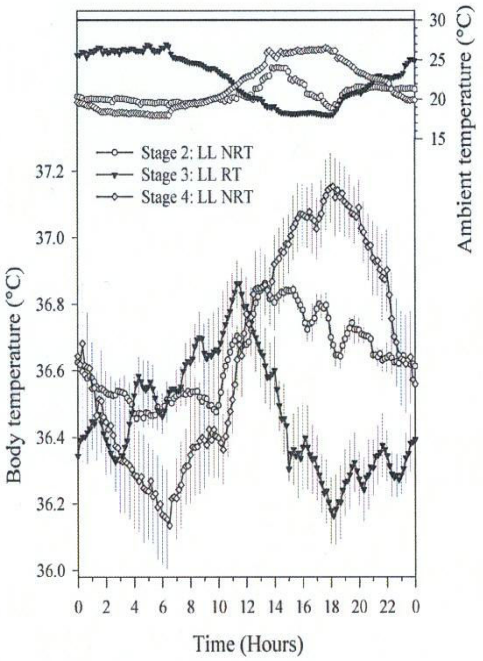

Fig. 4. The rhythm of T_b was reversibly shifted left by a phase advance of the T_a cycle in LL conditions (top white bar). *Top*: time course of T_a at each stage. Open circles, *stage 2*, T_a peak in the afternoon (nonreversed T_a cycle: NRT). Closed triangles, *stage 3*, T_a peak was advanced by 12 h (reversed T_a cycle, RT). Open diamonds, *stage 4*, T_a pattern similar to *stage 2* (NRT). *Bottom* (same symbols): corresponding T_b curves. Means ± SE of 7 camels (pooled data) averaged for each animal on the last 5 days of the stage. By cosinor analysis, in *stage 2* period was 24.0 ± 0.02 h, mesor 36.63 ± 0.13°C, amplitude 0.20 ± 0.04°C, and acrophase 16:28 ± 1.00 h. In *stage 3*, period was 24.0 ± 0.05 h, mesor 36.46 ± 0.09°C, amplitude 0.34 ± 0.07°C, and acrophase 9:19 ± 1:28 h. In *stage 4*, period was 24.0 ± 0.16 h, mesor 36.66 ± 0.16°C, amplitude 0.51 ± 0.09°C, and acrophase 17:45 ± 0:25 h.

melatonin peak was present in DD at constant temperature (data not shown). Application of a T_a daily cycle (high temperature at the end of the subjective day) did not change this rhythm. When the T_a daily cycle was phase advanced, the melatonin rhythms were also shifted. The phase difference was significant for all animals, except camel C4 in which only the difference for onsets was significant (Table 1). Under all these conditions, melatonin rhythm peaked when the T_a cycle was at its nadir. It was therefore not the result of masking by the T_a cycle. Thus in the camel the daily cycle of T_a entrains both melatonin and T_b rhythms. Therefore, the cycle of temperature is a real "zeitgeber" for the circadian clock in the camel.

Can Body Temperature Rhythm Really be Considered a Reliable Clock Output to Study Circadian Properties of the SCN?

What would happen if both zeitgebers, the LD and T_a daily cycles were applied simultaneously, either in phase or in phase opposition? In *experiment 6*, seven camels kept under LD 12:12 and a T_a daily cycle with higher values at the end of the afternoon presented a classical T_b rhythm (mesor 35.90 ± 0.23°C and amplitude of 0.64 ± 0.10°C). As in *experiment 5*, the 12-h phase advance of the T_a daily cycle also generated a phase advance of the T_b rhythm (mesor 36.07 ± 0.29°C and amplitude 0.64 ± 0.15°C) (Fig. 7). This result would suggest that the T_a daily cycle is a more powerful synchronizer than the LD cycle. However, the second clock output, the melatonin rhythm was not strongly affected by a 12-h shift of the daily T_a cycle (Fig. 8). Indeed the melatonin peak was significantly shifted only in camels C2, C3, and C6 (Table 2). Compared with DD, however (Fig. 6), the shifts were much smaller. The daily T_a cycle that could entrain the central clock under DD, as determined by two SCN outputs, was not able to do so under LD conditions or had only a weak effect. Interestingly, when the animals were submitted to a daily T_a cycle with high values during the night, a small increase of T_b was observed at the end of the afternoon at the time when T_b was usually increasing (Fig. 7, arrow). This small peak in T_b may have been the result of a signal from the clock masked by the direct effect of the T_a cycle. Thus depending on the experimental conditions (DD vs. LD), the daily T_a cycle can or cannot act as a zeitgeber, and consequently, the rhythm of T_b can or cannot be considered as a reliable output of the clock.

DISCUSSION

Circadian Nature of the T_b Rhythm

Previous studies showed the existence of a daily rhythm of T_b in the camel (29, 31). Depending on environmental conditions, the camel could be homeothermic or heterothermic and could present phases of homeothermy and heterothermy even within the same day (Bouaouda H. et al., unpublished data). The exact nature of this T_b rhythm was not known. In this study, for the first time, we clearly identify the environmental conditions in which T_b can be identified as a true circadian rhythm (under constant temperature and LL or DD) with a period close to 24 h. Thus in the camel as

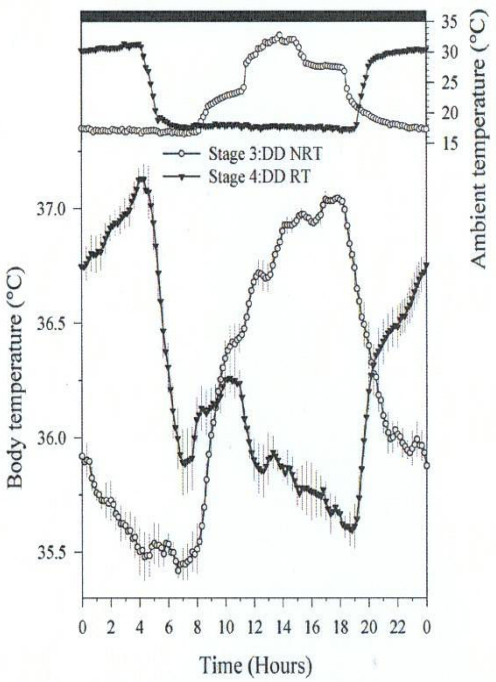

Fig. 5. Shift of the rhythm of T_b by a 12-h shift in the rhythm of T_a in DD conditions (top black bar). *Top*: time course of T_a at each stage. Open circles, *stage 3*, T_a peak in the afternoon. Closed triangles, *stage 4*, T_a peak advanced by 12 h. *Bottom* (same symbols): corresponding T_b curves. Means ± SE of 7 camels (pooled data) averaged for each animal on the last 5 days of the stage. By cosinor analysis, in *stage 3* period was 24.0 ± 0.1 h, mesor 36.19 ± 0.06°C, amplitude 0.81 ± 0.22°C, and acrophase 15:57 ± 0:30 h. In *stage 4*, period was 24.0 ± 0.07 h, mesor 36.25 ± 0.14°C, amplitude 0.76 ± 0.15°C, and acrophase 02:36 ± 1:08 h.

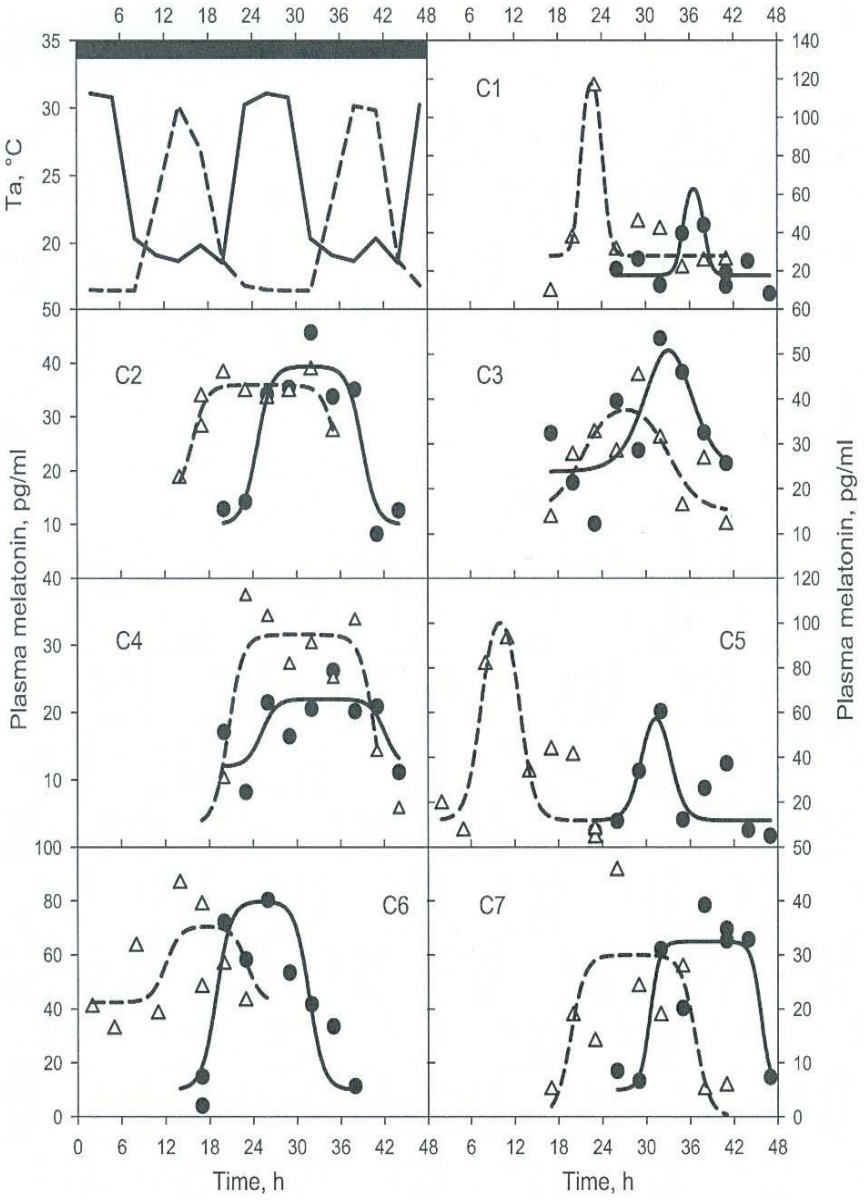

Fig. 6. Individual rhythms of plasma melatonin in the 7 camels in DD conditions. *Top left*: T_a rhythm, either in control conditions (solid line) or phase-advanced by 11 h (dashed line). Other panels: individual melatonin data (symbols) for camels C1 to C7, with fitted curves (logistic peaks). Closed circles and solid line, control rhythm of T_a. Open triangles and dashed line, Phase-advanced T_a rhythm. In all camels, both the onset and offset of melatonin peak were phase advanced, except for camel 4 in which only the onset was significantly shifted (see Table 5).

in other mammals (laboratory and farm animals, as well as humans: 3, 13, 19–21, 28, 34), the T_b rhythm is generated by the circadian clock. In LL, the period of the T_b rhythm is shorter than 24 h, thus following Aschoff's rule (2) for a diurnal animal. Correspondingly, in DD the period is longer than 24 h.

The daily LD cycle is known in mammals to be a powerful zeitgeber that synchronizes the clock to exactly 24 h regardless of seasons or latitudes. LD cycle seems to be a strong zeitgeber also in the camel. With the use of the T_b and melatonin rhythms as parameters, the circadian clock of the camel shifts its cycle

Table 1. *Constant darkness*

	Control		Phase-Advanced 11 h		Difference	
Animal	t_1	t_2	t_1	t_2	$F(2,14)$	P
C1	21.1 ± 1.0	0.2 ± 2.9	11.1 ± 0.3	14.1 ± 0.3	50.2	<0.0001
C2	0.0 ± 1.4	15.8 ± 1.3	4.0 ± 1.4	11.6 ± 1.4	49.4	<0.0001
C3	7.1 ± 1.6	11.2 ± 1.6	21.3 ± 1.6	9.2 ± 1.6	7.9	0.005
C4	20.6 ± 1.1	16.7 ± 1.0	1.2 ± 1.7	18.1 ± 1.8	3.3	0.068*
C5	6.9 ± 1.0	13.4 ± 0.9	5.5 ± 0.9	9.2 ± 1.0	5.2	0.021
C6	12.1 ± 2.4	23.1 ± 2.1	18.9 ± 1.0	7.7 ± 0.9	5.5	0.018
C7	19.7 ± 1.3	12.7 ± 1.5	6.5 ± 1.3	21.7 ± 1.2	18.4	0.0001

Analysis of the onset (t_1) and offset (t_2) of plasma melatonin peak (h, ± SE) after the shift in the ambient temperature (T_a) cycle in each camel (a longitudinal study). Onset of T_a increase: Control 14:00; phase-advanced 11 h 1:00. Normality test (Shapiro-Wilk) passed for all. Constant variance test passed for all except C5 ($P = 0.038$, just below threshold). *In camel C4, difference for onsets only was significant ($F_{1,16} = 6.7$; $P = 0.020$). Melatonin peaks were thus significantly shifted by change in period of T_a in all camels.

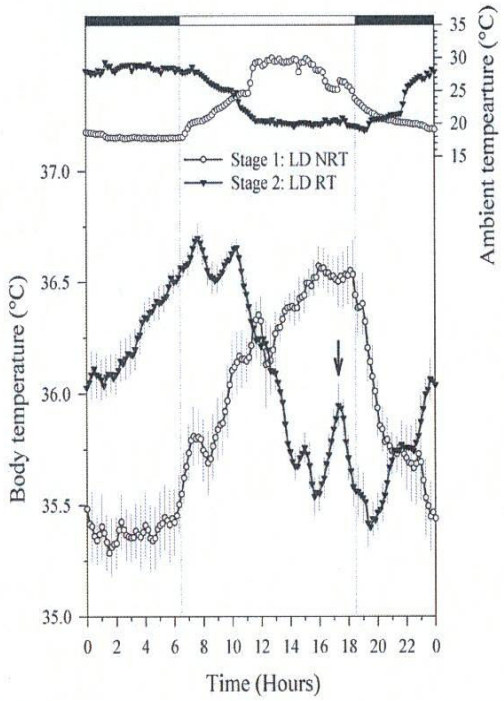

Fig. 7. Same T_a pattern as in Fig. 5, this time in LD conditions (top black and white bar). Open circles, *stage 1*, nonreversed T_a cycle, NRT. Closed triangles, *stage 2*, reversed T_a cycle RT. By cosinor analysis, acrophase was 15:05 ± 0:15 h in *stage 1*, and 7:09 ± 0:25 h in *stage 2*. Notice the accessory peak of T_b after T_a rhythm has been shifted, coinciding with the peak of T_b in control conditions.

after phase advances and phase delays of the LD cycle as classically described in the literature (5, 12, 16).

Daily Cycle of T_a as a Zeitgeber

Camels are exposed to very wide environmental changes in their biotope. One of these is characterized by the amplitude of the daily T_a cycle which, associated or not with dehydration, is fundamental for the processes of adaptation to desert life. We thus have to consider the daily T_a cycle as an important cue for the circadian system. Under LL or DD (absence of photic synchronizers), applying a 24-h artificial T_a cycle with a maximum of heat during the second half of the subjective day entrained the T_b rhythm to exactly 24 h with an acrophase at the end of the subjective day. A 12-h phase advance of the daily T_a induced a clear phase advance of the T_b rhythm within a few days. Similarly, reversal of this phase induced a few days later a resynchronization of the T_b rhythm. Clearly in the camel, under the absence of the LD signal, the daily cycle of T_a is able to entrain the T_b rhythm. Is it the result of a true entrainment of the clock or from a masking effect of T_a on parameters of temperature regulation? T_b depends essentially on metabolic heat production, heat load (radiant, conductive and convective), evaporative water loss, and thermal conductance (heat transfer coefficient). Any significant heat generation from locomotion is very unlikely, since *1*) the absence of such masking was conclusively checked in *experiment 1*, and *2*) in *experiments 3* to *6* the animals were confined in a room, which precluded any significant energy expenditure from locomotion. Shivering at 17°C (Fig. 5) is very unlikely in an animal well insulated by a thick fur whose conductance is about 200-fold smaller than that of a mouse. Any radiant heat load would have occurred at the peak of T_a. The peak of T_b should therefore be close to that of T_a. In Fig. 5, in the DD NRT condition it is clearly shifted to the right, and in Fig. 1 the right shift is even larger. Evaporative water loss has not been measured here. According to Schmidt-Nielsen et al. (30) it is constant and minimal below a T_a of 36°C. The only remaining possibility would be heat loading due to changes in thermal conductance C. The observed cycle of T_b (Fig. 5) would require *1*) a step decrease of C below a T_b of 35.6°C, *2*) a step increase of C above 37.0°C, and *3*) a linear variation of C between these two thresholds. Such a complex pattern is very unlikely. The present results cannot therefore result from masking.

Masking by temperature cannot be responsible, either, for the observed zeitgeber effects on melatonin cycle (Fig. 6). Temperature is not considered a major factor of plasma melatonin concentration. Moreover, in six of seven camels, melatonin peaks occurred out of phase of the periodic increase in T_a, or even in opposition.

The parallel analysis of the effects of daily cycles of T_a on two well-known outputs of the circadian clock (T_b and melatonin rhythm) in DD conditions has therefore demonstrated that the daily T_a cycle is able to entrain both circadian clock outputs. T_a cycle is thus a true zeitgeber. The present study seems to be the first demonstration that T_a daily cycle can be used as zeitgeber in a mammal. The T_a cycle is known to be a primordial entraining agent in all ectotherms (9, 26). In endothermic vertebrates, however, especially in mammals, the few earlier studies on the impact of T_a daily cycle on rhythms have concluded either that the rhythms did not respond to this cue (6, 11) or that it was a very weak zeitgeber that did not entrain constantly: entrainment of locomotor activity rhythm was obtained in 45% of the cases in squirrel monkeys (4), in 2 of 6 marmosets (18), in 3 of 7 palm squirrels (22), and in 60 to 80% of mice (24) In addition, masking by temperature, warm-active or cool-active, was noticed in three studies (4, 18, 22) while in the fourth such an effect was considered as possible (24). It should not be concluded that the present observation is valid only for the camel. Comparative studies, especially on species exposed to wide fluctuations of ambient temperature in their biotopes, are likely to show that this phenomenon is not uncommon in mammals.

T_b Rhythm is Not Always a Reliable Output of the Circadian Clock

T_b rhythm is often used as a marker (a clock output) to study the properties of the circadian clock. In clinical research where invasive techniques are difficult to apply, T_b rhythms are largely used (1, 7, 14, 10, 33). This requires that T_b rhythm constitute a well-characterized and reliable clock output.

As shown here, when camels where simultaneously submitted to LD and to a daily T_a cycle, a clear T_b rhythm was present. When the T_a cycle was shifted by 12 h, the T_b rhythm also shifted within a few days, demonstrating that the T_a cycle is able to entrain the T_b rhythm even in the presence of LD cycle. In this paradigm, it might be concluded that the daily T_a cycle is a more powerful zeitgeber than the LD cycle. However, under identical LD conditions the T_a daily cycle was not able to entrain the rhythm of melatonin. Consequently, in these conditions the T_a daily cycle did not entrain the circadian clock. However, we cannot exclude that a T_a cycle with higher amplitude (similar to that observed in the desert) might have a significant effect.

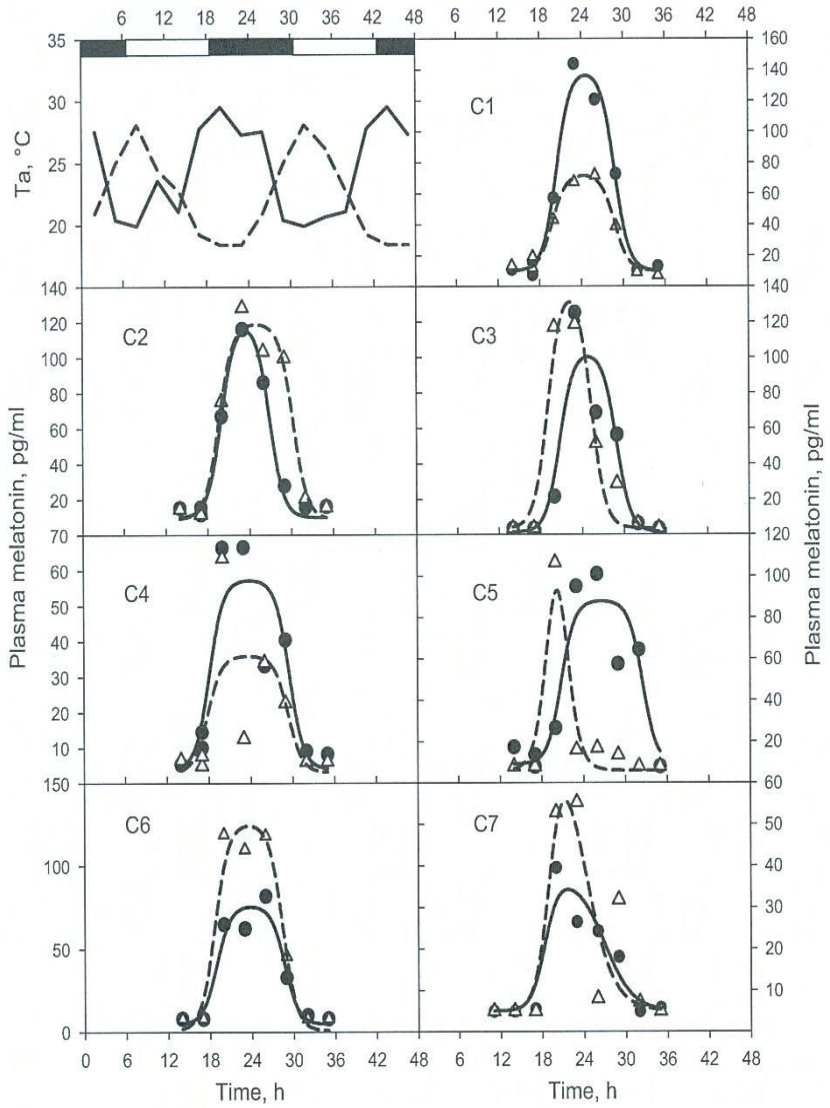

Fig. 8. Same as Fig. 6, this time in LD conditions. The shift in T_a rhythm no longer induced statistically significant changes in the positions of melatonin peaks, except in camels C2 (offset), C3 (onset and offset), and C5 (onset). However, these shifts were too small to have a biological significance (cf Table 6).

The entrained T_b rhythm observed in the experimental conditions above looks like a direct effect of T_a on thermal regulation independent of the circadian clock. Most probably, the T_b rhythm reflects the T_a cycle through a passive heat exchange with the environment, a phenomenon known to exist in the dehydrated camel. This interpretation is reinforced by the persistence of a small accessory peak on the T_b rhythm at the end of the light period when the T_a cycle is in phase opposition with the LD cycle (shifted conditions, Fig. 7). This might correspond to an endogenous clock signal masked in those experimental conditions. Clearly, when camels are submitted to both LD and T_a cycles at the same time, the T_b rhythm cannot be considered as an output of the clock. Again, is this observation specific to the camel? It is presently impossible to answer this question presently because it

Table 2. *Photoperiod LD 12:12*

	Control		Shifted T_a Cycle		Difference	
Animal	t_1	t_2	t_1	t_2	$F(2,14)$	P
C1	20.5 ± 0.2	4.8 ± 0.2	19.9 ± 0.4	4.8 ± 0.4	1.1	NS
C2	20.1 ± 0.2	2.7 ± 0.3	19.6 ± 0.2	6.3 ± 0.3	47.3	<0.0001
C3	20.9 ± 0.7	4.7 ± 0.6	18.7 ± 0.6	1.9 ± 0.6	6.9	0.008
C4	18.1 ± 0.9	5.6 ± 1.0	17.7 ± 1.3	5.8 ± 1.8	0.1	NS
C5	20.8 ± 0.7	8.5 ± 0.7	19.2 ± 0.5	21.3 ± 0.6	53.1	<0.0001
C6	19.0 ± 0.6	4.7 ± 0.6	18.7 ± 0.3	4.5 ± 0.3	0.2	NS
C7	18.5 ± 1.2	2.4 ± 1.5	19.1 ± 0.6	0.1 ± 0.8	1.1	NS

Analysis of the t_1 and t_2 of plasma melatonin peak (h, ± SE), after the shift in the T_a cycle, in each of the camel longitudinal study. Onset of T_a increase: Control 14:00; Shifted T_a Cycle 1:00. Normality test (Shapiro-Wilk) passed for C2, C3, and C5. Constant variance test passed for C2 and C6. Melatonin peaks were significantly shifted by change in period of T_a in camels C2, C3, and C5. NS, not significant.

has never been carefully studied in other mammalian species, including classical laboratory rodents. However, the present study suggests that a great deal of caution should be exercised when circadian clock properties are measured using only T_b as a parameter. Combined measurement of different circadian outputs (at least 2) should be performed routinely.

Perspectives and Significance

The effect of daily T_a cycle is very strong in the camel. Depending on the environmental context, it controls the expression of the daily T_b rhythm either by a direct action on the clock or through an action on thermal regulation. Such a regulation had so far never been described. It may be related to the habitat of the camel (desert and arid zones). Is it specific to the camel and other desert mammals, or is it also present in other mammals? This remains to be investigated. The other important conclusion of the present work is that a well-identified clock output, the T_b rhythm, used widely in fundamental and clinical research, may or may not be considered as an output of the clock depending on the environmental conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Moroccan Ministry of Agriculture, the staff of the breeding station of Ain Jamâa, Professor Mohamed Oukessou and colleagues of the Physiology Unit of Hassan II Agronomy & Veterinary Institute, Dr. Dominique Ciocca from the Strasbourg's Chronobiotron, and Christiane Calgari for their kind help. We are also grateful to Dr. David Hicks for correction of the language.

GRANTS

This work was supported by a scientific exchange program between Morocco and France Programme de recherche Agronomique pour le Développement, (PRAD n°05/07-03/10-11:09), the Programme Fédérateurs de Recherche - Développement en agriculture (PROFERD) of Moroccan Ministry of Agriculture, the Belgian development agency (CTB) fellowship, by the national center of scientific and technical research (Centre National de la Recherche Scientifique et Technique), the GDRI Neuro CNRS-CNRST GDRI (France Morocco) and the European Neuromed program.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: K.E.A. and P.P. conception and design of research; K.E.A., M.R.A., B.B., M.P., H.B., M.E.A., and M.O. performed experiments; K.E.A., B.B., A.M., and P.P. analyzed data; K.E.A., A.M., and P.P. interpreted results of experiments; K.E.A. and A.M. prepared figures; K.E.A. and P.P. drafted manuscript; K.E.A., A.M., and P.P. edited and revised manuscript; K.E.A., A.M., and P.P. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. **Arendt J.** Melatonin: characteristics concerns, prospects. *J Biol Rhythms* 20: 291–303, 2005.
2. **Aschoff J.** Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 25: 11–27, 1960.
3. **Aschoff J, Gerecke U, Wever R.** Desynchronization of human circadian rhythms. *Jap J Physiol* 17: 450–457, 1967.
4. **Aschoff J, Tokura H.** Circadian activity rhythms in squirrel monkeys: entrainment by temperature cycles. *J Biol Rhythms* 1: 91–99, 1986.
5. **Benstaali C, Mailloux A, Bogdan A, Auzéby A, Touitou Y.** Circadian rhythms of body temperature and motor activity in rodents their relationships with the light-dark cycle. *Life Sci* 68: 2645–2656, 2001.
6. **Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS.** Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330: 379–385, 2010.
7. **Darwent D, Zhou X, van den Heuvel C, Sargent C, Roach GD.** The validity of temperature-sensitive ingestible capsules for measuring core body temperature in laboratory protocols. *Chronobiol Int* 28: 719–726, 2011.
8. **El Allali K, Achaaban MR, Vivien-Roels B, Bothorel B, Tligui NS, Pévet P.** Seasonal variations in nycthemeral rhythm of plasma melatonin in the camel (*Camelus dromedarius*). *J Pineal Res* 39: 121–128, 2005. (Erratum: *J Pineal Res* 40: 194, 2006.)
9. **Glaser FT, Stanewsky R.** Temperature synchronization of the drosophila circadian clock. *Current Biol* 15: 1352–1363, 2005.
10. **Heikens MJ, Gorbach AM, Eden HS, Savastano DM, Chen KY, Skarulis MC, Yanovski JA.** Core body temperature in obesity. *Am J Clin Nutr* 93: 963–967, 2011.
11. **Hoffmann K.** Die relative Wirksamkeit von Zeitgebem. *Oecologia (Berl)* 3:184, 1969.
12. **Honma K, Honma S, Wada T.** Phase-dependent shift of free-running human circadian rhythms in response to a single bright light pulse. *Experientia* 43: 1205–1207, 1987.
13. **Kuwabara N, Seki K, Aoki K.** Circadian, sleep and brain temperature rhythms in cats under sustained daily light-dark cycles and constant darkness. *Physiol Behav* 38: 283–289, 1986.
14. **Markwald RR, Lee-Chiong TL, Burke TM, Snider JA, Wright KP Jr.** Effects of the melatonin MT-1/MT-2 agonist ramelteon on daytime body temperature and sleep. *Sleep* 33: 825–831, 2010.
15. **Meijer JH, Michel S, Vansteensel MJ.** Processing of daily and seasonal light information in the mammalian circadian clock. *Gen Comp Endocrinol* 152: 159–164, 2007.
16. **Murphy BA, Elliott JA, Sessions DR, Vick MM, Kennedy EL, Fitzgerald BP.** Rapid phase adjustment of melatonin and core body temperature rhythms following a 6-h advance of the light/dark cycle in the horse. *J Circadian Rhythms* 5: 5, 2007.
17. **Nelson W, Tong YL, Lee JK, Halberg F.** Methods for cosinor rhythmometry. *Chronobiologia* 6: 305–323,1979.
18. **Pálková M, Sigmund L, Erkert HG.** Effect of ambient temperature on the circadian activity rhythm in common marmosets, *Callithrix j. jacchus* (primates). *Chronobiol Int* 16 : 149–161, 1999.
19. **Piccione G, Caola G, Refinetti R.** The circadian rhythm of body temperature of the horse. *Biol Rhythm Res* 33: 113–119, 2002.
20. **Piccione G, Caola G, Refinetti R.** Circadian rhythms of body temperature and liver function in fed and food-deprived goats. *Comparative Biochem Physiol* 134: 563–572, 2003.
21. **Pickard GE, Kahn R, Silver R.** Splitting of the circadian rhythm of body temperature in the golden hamster. *Physiol Behav* 32: 763–766, 1984.
22. **Rajaratnam SM, Redman JR.** Entrainment of activity rhythms to temperature cycles in diurnal palm squirrels. *Physiol Behav* 63: 271–277, 1998.
23. **Refinetti R.** *Circadian Physiology*. Boca Raton, FL: CRC, 2006.
24. **Refinetti R.** Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice. *J Biol Rhythms* 25: 247–256, 2010.
25. **Refinetti R, Menaker M.** The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav* 51: 613–637, 1992.
26. **Rensing L, Ruoff P.** Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int* 19: 807–864, 2002.
27. **Ruf T.** The Lomb-Scargle periodogram in biological rhythm research: analysis of incomplete and unequally spaced time-series. *Biol Rhythm Res* 30: 178–201, 1999.
28. **Satinoff E, Liran J, Clapman R.** Aberrations of circadian body temperature rhythms in rats with medial preoptic lesions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 242: R352–R357, 1982.
29. **Schmidt-Nielsen K.** *Desert Animals: Physiological Problems of Heat and Water*. Oxford, UK: Clarendon, 1964.
30. **Schmidt-Nielsen K, Crawford EC Jr, Newsome AE, Rawson KS, Hammel HT.** Metabolic rate of camels: effect of body temperature and dehydration. *Am J Physiol* 212: 341–346, 1967.
31. **Schmidt-Nielsen K, Schmidt-Nielsen B, Jarnum SA, Houpt TR.** Body temperature of the camel and it's relation to water economy. *Am J Physiol* 188: 103–112, 1957.
32. **Turek FW, Van Reeth O.** Circadian rhythms. In: *Handbook of Physiology. Environmental Physiol*ogy, edited by Fregly MJ and Blatteis CM. Bethesda, MD: Am. Physiol Soc., 1996, sect. 4, vol. II, chapt. 58, p. 1329.
33. **Uchiyama M, Mayer G, Okawa M, Meier-Ewert K.** Effects of vitamin B12 on human circadian body temperature rhythm. *Neurosci Lett* 192: 1–4, 1995.
34. **Wever R.** Phase shifts of human circadian rhythms due to shifts of artificial zeitgebers. *Chronobiologia* 7: 303–327,1980.
35. **Yagil R.** The desert camel. Comparative physiological adaptation. In: *Comparative Animal Nutrition*, edited by Yagil R. Basel, Switzerland: Karger, 1985.

Physiological Reports

Open Access

Physiological Reports ISSN 2051-817X

ORIGINAL RESEARCH

Daily regulation of body temperature rhythm in the camel (*Camelus dromedarius*) exposed to experimental desert conditions

Hanan Bouâouda[1,2], Mohamed R. Achâaban[2], Mohammed Ouassat[2], Mohammed Oukassou[2], Mohamed Piro[3], Etienne Challet[1], Khalid El Allali[2,*] & Paul Pévet[1,*]

1 Department of Neurobiology of Rhythms, CNRS UPR 3212, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, University of Strasbourg, Strasbourg, France

2 Comparative Anatomy Unit (URAC CNRST 49), *Hassan II Agronomy* and *Veterinary* Institute, Rabat, Morocco

3 Medecine and Surgical Unit of domestic animals, *Hassan II Agronomy* and *Veterinary* Institute, Rabat,Morocco

Keywords

Adaptive heterothermy, body temperature rhythm, camel, circadian clock, dehydration, food decrease, heat stress.

Correspondence

Paul Pévet, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, Neurobiology of Rhythms' unit, UPR 3212 CNRS, Strasbourg University, 5 rue Blaise Pascal - 67000 Strasbourg, France.

Tel: +33 3 88 45 66 08

Fax: +33 3 88 45 66 54

E-mail: pevet@inci-cnrs.unistra.fr

Funding Information

This work was supported by a Scientific Exchange Program between Morocco and France (PRAD n 11-09), by the Moroccan National Center of Scientific and Technical Research (CNRST: URAC-49), by the Eiffel Excellence Scholarships awarded by the French Ministry of Foreign Affairs, by the Health and Life Sciences Doctoral School of Strasbourg University, France, and by the European Doctoral College of Strasbourg, by the GDRI Neuro (CNRS-CNRST-INSERM, France-Maroc)

Received: 1 August 2014; Revised: 11 August 2014; Accepted: 12 August 2014

doi: 10.14814/phy2.12151

Physiol Rep, 2 (9), 2014, e12151, doi: 10.14814/phy2.12151

*P. Pévet, K. El Allali have had equally the responsibility of this work.

Abstract

In the present work, we have studied daily rhythmicity of body temperature (Tb) in Arabian camels challenged with daily heat, combined or not with dehydration. We confirm that Arabian camels use heterothermy to reduce heat gain coupled with evaporative heat loss during the day. Here, we also demonstrate that this mechanism is more complex than previously reported, because it is characterized by a daily alternation (probably of circadian origin) of two periods of poikilothermy and homeothermy. We also show that dehydration induced a decrease in food intake plays a role in this process. Together, these findings highlight that adaptive heterothermy in the Arabian camel varies across the diurnal light–dark cycle and is modulated by timing of daily heat and degrees of water restriction and associated reduction of food intake. The changed phase relationship between the light–dark cycle and the Tb rhythm observed during the dehydration process points to a possible mechanism of internal desynchronization during the process of adaptation to desert environment. During these experimental conditions mimicking the desert environment, it will be possible in the future to determine if induced high-amplitude ambient temperature (Ta) rhythms are able to compete with the zeitgeber effect of the light–dark cycle.

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Rhythmicity is a fundamental property of all living organism. In mammals, the circadian clock, located in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN) is central for these rhythmic processes and plays a pivotal role to control numerous circadian biological rhythms such as those of melatonin synthesis and secretion, behavioral features, or body temperature (Tb). In most mammals, rhythmic Tb represents a robust output of the master clock in the SCN, widely used in fundamental and clinical research to determine properties of the SCN clock. In a recent work, we observed that the daily Tb rhythm in the camel is a true circadian rhythm entrainable by environmental cues (light–dark cycle as in other mammals, but also the ambient temperature (Ta) cycle). However, we also demonstrated that, in some specific experimental conditions, a direct effect of Ta on thermal regulation (thus on Tb) is present El Allali et al. (2013). This suggests that in camel, which is known to present specific responses to Ta, the daily Tb rhythm is controlled by a complex mechanism. The aim of the present work was thus to study the nature of daily Tb rhythm in the camel and to determine its relationship with the circadian system under challenging conditions mimicking the desert environment.

The Camel (*Camelus dromedaries*) is not only able to adapt its physiological processes to the hostile environment of arid and desert areas but also capable of maintaining synthesis of hair, wool, muscles, milk, and in these conditions (Bengoumi and Faye 2002). Unlike small desert animals, camels are continuously exposed to heat, solar radiation, and lack of water and food. The camel's exceptional performance in the hot desert climate results from unique behavioral, anatomical, and physiological features to economize water by reducing the metabolic rate and regulating body temperature (Tb). The so-called "adaptive heterothermy" in the dromedary camel was discovered more than 50 years ago (Schmidt-Nielsen et al. 1957). In the absence of heat stress and with free access to water, the daily rhythm (controlled by circadian processes; see (El Allali et al. 2013) in rectal temperature presents an amplitude of about 2°C (the animal being then a perfect thermoregulator or homeotherm). During dehydration and heat stress, the amplitude of daily Tb rhythm exceeds 6°C (thermoconformer or poikilotherm) (Schmidt-Nielsen et al. 1957). This variation in Tb in great excess of the limits of homeothermy has been advanced as a key adaptation of camels to their arid life (Schmidt-Nielsen 1964), (Schmidt-Nielsen et al. 1967), (MacFarlane et al. 1963), (Dahlborn et al. 1987), (Schroter et al. 1989), (Zine-Filali 1991), (Ayoub and Saleh 1998), and (Bengoumi and Faye 2002). High amplitude in daily Tb rhythm is thus induced in the camel by privation of water and exposure to high Ta. Under these conditions, the Tb rhythm seems partly to follow that of Ta.

Our aim was thus to characterize the daily/circadian pattern of the Tb rhythm, in the specific conditions of adaptive heterothermy in response to daily heat with or without additional dehydration. Even if the capacity of the camel to exhibit a heterothermic state has been confirmed by different independent groups (Schroter et al. 1989), (Bengoumi and Faye 2002), (Robertshaw and Zine-Filali 1995) and (Ayoub and Saleh 1998), one author (Al-Haidary 2005) challenged that observation. Consequently, using the new technical tools developed to follow circadian parameters of Tb (see El Allali et al. 2013), we have characterized the adaptive heterothermic process according to the circadian/daily expression of Tb. It is also known that during experimental dehydration and heat stress, camels greatly decrease their food consumption. To our knowledge, the consequence of this decrease in food intake on the adaptive heterothermic process has not been previously studied. We thus decided to investigate the possible effects of food shortage on this process.

Experimental procedures

Animals

All the experimental procedures reported in this study were carried out in accordance with the recommendations for animal farm husbandry, experimentation, and surgery from the Hassan II Agronomy and Veterinary Institute of Rabat and of the Moroccan Ministry of Agriculture.

Six animals used were adult female camels (9–13 years), healthy, and nonpregnant of the local Moroccan variety. The experiments took place between July and August 2010, and during July 2011, in the veterinarian institute in Rabat, Morocco (34°1′12″N/6°49′48″W). The animals were kept for both experiments in controlled sheltered stables designed to monitor photoperiod and Ta. The animal could stand or sit in sternal recumbency comfortably (sitting up on the brisket with the legs tucked under the body, the natural sitting position in camel). LD cycle 12:12 was maintained automatically with timers, light on at 8:00 AM and off at 08:00 PM (about 350 lux during the lighting period). Entrance of stable was gated with Safety Access System (SAS) to avoid external light exposure. "Cold" ambient temperature of 20–25°C (at the end of dark period) was obtained using six air conditioners with total power of 75,000 BTU. High ambient temperature (38–46°C at the end of light period) was obtained using nine electric heaters. The relative humidity (RH) of ambient air was, on average, 30% as measured

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

by a hygrometer (Model STHW, Thermo Hygrometer electronic).

Surgery and Tb measurement

Tb was recorded using small temperature-sensitive data loggers (Thermochron®: iButton, DS1922L, Dallas Maxim Integrated Products, Dallas, TX) embedded in a Paraffin/Elvax coating (Mini Mitter, Sunriver, OR) to make them waterproof and biologically inert. After waxing, the logger weighed 3.62 g and had a maximum diameter and a maximum height of 18.76 mm and 8.74 mm successively. IButtons had been programmed to record every 10 min on 16-bit resolution (0.0625°C). The operating temperature range of Thermochron iButtons used was −40°C to +85°C (for further details on the use of iButtons, see (Davidson et al. 2003). Eight days prior to the study initiation, all camels were implanted surgically with such data loggers. The procedure was performed in fasting animals, food being withheld for 24 h and water for 12 h before surgery. Camels were tranquilized intravenously with 0.05 mg/kg of xylasine (Rompun; Bayer, Leverkusen, Germany). The camels were then maintained in sternal recumbency and the left flank was shaved and the surgical site (implantation site validated in former experiment, (El Allali et al. 2013) sterilized with 1% iodine solution and rinsed with 70% alcohol. For analgesia, 2% lidocaine (xylocaine Laprophan S.A., Maroc) at a dose of 10 mg/kg was infiltrated at the site of operation. The loggers were implanted under the deep musculature of the left flank (between the internal oblique muscle and transversus abdominis muscle), via a vertical incision (6 cm length) in the paralumbar fossa. Incisions were then sutured and treated with a topical antiseptic spray (Aluspary, Vetoquinol, Lure, France). Each animal was given postoperative therapy, a long-acting antibiotic (100 mg IM, oxytetracyclin, ENGEMYCIN 10%, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Milton Keynes, UK). At the end of experiment, the data loggers were surgically removed using the same protocol.

The implantation site was validated in earlier experiments performed in our laboratory. These involved implanting iButtons in different places within the camel's body: in the right and left flank, in the thigh between muscles, intrahump, intravaginal; and to control the exchange with the ambient temperature, subcutaneously at the level of the rib. Rectal temperature (known to be reliable and close to the internal temperature) was also measured in camels. Our results (partly reported in ref El Allali et al. (2013)) show that the body temperature recorded at the level of the flank is very close to the rectal temperature.

Ta was assessed continuously by an iButton placed in the center of a sheltered room. Data were read out by the software OneWireViewer (Maxim/Dallas, Dallas, TX) and were processed by Excel (Microsoft Office, Microsoft, Issy-les-Moulineaus, France) and Sigma Plot® (SPSS ASC GmbH, Erkrath, Germany).

Experimental design

The study consisted of two experiments

Experiment 1 was designed to define the process of heterothermy in dehydrated camels under heat stress conditions. It was carried out over three successive periods, namely, a hydration period of 8 days (high amplitude of Ta cycle, normal hydration), a dehydration period (water deprivation) of 19 days, and finally a rehydration period of 2 days.

Experiment 2 was designed to investigate the effect of the reduction of food intake observed during dehydration (i.e., dehydration-induced food intake decrease) in experiment 1 on the circadian Tb rhythm of camels kept in the same conditions of Ta and photoperiod, but with full access to water. This experiment was also conducted over three successive periods, namely, a control period (8 days), a decreased food period (19 days), and finally a refeeding period (2 days).

Water intake was measured for each camel during hydration and rehydration period (experiment 1) (see Tables 1 and 2). To keep the water fresh throughout the day, we chose to change it twice daily at 09:00 and at 17:00, while food was provided once a day at 09:00. During experiment 1 and two periods of experiment 2 (control and refeeding periods), each camel received 2 kg of a specific camel compound feed (Maraa®: Alf Sahel: Maraa® contains: 1 – Cereals: Corn, barley; 2 – Wheat bran, wheat fiber; 3 – Oilcake: soybean, sunflower; 4 – Compound vitamin mineral. Guarantees percent: Minimum: 5 – Crude protein content: 14%; 6 – Fat: 2%; 7 – Phosphorus: 0.5%; 8 – Calcium: 0.8%. Maximum:

Table 1. Water intake (liters) during last 4 days of hydration period (experiment 1).

	Water intake (liters)			
Camels	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
B	10	10	11	9
C	8	6	9	7
E	10	10	11	10
F	8	5	5	9
G	10	16	10	8.5
H	10	10	15	8

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

Table 2. Water intake (liters) during rehydration period (experiment 1).

	Day 28		Day 29	
Camels	Water intake (liter)	Time (min)	Water intake (liter)	Time (min)
B	53	7	30	1440
C	56	10	10	1440
E	53	10	32	1440
F	61	5	29	1440
G	55	2	27	1440
H	56	10	30	1440

9 – Minerals: 10%; 10 – Crude cellulose: 14%; 11 – Vitamins UI/100 kg; 12 – vitamin A: 500,000; 13 – vitamin D: 150,000; 14 – vitamin E: 5000, humidity: 13%) and 3 kg of wheat straw. During the decreased food period of experiment 2, we supplied the same food but with a progressive decrease of the quantity mimicking the spontaneous decrease in food intake observed in experiment 1. On the last day of this period, we achieved a loss of 35% for compound food and 76.6% for wheat straw.

Control of dehydration

To assess the degree of dehydration, we monitored the evolution of several biological parameters. Blood samples were collected from one of the jugular veins in vacuum tubes with anticoagulant (heparin) before feeding during hydration, dehydration, during rehydration periods of experiment 1, and during all periods of experiment 2. Hematocrit (Ht) and hemoglobin (Hb) concentrations were determined immediately after sample collection. Ht was determined using hematocrit tubes. Using the Colorimetric Method Manual, we measured the Hb concentration (RANDOX Laboratories, Antrim, UK). Plasma was then centrifuged at 3500 g for 10 min, and the total plasma protein concentration (PT) was measured (g/100 mL) of each sample, in duplicate, on a refractometer (ATAGO SPR-T2 Protein 0–12$^{9/100\ \mathrm{mL}}$).

Changes in body weight were measured to evaluate the degree of dehydration and associated decrease in food intake in experiment 1, and to determine the effect of food shortage on body weight during experiment 2. The estimation of body weight was performed using the barymetric formula of (Boué 1949) adapted after by (Graber 1966):

$$\text{Weight (kg)} = [52 \times S \times T \times A] \pm 25\,\text{kg}$$

where S stands for shoulder height (in meter), T is the thoracic girth (in meter), and A is the abdominal girth (in meter).

We calculated the loss of body weight in each animal and in both experiments using the following formula:

$$\%\,\text{loss of body weight} = \left[\frac{(\text{live weight on day } f - \text{live weight on day } i)}{\text{live weight on day } i}\right] \times 100$$

where day i is the day on which one needs to calculate the loss of body weight and day f is the last day of hydration period (experiment 1) or the last day of control period (experiment 2).

The healthy state of the camels was monitored every day by a clinical examination. The respiratory and heart rates were specifically assessed daily at 08:00 (data not shown).

Statistical analysis

Tb data obtained from all loggers provided continuous measurements for 29 days from each animal and for each experiment. The data were consolidated by pooling the 6 × 10 min interval data points obtained from each logger for each hour of measurement to produce 24 average hourly temperatures for each animal for each day. These hourly averages for the six animals were, in turn, averaged to produce a mean hourly temperature for them as a group. These averages were further pooled for all study days or for the component days of the study period to provide a comprehensive overview of Tb throughout the recording period. For example, in experiment 1, the data were averaged in each 24-h interval and then averaged over the last 4 days for both periods: hydration and dehydration and during the first day for rehydration period. The amplitude was computed as the difference between the highest and the lowest daily measurements, and averaged as for mean.

To assess the influence of the light–dark cycle on Tb, the phase relationships between the dark–light transition and the peak body temperature were calculated and followed during the different phases of the experiment (experiment 1 and experiment 2).

To assess the influence of the environmental Ta on Tb during experiment 1, we studied the relationship between Ta and Tb per 24 h over 10-min intervals of both variables using the slope of identity line "Ta = Tb". When the abscissa and ordinate are on the same scale, the identity line forms a 45° angle with the abscissa. We made a translation of this line to be tangential to the curve Tb = f (Ta). This tangent is presented as a dotted line in Fig. 4.

Means ± standard error of the mean (SEM) are reported. One-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test was applied to determine the significant effect of different experimental conditions on the parameters studied. We assumed

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

statistical significance at P value <0.05. The data were analyzed using the software STATISTICA 10.0 (Stat Soft Inc, Maison Alfort, France).

Results

Effects on rhythm of Tb

The average daily Tb rhythm for the six camels maintained under a 12L/12D cycle and under Ta cycles with 38–46°C in the day and 20–25°C at night (Experiment 1) is shown in Fig. 1. The Tb show robust daily rhythmicity. The lowest Tb was observed in the morning, and the highest in the late afternoon. During the hydration period, the amplitude of average Tb rhythm was 2.39 ± 0.11°C (Fig. 2A) with a minimum of 35.37 ± 0.13°C (Fig. 2B) noted in the morning and a maximum of 37.76 ± 0.10°C recorded in the evening (Fig. 2C). The amplitude began to rise gradually from the 7th day of water deprivation (Day 15). After 19 days of dehydration (Day 27), the amplitude of the average Tb rhythm reached a value of 3.8 ± 0.25°C (Fig 2A), with a minimum of 35.42 ± 0.17°C (Fig. 2B) noted in the morning and a maximum of 39.22 ± 0.11°C (Fig. 2C) recorded in the evening. The amplitudes of the daily Tb rhythm calculated over the last four successive days of dehydration period were between 3.0 to 4.47°C in five of six camels (Fig. 2A).

In addition to an effect on amplitude, we also observed a change in phase relationship with the light–dark cycle. In camel H, the maximum of the Tb rhythm was observed at 589 min (9 h 48 min) after the dark–light transition on the last day of the hydration period, and at 779 min (12 h 58 min) on the last day of the dehydration period representing a phase delay of more than 3 h (Table 3). This observation was confirmed by statistical analysis of the six camels (527.33 min ± 31.77 versus 775.67 ± 4.22) (Table 3). Interestingly, this clear delay in the maximal Tb rhythm with respect to the light–dark cycle was progressive during the dehydration period (Fig. 3). Due to the technical constraints in the animal facilities, the exact moment of maximal temperature varied each day but linear regression demonstrated that globally the maximum was constant, and that variability in the Ta maximum was not responsible for the observed progressive phase delay in Tb. With regard to the amplitude, the Tb rhythm showed an immediate response to rehydration, decreasing from 3.8 ± 0.25°C (Day 27) to 1.78 ± 0.13°C (Day 28) (Fig. 2A). A repeated measures one-way ANOVA revealed a statistically significant difference in the mean values of amplitude of the Tb rhythm among the three periods of experiment 1 ($F_{(2,10)} = 41.391$, P value = 0.00001). The increase in amplitude of Tb was significant between the dehydration period and each of other two periods (P value <0.05) (Fig. 2A).

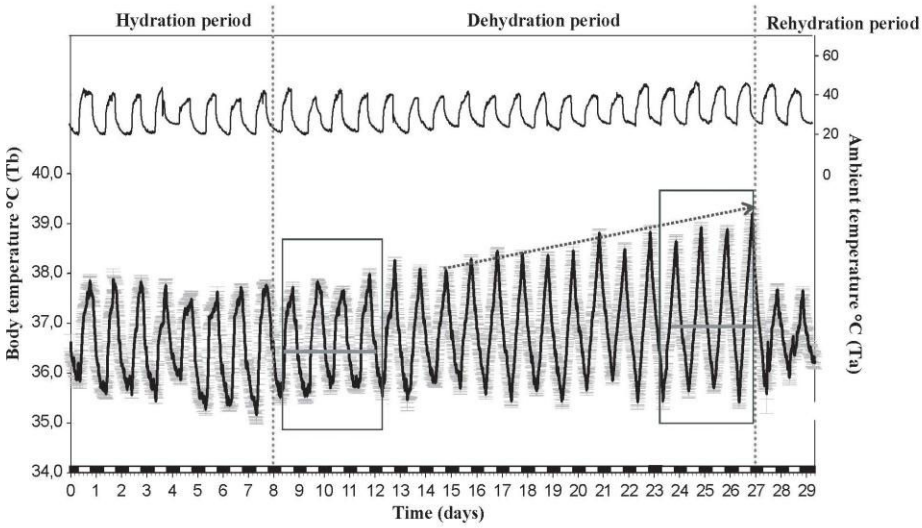

Figure 1. Average rhythm of Tb of six camels in Experiment 1. Each data point corresponds to the mean (±SEM) of the six camels. Data were collected every 10 min for 29 consecutive days Tb rhythm (Black line down). Ta is represented by the upper curve. The vertical dotted lines separate the different periods of the experiment. The arrow shows the progressive increase of the amplitude of Tb rhythm after 7 days of water deprivation. Horizontal gray lines indicate the mean of Tb during the first (36.39°C ± 0.04) and last 4 days of dehydration period (36.95°C ± 0.05). The white and black blocks at the bottom of the figures denote the duration of the light and dark phases of the light–dark cycle, respectively.

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

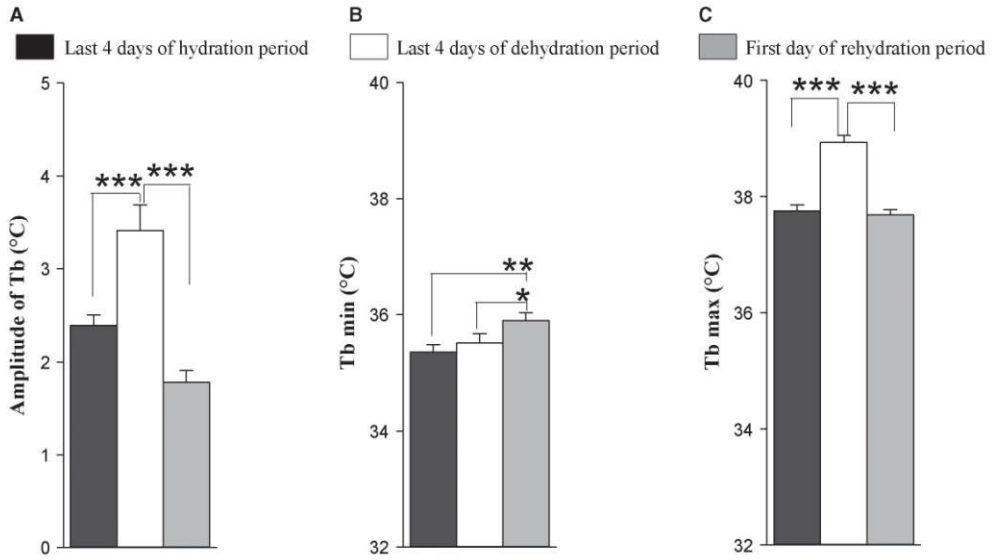

Figure 2. (A) Amplitudes of average (±SEM) Tb of six camels. (B) Average (±SEM) of minimum of Tb rhythm of six camels. (C) Average (±SEM) of maximum of Tb rhythm of six camels. Data were computed over the last 4 days of each period of hydration (black bars) and dehydration (white bars) and the first day of rehydration period (gray bars). *0.01 < *P* values≤0.05, **0.001 < *P* values≤0.01, ***P values≤0.001.

To show unambiguously the progressive increase of the Tb rhythm amplitude during the dehydration period, we compared the Tb rhythm of all animals during the first 4 days versus the last 4 days in this period (Fig. 1). In the first 4 days of the dehydration period, the mean Tb_{min} of the six camels was 35.52 ± 0.15°C, and the same value (35.52 ± 0.16°C) was observed during the last 4 days of this period (Fig. 2B). By comparing the Tb_{max} during the first 4 days of the dehydration period versus the last 4 days of the same period, it can be seen that the increase in amplitude from the 7th day of dehydration occurs by an increase in Tb_{max} and not by a decrease in Tb_{min}. (Fig. 2B and C).

To have a clear representation of the effect of Ta on the thermoregulation system in camels, we also studied the evolution of Tb rhythms as a function of the Ta for each day during the hydration, dehydration, and rehydration periods. To facilitate the presentation of results, we chose to represent the daily Tb rhythm of a representative camel as a function of the Ta during the last day of the hydration and dehydration periods, and during the first day of the rehydration period (Fig. 4A, B and C). This analysis confirmed that throughout the hydration period the camel's Tb varies very little, the amplitude of Tb rhythm of the representative camel (H) in the last day of hydration period being only 2.6°C (Fig. 4A). During the dehydration period, the variation between morning and evening Tb increases progressively with the degree of dehydration. At the 19th day of water deprivation, the Tb of the representative camel (H) varied by 4.73°C (Fig. 4B). After a severe dehydration period, the immediate effect of the availability of water in reducing the daily Tb fluctuations is obvious: on the first day of the rehydration period, the amplitude of Tb rhythm of the representative camel (H) was 2.4°C (Fig. 4C). Similar data were obtained for the six camels (data not shown). This thorough analysis of the rhythm of Tb as a function of Ta revealed the existence in the camel of a daily heterothermic variation of Tb during the dehydration period. As shown in the representative camel (H), during night and early morning, the curve of the dehydrated camel's Tb is tangential to the slope of the identity line (dotted line Fig. 4B). Camel's Tb passively follows the Ta, that is, the camel behaves as a thermoconformer (poikilotherm). During the morning Ta tends to increase, so the camel regulates its Tb to remain stable, probably by peripheral vasodilatation, that is, it becomes a thermoregulator (homeotherm). Thereafter, throughout the afternoon, the Ta continues to rise but the camel stops regulating Tb. The animal accumulates heat during the day, with a consequent rise in Tb. The camel once again enters a state of thermoconformer. This stored heat is then dissipated nonevaporatively at night when the heat load is lower (Schmidt-Nielsen et al. 1957). Subsequently, the camel will once again regulate Tb to keep it stable (homeothermic). These results clearly demonstrate, depending on

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

Table 3. Phase delay (minutes) between the maximum of Tb and the dark–light transition through the days of experiment 1.

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14	Day 15	Day 16	Day 17	Day 18	Day 19	Day 20	Day 21	Day 22	Day 23	Day 24	Day 25	Day 26	Day 27	Day 28	Day 29
Camel B	590	350	560	660	650	700	610	560	320	570	730	510	650	640	670	680	650	660	650	660	700	740	730	710	750	780	770	710	770
Camel C	450	480	610	560	620	630	520	540	590	610	580	630	640	630	620	540	650	650	670	660	730	730	730	770	760	790	770	660	750
Camel E	580	480	680	590	540	620	540	510	570	540	630	650	630	640	630	630	680	660	680	660	740	730	740	770	760	790	780	760	750
Camel F	610	590	620	580	590	630	550	530	590	580	610	640	620	610	620	620	640	640	660	660	730	710	710	760	740	790	750	730	740
Camel G	600	470	470	740	330	400	540	370	780	320	400	440	640	620	580	630	670	640	650	670	730	710	730	780	750	780	760	750	750
Camel H	670	630	610	560	610	620	530	580	580	610	620	650	650	630	630	620	660	660	640	650	730	720	730	770	750	790	770	760	750
Ta	16:40	17:30	16:50	16:50	17:30	16:10	17:50	16:20	16:30	17:20	16:40	16:30	16:40	16:10	17:20	17:30	16:30	17:20	17:00	17:50	16:40	16:00	16:00	17:50	17:50	16:20	16:50	17:40	16:30
	940	1050	1010	950	1050	970	1070	980	930	1040	1000	1110	1000	970	1040	1050	1110	1040	1020	1070	1000	960	1060	1070	1070	980	1010	1060	930
Mean	592.33	509.00	600.67	624.00	565.67	609.00	557.33	527.33	580.67	547.33	604.00	595.67	647.33	637.33	634.00	629.00	670.67	660.67	667.33	669.00	735.67	732.33	737.33	765.67	760.67	797.33	775.67	737.33	762.33
SEM	28.63	40.50	28.92	29.18	47.73	41.87	13.02	31.77	59.85	44.98	44.18	35.58	4.77	4.77	11.76	18.44	7.03	4.01	6.01	2.58	5.58	4.94	4.01	9.55	3.07	1.67	4.22	15.78	4.22
							09:17:18 ±0:13:01																			13:17:20 ±0:01:40			

Gray shades show the phase delay between the maximal of average (±SEM) Tb and light–dark transition in day 7 (hydration period) and in day 26 (dehydration period).expressed in minutes and hours.

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

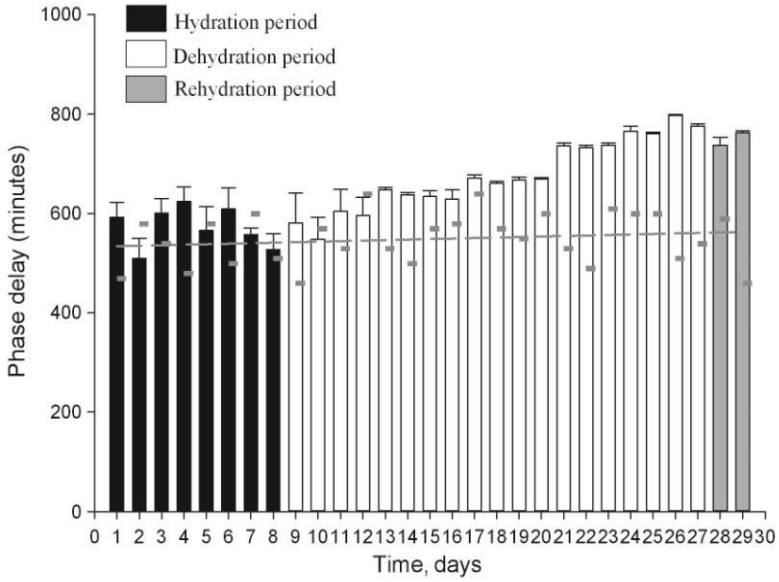

Figure 3. Phase relationship (±SEM) between the maximal Tb rhythm and the time of the light–dark transition. Data were computed over 29 days on experiment 1: during 8 days of hydration period (black bars), 19 days of dehydration period (white bars), and during 2 days of rehydration period (gray bars). Small gray dashes indicate the moment of maximal Ta and dark gray line indicates nonlinear regression function: $f = y0 + a * x$.

water availability, the presence of strong plasticity in the thermoregulatory system with a daily double switch between homeothermic and poikilothermic states. Interestingly, even during dehydration, the relationships with the light–dark cycle are maintained, as represented in Fig. 4D. On the last four consecutive days of dehydration period (in camel H for example), not only the amplitude but the timing of this heterothermic variation is the same.

Next, we studied in detail the dehydration-induced decrease of food intake in dehydrated camels submitted to a heat stress. During the initial period of hydration, camels consumed the entire food ration distributed (2 kg of compound food and 3 kg of wheat straw). After 7 days of water restriction, food intake of compound food dropped progressively. This decrease became greater from the 12th day of dehydration until the last day of this period. For wheat straw, we observed an immediate (second day) decrease in food intake during the dehydration period (Fig. 5). We noted that there was a greater decrease in food intake for straw than for compound food. Therefore, after 19 days of water deprivation camels reduced their food intake of compound food by 35% but by 76.6% for straw (Fig. 5). Rehydration led to a rapid and immediate recovery of appetite for straw and compound food. Body weight dropped progressively until the day of rehydration and after 19 days of dehydration the camels had lost 23.43% of their initial weight (Table 4). Partial recovery of initial body weight was observed on the first day of the rehydration period. One week was needed to obtain a full recovery (data not shown). One-way repeated measures ANOVA showed a significant difference in the mean values of body weight among the three periods of experiment 1 ($F_{(2,10)} = 65.877$, P value = 0.000002). A Tukey's post-hoc test indicated that the decrease of body weight was significant between the dehydration period and each of other periods (P value<0.05).

In Experiment 2, we analyzed Tb rhythms in pair-fed camels exposed to heat stress with free access to water to evaluate a possible role of decreased food intake in the establishment of a heterothermy strategy in the camel. The recorded Tb of a representative food-restricted camel (H) is shown in Fig. 6. Under food decrease conditions, a daily rhythm of Tb was still observed. The Tb_{min} during the first 4 days of the food decrease period was 36.08 ± 0.04°C; it dropped to 34.97 ± 0.24°C over the last 4 days of the same period (Fig. 7A). In the first 4 days of the food decrease period, the mean of Tb_{max} of our six camels was 37.77 ± 0.07°C. A close value of 37.93 ± 0.06°C was noted during the last 4 days of this period (Fig. 7B).

We also studied, in a representative camel (H), the evolution of the Tb rhythm as a function of Ta for each day during the three periods. This analysis (Fig. 8) revealed that after food restriction as after dehydration, there was strong daily plasticity in the thermoregulatory

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

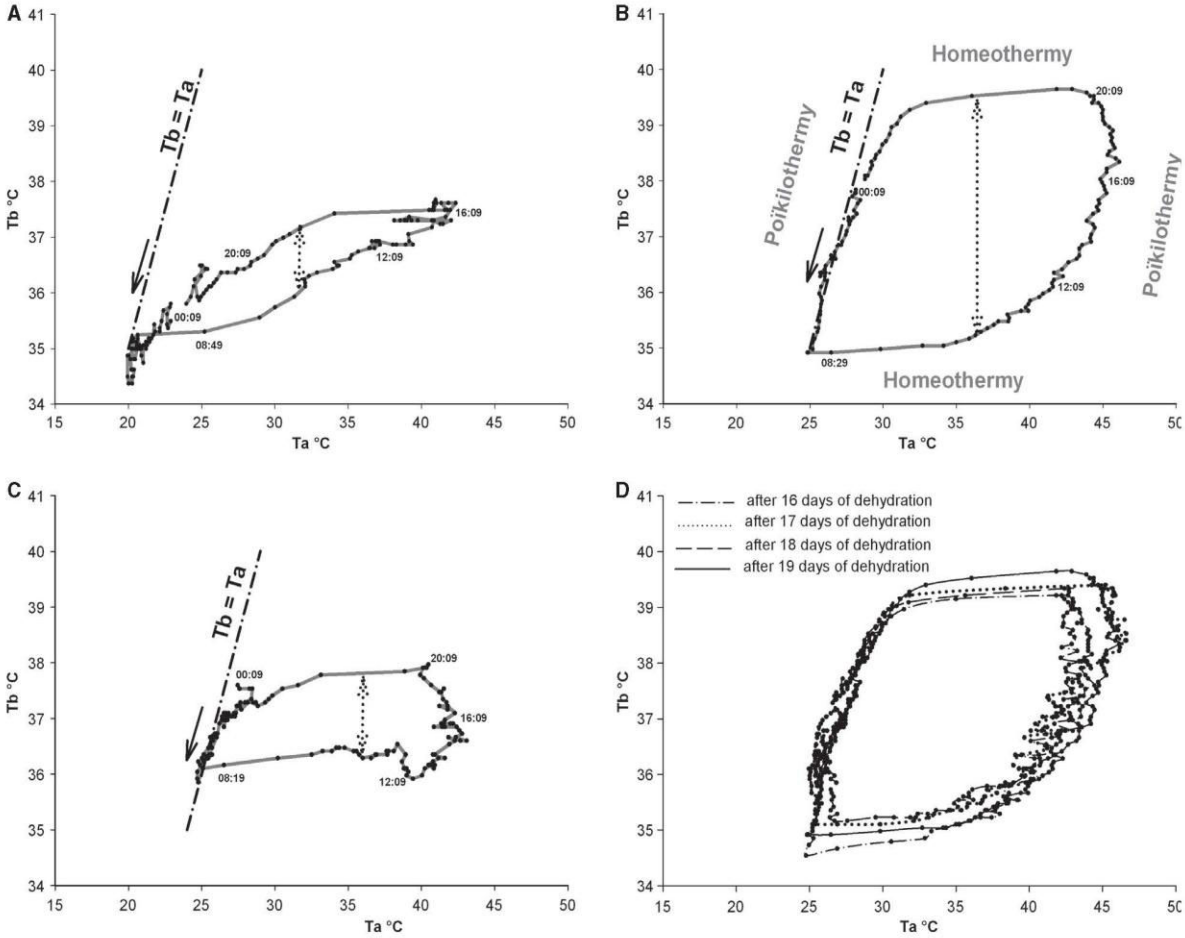

Figure 4. Records of 24 h of Tb (solid line) from a camel H as function of Ta, during the last day of hydration period (A), the last day of dehydration period (B), throughout the first day of rehydration period (C), and over the last four consecutive days of dehydration period (D). Data were collected every 10 min. Dash-dotted lines indicate the slope of identity line "Tb°C = Ta°C". The dotted arrows show schematically the amplitude of the Tb rhythm. The direction of the black arrows indicates the course of time.

system with a daily double switch between homeothermic and poikilothermic states.

Combining experiments 1 and 2, we compared the average Tb of six camels during the last 4 days of the hydration and dehydration periods versus the last 4 days of the control and food decrease periods, and during the first day of the rehydration period versus the first day of the refeeding period (Fig. 9). A slight variation was noted in mean Tb of camels kept under hydration periods during experiments 1 and 2 (Fig. 9A and D. This difference may correspond simply to a change in pattern of the Ta cycle. Indeed, depending on the outside environmental temperature, its requires different times to heat up or cool down the shelder; The repeated measures one-way ANOVA revealed an overall significant effect of the three periods of both experiments 1 and 2 on the mean Tb of the six camels ($F_{(2,10)} = 14.5$, P value = 0.00110 and $F_{(2,10)} = 8.588$, P value = 0.00675, respectively). Tukey's post-hoc pair-wise comparisons showed, on one hand, the increase in mean Tb was significant between the dehydration period and each of the other two periods in experiment 1 (P value < 0.05), and on the other hand, the decrease in mean Tb was significant between the food decrease period and control period in experiment 2 (P value < 0.05).

In both experiments 1 and 2, we found high amplitudes of Tb over the last 4 days of the dehydration and food decrease periods. They were 3.41 ± 0.28°C (Fig. 2A) and 3.01 ± 0.18°C (Fig. 10), respectively. The increase in amplitude over the last day of food decrease period was due to a decrease in Tb_{min} (Fig. 7A) and not due to an increase in Tb_{max} (Fig. 7B) as in experiment 1. It is also clear from these experiments that the phase delay of the maximum of the Tb rhythm with respect to the light–dark transition, as observed during the dehydration

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

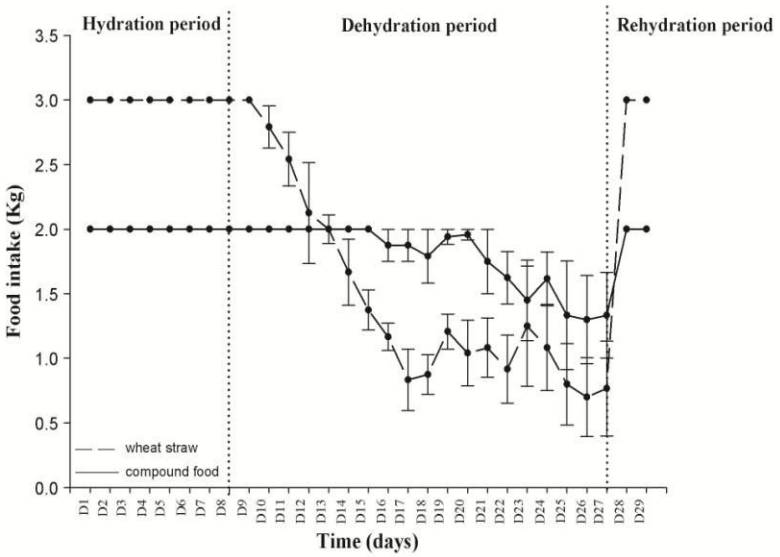

Figure 5. Twenty-four-hour means (±SEM) of food intake of compound food (open circle) and of wheat straw (dark circle) of six camels during experiment 1. The vertical dotted lines separate the different periods of the experiment. During dehydration period, a fall of food intake of 35% for the compound food and of 76.6% for the wheat straw were noted.

Table 4. Effect of water deprivation on camel body weight (Experiment 1).

Camels	% loss of body weight
Camel B	22.87
Camel C	19.94
Camel E	25.1
Camel F	22.3
Camel G	22.3
Camel H	28.0
Mean	23.43

period, is not observed in the food-restricted animals (Fig. 9).

On the first day of the rehydration and refeeding periods, amplitudes of Tb were 1.78 ± 0.13°C (Fig. 2A) and 3.59 ± 0.15°C (Fig. 10), respectively. Whereas availability of water has an immediate effect in reducing the amplitude of Tb rhythms, refeeding has a late effect on this parameter. Tb went back to control values within a few days (data not shown).

In experiment 2, after 19 days of a progressive food intake decrease, the camels lost only 12.99% body weight (Table 5). After 2 days of refeeding with 2 kg compound food and 3 kg of wheat straw, partial recovery was observed. The total recovery to control levels was seen after 1 week (data not presented). Also, using one-way repeated measures ANOVA, a significant difference was found in the mean values of body weight among the three periods of experiment 2 ($F_{(2,10)} = 35.336$, P value = 0.00003). A post-hoc test showed that the decrease in body weight was significant between the food decrease period and control period (P value < 0.05).

Effects on hematological parameters

Values of total protein (PT) and hemoglobin (Hb) increased progressively during the dehydration period, from 7.2 to 8.3 g/100 mL and from 10.32 to 16.09 g/dL, respectively. They reached a maximum after 15 min of rehydration: 8.9 g/100 mL and 16.60 g/dL, respectively. After 2 h of rehydration, PT and Hb were decreased. Based on the results of the one-way repeated measures ANOVA, dehydration conditions in this experiment significantly influenced these parameters (PT: $F_{(12,60)} = 51.088$, P value = 0.00000, Hb: $F_{(12,60)} = 8.2076$, P value = 0.00000). Hematocrit (Ht) was unchanged during the dehydration period, thus confirming previous observations in the same species (Kamili et al. 2013). No change was observed in the PT, Ht, and Hb throughout experiment 2, suggesting that the volume of plasma was not markedly modified.

Discussion

Our observations clearly establish that water deprivation during exposure to daily heat has a significant effect on the amplitude of daily/circadian Tb rhythms in the camel (adaptive heterothermy). This confirms a number of previous observations (Schmidt-Nielsen et al. 1957),

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

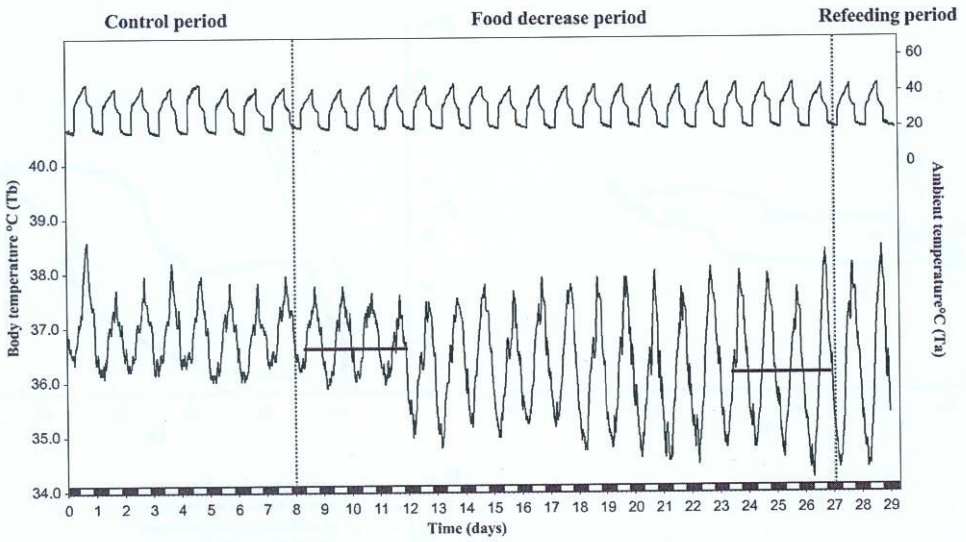

Figure 6. Records of Tb from a camel (H) in experiment 2 (black line down). Data were collected every 10 min for 29 consecutive days. Ta is represented by the upper curve. The white and black blocks at the bottom of the figure denote the duration of the light and dark phases of the light–dark cycle, respectively. Dark gray and gray dotted lines represent the evolution of maximum en minimum of the Tb rhythm. Horizontal black lines indicate the mean of Tb during the first (36.74°C ± 0.02) and last 4 days of food decease period (36.16°C ± 0.04).

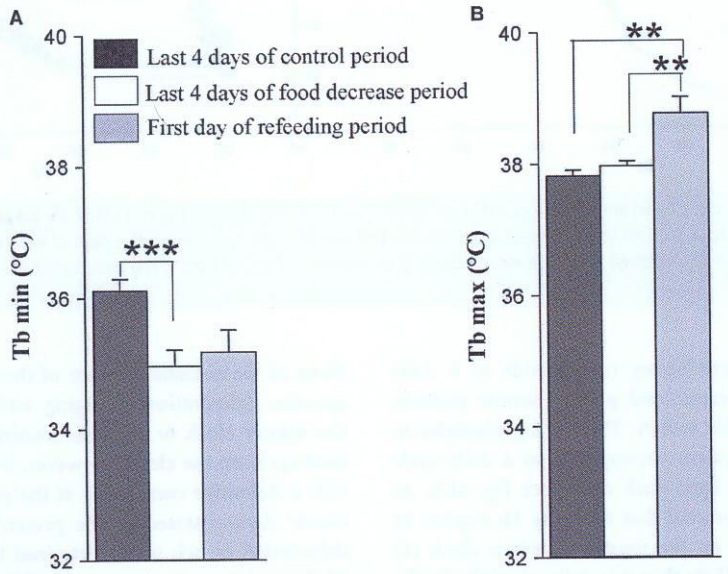

Figure 7. Average (±SEM) minimum (A) and maximum (B) of Tb rhythm of six camels. Data were computed over the last 4 days of each period of control (black bars) and food decrease (white bars) and the first day of refeeding period (gray bars). **0.001 < *P* values≤0.01,***P values≤0.001.

(Schmidt-Nielsen et al. 1967), (Dahlborn et al. 1992), (Zine-Filali 1991), (Bengoumi and Faye 2002), (Bekele et al. 2013) and is in contrast to the findings of (Al-Haidary 2005). The use of small temperature-sensitive data loggers continuously recording Tb without any manipulation of the animals, as well as the use of rooms with controlled conditions, has permitted long-term detailed study in adaptive heterothermy and the description of novel aspects of its regulation. When animals are challenged with both dehydration and heat stress, we observed for the first

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

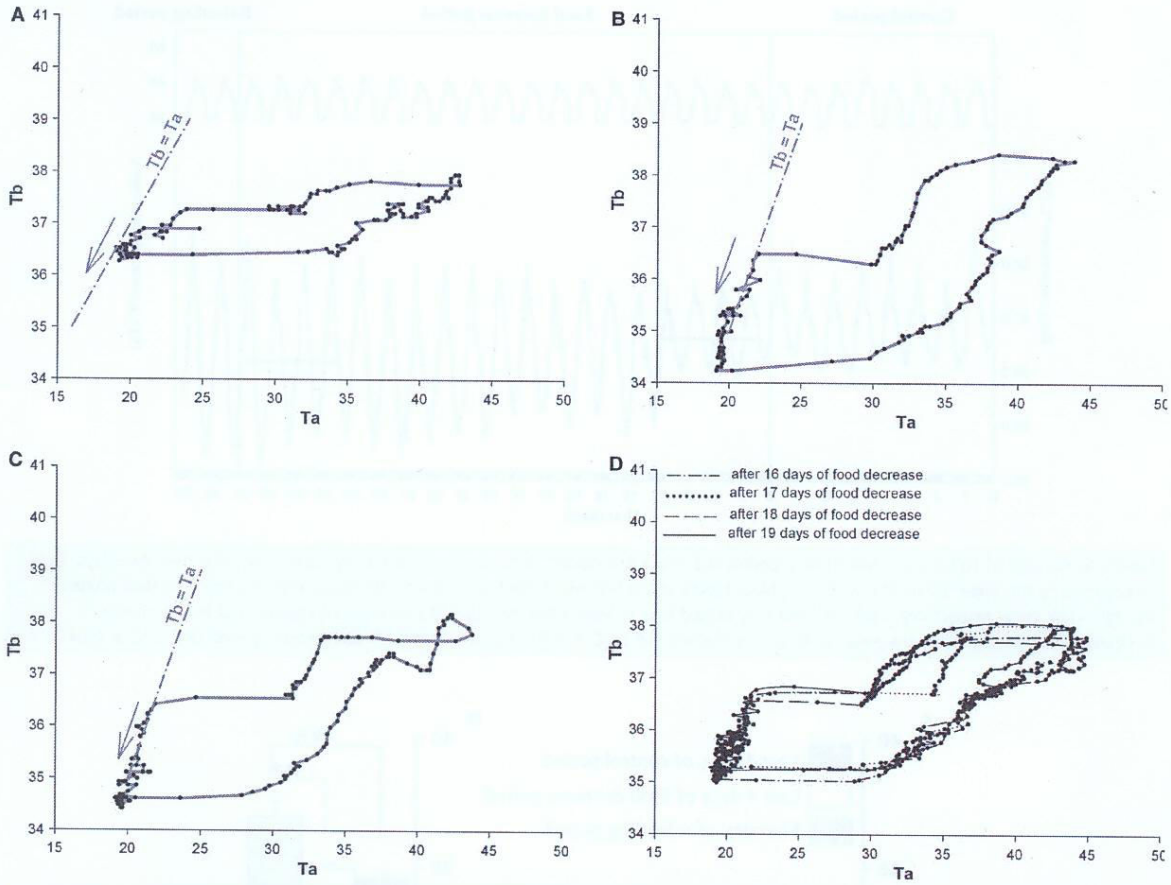

Figure 8. Records of 24 h of Tb (solid line) from a camel H as function of Ta, during the last day of control period (A), the last day of food decrease period (B), throughout the first day of refeeding period (C), and over the last four consecutive days of food decrease period (D). Data were collected every 10 min. Dash-dotted lines indicate the slope of identity line "Tb°C = Ta°C". The direction of the arrows indicates the course of time.

time that adaptive heterothermy corresponds to a daily alternation of homeothermic and poikilothermic periods, characterized by a double switch. This strong plasticity in the thermoregulatory system corresponds to a daily cycle of Tb entrained by the light–dark cycle (see Fig. 4D). As we have already demonstrated that the daily Tb rhythm in the camel is dependent on the master circadian clock (El Allali et al. 2013), it is likely that this daily plasticity in the thermoregulatory system when animals are water deprived and submitted to heat stress also represents a circadian process. This interpretation is hypothetical, and its validation will require extended studies in camels kept under constant conditions (constant dark or constant light). The clear relationships between the phase delay of the peak in Tb rhythm (with respect to the dark–light transition) and duration of dehydration (a phenomenon not observed when animals are only food deprived: Fig. 9), speak in favor of the circadian nature of the adaptive heterothermy process, dehydration changing either the functioning of the master clock or the synchronizing effect of the light–dark cycle on the clock. However, it is not possible to provide a definitive conclusion at the present time. Indeed, as clearly demonstrated in the present work, Tb rhythm in dehydrated camels is characterized by a direct dependence of the ambient temperature (poikilothermy), at least during two periods of the day–night cycle. Thus, we cannot totally exclude that the measured phase delay associated with dehydration corresponds simply to a change in the pattern of the Ta cycle. The superimposition of the averaged Tb rhythms of the six camels, during the first 4 days and last 4 days of dehydration period, with the daily rhythm of Ta seems to support that suggestion (Fig. 11). Independently of the mechanism involved, the phase change of the Tb rhythm peak will induce drastic changes

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

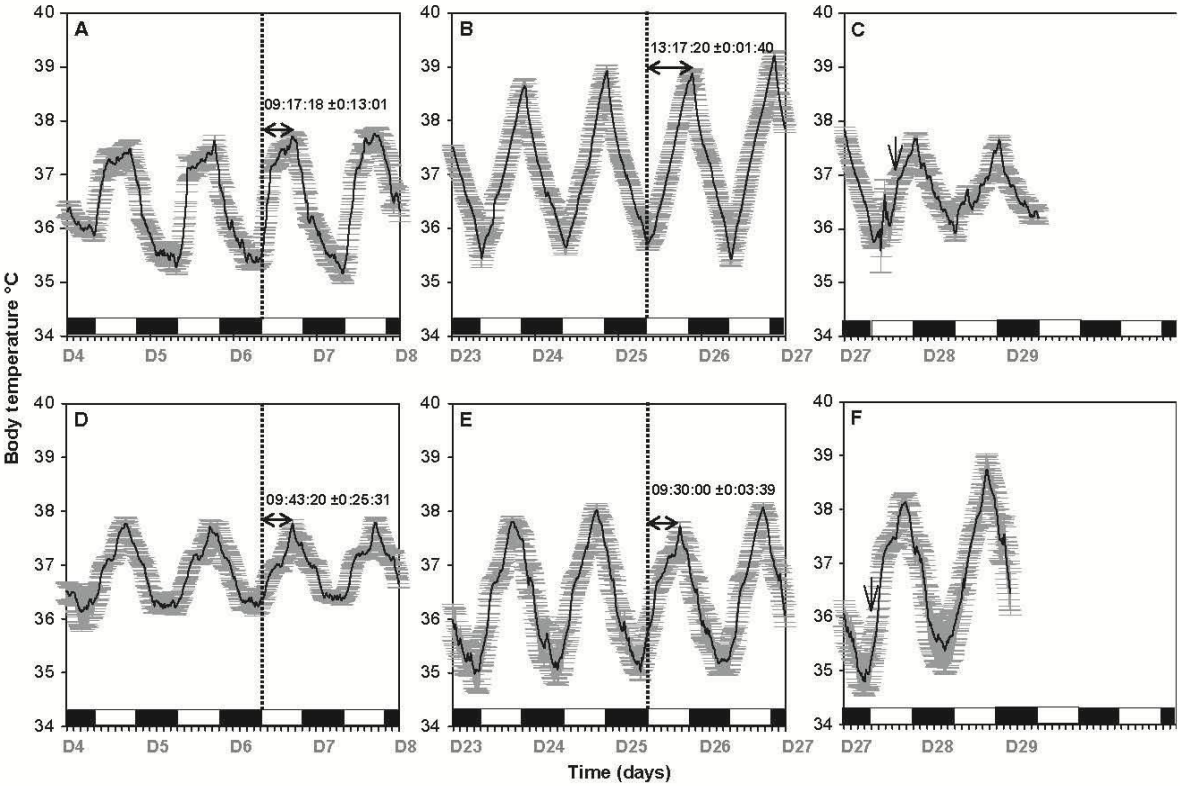

Figure 9. Means (±SEM) of Tb rhythm of six camels in both experiments 1 and 2. (A) during the last 4 days of hydration period, (B) during the last 4 days dehydration period, and (C) during 2 days of rehydration period in experiment 1. (D) during the last 4 days of control period, (E) during the last 4 days progressive decrease in food period, and (F) 2 days of refeeding period in experiment 2. The vertical dotted lines indicate the time of light on (08:00 h) for days 7 and 26 in both experiments 1 and 2. The horizontal arrows show the phase relationship between the maximal of Tb and light dark transition. The vertical arrows illustrate the beginning of the rehydration (C) and of refeeding (F). The white and black blocks at the bottom of the figure denote the duration of the light and dark phases of the light dark cycle, respectively.

in the physiology of the animals. Indeed, optimal and anticipatory temporal organization of biological functions in relation to periodic changes of the environment relies on a complex network comprising a master circadian clock (SCN), synchronizing inputs, various outputs as well as multiple central and peripheral oscillators (Pevet and Challet 2011), (Davidson et al. 2003; Dibner et al. 2010). It is the complex interactions of multiple outputs from the SCN that drive the circadian expression of events within the body. Tb rhythm is an output of the SCN which is known to be one of the potent cues used for resetting peripheral oscillators, in a global entraining temporal organization of functions (Brown et al. 2002, 2002; Buhr et al. 2010). In the camel, dehydration-induced changes in the phase relationships between the light–dark cycle and the Tb rhythm will thus consequently induce a state of internal desynchronization between various functions. This response may be a part of the adaptive mechanism to desert environment.

In the camel, it has also been demonstrated that the daily Ta cycle is able to entrain the master circadian clock, thus highlighting that Ta is a true zeitgeber (El Allali et al. 2013). The protocol validated in this study will also permit to test in these specific conditions, if the zeitgeber effect of Ta cycle with higher amplitude is able, as suggested by (El Allali et al. 2013), to counteract the zeitgeber effect of the light–dark cycle, a fundamental question in mammalian circadian biology. It will also lead to determine more precisely the functioning of the master clock and the circadian network in dehydrated and heat-stressed camels.

The use of data loggers over a long period of time has also facilitated understanding the interpretation of (Al-Haidary 2005). In the present work, we observed that the increase in amplitude of Tb starts after 7 days under heat stress and water deprivation. In the work of (Al-Haidary 2005), the analysis was only done after 4 days and the protocol used by this group would have overlooked any heterothermy process.

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

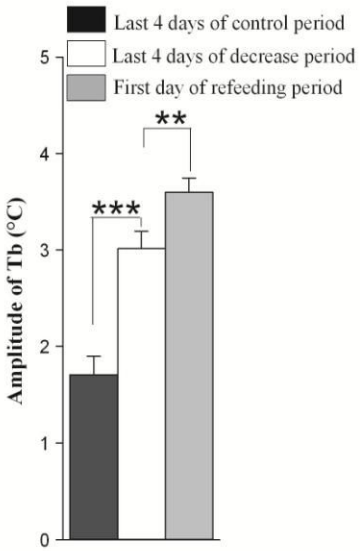

Figure 10. Amplitudes of average (±SEM) Tb of six camels. Data were computed over the last 4 days of each period of control (black bars) and food decrease (white bars) and the first day of refeeding period (gray bars). **0.001 < *P* values≤ 0.01; ****P* values≤0.001.

Table 5. Effect of progressive food decrease on camel body weight (Experiment 2).

Camels	% loss of body weight
Camel B	9.66
Camel C	9.87
Camel E	14.34
Camel F	19.06
Camel G	14.05
Camel H	10.94
Mean	12.99

Daily/circadian alternation of periods of poikilothermy and homeothermy appears instrumental for camel physiology. Is it also true for other mammals living in such drastic environmental conditions? Captive Idmi gazelles (*Gazella gazella*; (Al-Johany et al. 1998), free-living Arabian Sand gazelles (*Gazella subgutturosa marica*; (Ostrowski and Williams 2006), free-living Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*; (Ostrowski and Williams 2003), (Hetem et al. 2010), and Ethiopian Somali goats (Shkolnik and Choshniak 2006; Mengistu et al. 2007) are known to present such adaptive heterothermy. Recently, it has been also described that hydrated Asian elephants (*Elephas maximus*) can cope with high heat load by employing a heterothermy strategy (Weissenböck et al. 2012). This phenomenon of adaptive heterothermy seems to be a phenomenon specific to desert or semidesert animals. If we realize that human individuals are also living in such zones and have to adapt to these strong environmental conditions, it seems important to understand the physiological mechanisms involved in the development of such adaptive process, especially for its rhythmic/circadian organization viewed as a key to adapt to strong environmental changes in the desert.

In the past, it was noted that dehydration and heat stress led to decreased food consumption in the camel. To our knowledge, this observation has not yet been described in detail, and its effect on the increased amplitude of the Tb rhythm (establishment of daily adaptive heterothermy) has never been studied. In the present work, we described and quantified this phenomenon. Under water deprivation and heat stress, camels progressively reduced their food intake by 35 and 76.6% for compound food and straw, respectively. As a consequence, a concomitant decrease in body weight was noted. Rehydration led to a rapid and immediate recovery of appetite for straw and compound food. In rodents, imposed dehydration has already been shown to trigger a so-called "dehydration-induced food intake decrease" (e.g., (Alvarez-Salas et al. 2012; Watts and Boyle 2010). Our question was whether this decreased food intake is an integral part of the process of adaptive heterothermy in camels, and if its relationships with the light–dark cycle can be changed. Here, we show that imposed food decrease in perfectly hydrated and heat-stressed camels increases the amplitude of Tb rhythms. This result confirms similar findings in food-restricted rodents (e.g., Nelson and Halberg 1986; Challet 2010). In this study, the observed decrease in food consumption due to dehydration and/or heat stress may be involved in the mechanism of adaptive heterothermy. This raises the question of the respective role of food consumption decrease and water depletion in the heterothermic response to heat stress. This question is difficult to address fully: whereas one can isolate the effect of restricted food alone, the examination of water depletion alone is virtually impossible to perform since water depletion induces the decrease in food intake in the camel. Be that as it may, comparison of the data obtained in our two experiments permits several conclusions. In hydrated camels, the increase in amplitude of Tb resulting from imposed food restriction (i.e., based on pair-feeding according to dehydration-induced decrease in food intake) is characterized by a strong and progressive decrease of Tb_{min} at the end of the night. This is compatible with the decrease in basal metabolism classically observed under food restriction in rodents (e.g., (McCarter and McGee 1989) and is in agreement with previous observations in the camel (Dahlborn et al. 1992; Zine-Filali et al. 1995). Compared with

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

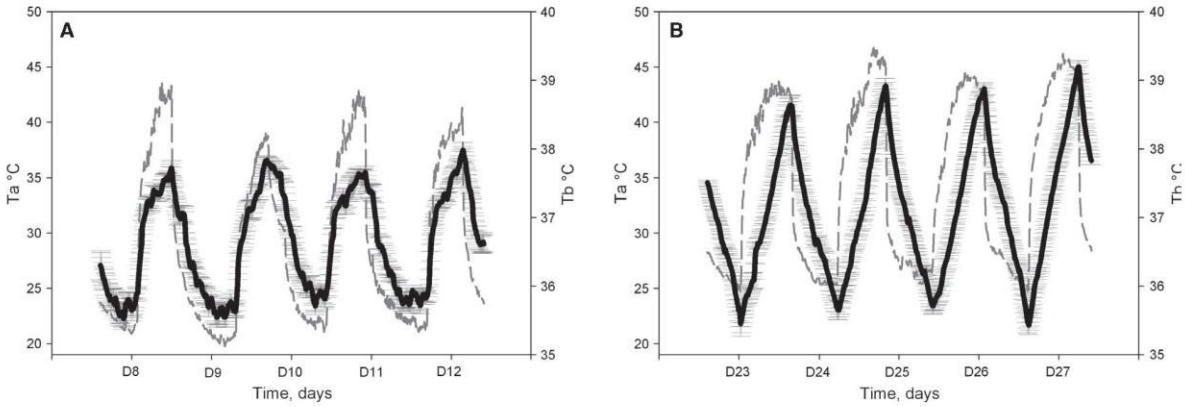

Figure 11. Superposition of average of Tb rhythm (±SEM) (black line) calculated in our six camels, during the first 4 days (A) and last 4 days (B) of dehydration period with the daily rhythm of Ta (gray line).

the Tb values in the control period, this strong decrease in the Tb_{min} explains the lower mean of Tb, even if a very small increase of the Tb_{max} is also observed. Based on these findings, decreased metabolic rate can be interpreted as a strategy for the camel to conserve energy stores during starvation. When the camels were dehydrated (same decrease in food consumption as in food-restricted hydrated camels), a similar large increase in amplitude of Tb rhythm was observed. In these conditions, there is a progressive and large increase in Tb_{max} at the end of the afternoon that can explain the increased mean level of Tb. Interestingly, the level of Tb_{min} seems to be only marginally affected under these conditions of heat and dehydration. Furthermore, unlike when only food intake is restricted, the decrease in minima of Tb is not observed when water is no longer available, even if the degree of food restriction (due in that case to the decrease in food intake) is similar.

Clearly, both external factors (dehydration and level of food) are involved in the process of adaptive heterothermy, probably by different mechanisms working at different levels. This view is supported by the fact that the phase shift of the maximum Tb rhythm observed in dehydrated camels is not detectable in food-restricted animals. Based on the present findings, we can conclude that adaptive heterothermy in the Arabian camel is thus a combination of three factors interacting throughout the daily light–dark cycle: heat stress, water restriction, and the level of food intake.

Acknowledgments

This work has been done in the framework of a PhD thesis in neurosciences performed in IAV Hassan II (Morocco) in co-tutelle with Strasbourg University (France). We are grateful to Moroccan Ministry of Agriculture and to colleagues of physiology Unit, Parasitology Unit and all staff of Anatomy Unit from the Hassan II Agronomic Veterinary Institute in Rabat as well as from the Institute for cellular and integrative neurosciences (INCI 3212, CNRS-Université de Strasbourg) for their help in achieving this study. We are also grateful to Dr A. Malan for his suggestions and help in the mathematical analysis of the data and to Dr. David Hicks for his English revision.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Al-Haidary, A. A. 2005. Effect of dehydration on core body temperature of young Arabian camels (*Camelus dromedarius*). J. King Saud. Univ. Agric. Sci. 18:1–7.

Al-Johany, A. M., M. O. Al-Toum, and I. A. Nader. 1998. Effect of temperature and water deprivation on body temperature in Idmi Gazelle *Gazella gazella*. Saudi J. Biol. Sci. 5:24–32.

Alvarez-Salas, E1., C. Aceves, B. Anguiano, R. M. Uribe, C. García-Luna, E. Sánchez, et al. 2012. Food-restricted and dehydrated-induced anorexic rats present differential TRH expression in anterior and caudal PVN. Role of type 2 deiodinase and pyroglutamyl aminopeptidase II. Endocrinology 153:4067–4076.

Ayoub, M. A., and A. A. Saleh. 1998. A comparative physiological study between camels and goats during water deprivation. In: Proceedings of the 3rd Annual Meeting for Animal Production under Arid Conditions 1: 71–87.

Bekele, T., K. Olsson, U. Olsson, and K. Dahlborn. 2013. Physiological and behavioral responses to different watering

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

intervals in lactating camels (*Camelus dromedarius*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 305:R639–R646.
Bengoumi, M., and B. Faye. 2002. Adaptation du dromadaire à la déshydratation. Sécheresse 13:121–129.
Boué, A. 1949. Essai de barymétrie chez le dromadaire nord-africain. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 3:13–16.
Brown, S. A., G. Zumbrunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner, and U. Schibler. 2002. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. Curr. Biol. 12:1574–1583.
Buhr, E. D., S. H. Yoo, and J. S. Takahashi. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. Science 330:379–385.
Challet, E. 2010. Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. J. Comp. Physiol. B. 180:631–644.
Dahlborn, K., D. Robertshaw, R. C. Schroter, and R. Zine-Filali. 1987. Effects of dehydration and heat stress on brain and body temperature in camel. J. Physiol. 338:28.
Dahlborn, K., S. Benlamlih, R. Zine-Filali, A. Gueroulali, J. Hossaini-Hilali, and M. Oukessou. 1992. Food deprivation and refeeding in the camel (*Camelus dromedarius*). Am. J. Physiol. 262(Pt 2):R1000–R1005.
Davidson, A. J., F. Aujard, B. London, M. Menaker, and G. D. Block. 2003. Thermochron ibuttons: an inexpensive method for long-term recording of core Tb in untethered animals. J. Biol. Rhythms 18:430–432.
Dibner, C., U. Schibler, and U. Albrecht. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. Annu. Rev. Physiol. 72:517–549.
El Allali, K., M. R. Achaâban, B. Bothorel, M. Piro, H. Bouâouda, M. El Allouchi, et al. 2013. Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (*Camelus dromedarius*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 304:R1044–R1052.
Graber, M.. 1966. Etude de certaines conditions africaines de l'action anti-parasitaire du Thiabendazole sur divers helminthes des animaux domestiques II. Dromadaire. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop. 19:527–543.
Hetem, R. S., W. M. Strauss, L. G. Fick, S. K. Maloney, L. C. Rodney-Meyer, M. Shobrak, et al. 2010. Variation in the daily rhythm of body temperature of free-living Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): doses water limitation drive heterothermy? J. Comp. Physiol. B. 180:1111–1119.
Kamili, A., M. Bengoumi, M. Oukessou, B. Faye, and H. P. Lefebvre. 2013. Assessment of glomerular filtration rate in normally hydrated and dehydrated dromedary camel by plasma exogenous creatinine clearance test. Emir. J. Food Agric. 25:314–319.
MacFarlane, W. V., R. J. H. Morris, and B. Howard. 1963. Turn-over and distribution of water in desert camels, sheep, cattle and kangaroos. Nature 197:270–272.
McCarter, R. J., and J. R. McGee. 1989. Transient reduction of metabolic rate by food restriction. Am. J. Physiol. 257(Pt 1): E175–E179.
Mengistu, U., K. Dahlborn, and K. Olsson. 2007. Mechanisms of water economy in lactating Ethiopian Somali goats during repeated sycles of intermittent watering. Animal 1:1009–1017.
Nelson, W., and F. Halberg. 1986. Meal-timing, circadian rhythms and life span of mice. J. Nutr. 116:2244–2253.
Ostrowski, S., J. B. Williams, and K Ismael. 2003. Heterothermy and the water economy of free-living Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). J. Exp. Biol. 206:1471–1778.
Ostrowski, S., and J. B. Williams. 2006. Heterothermy of free-living Arabian sand gazelles (*Gazella ssubgutturosa marica*) in a desert environment. J. Exp. Biol. 209:1421–1429.
Pevet, P., and E. Challet. 2011. Melatonin: both master clock output and internal time-giver in the circadian clocks network. J. Physiol. Paris 105:170–182.
Robertshaw, D., and R. Zine-Filali. 1995. Thermoregulation and water balance in the camel: a comparison with other ruminant species. Pp. 563–578 *in* von Engelhardt W., S. Leonnhard Marek, G. Breves, D. Giesecke, esd. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
Schmidt-Nielsen, K. 1964. Desert animals: physiological problems of heat and water. Pp. 1–277. Clarendon, Oxford.
Schmidt-Nielsen, K., B. Schmidt-Nielsen, S. A. Jarnum, and T. R. Houpt. 1957. Body temperature of the camel and its relation to water economy. Am. J. Physiol. 188:103–112.
Schmidt-Nielsen, K., E. C. Jr Crawford, A. E. Newsome, K. S. Rawson, and H. T. Hammel. 1967. Metabolic rate of camels: effect of body temperature and dehydration. Am. J. Physiol. 212:341–346.
Schroter, R. C., D. Robertshaw, and R. Zine-Filali. 1989. Brain cooling and respiratory heat exchange in camels during rest and exercise. Respir. Physiol. 78:95–105.
Shkolnik, A., and I. Choshniak. 2006. Adaptation to life in the desert: The special physiology and histology of the black Bedouin goat Shkolnik I (Ed), A.R.A.Gantner Verlag Kommandit Gesellschaft.
Watts, A. G., and C. N. Boyle. 2010. The functional architecture of dehydration-anorexia. Physiol. Behav. 100:472–477.
Weissenböck, N. M., W. Arnold, and T. Ruf. 2012. Taking the heat: thermoregulation in Asian elephants under different climatic conditions. J. Comp. Physiol. B. 182:311–319.
Zine-Filali, R. 1991. Température corporelle du Dromadaire: effet de la privation d'eau d'abreuvement. Maghr. Vet. 5:37–40.
Zine-Filali, R., N. Soubai, and A. Guerouali. 1995. Fasting and basal metabolism in the camel (*Camelus dromedarius*). Actes Inst. Agron. Vet. 15:5–9.

© 2014 The Authors. *Physiological Reports* published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American Physiological Society and The Physiological Society.

HANAN BOUAOUDA

Institute of Cellular and Integrative Neurosciences

5 Rue Blaise Pascal

67000 Strasbourg, France.

E-mail: hanan_bouaouda@yahoo.fr

Currently working as final year PhD student in the neurobiology of rhythm at, INCI, University of Strasbourg, France

EDUCATIONAL QUALIFICATION

Doctor of Philosophy (September 2011 – Present)

University of Strasbourg, France and Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco

Doctor of Veterinary Medicine (September 2002 – September 2008)

Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco **Top of 33th promotion**

RESEARCH EXPERIENCES

Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, University of Strasbourg, France (September 2011 to Present) Working on PhD with Dr. Paul Pevet

"Integration of photoperiodic signal in the European hamster (Cricetus cricetus), a circannual species: evidence of an independent pathway of melatonin"

"Synchronization of the circadian and seasonal systems by ambient temperature cycles in the Camel (Camelus dromedarius)"

Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco (February 2010 – August 2011) Worked on PhD with Dr. Khalid El Allali
"Synchronization of the circadian and seasonal systems by ambient temperature cycles in the Camel (Camelus dromedarius)"

Institute of Cellular and Integrative neuroscience, University of Strasbourg, France and Hassan II Agronomy and Veterinary Institute (IAV), Rabat, Morocco (September 2008– January 2010) Worked as a research assistant under the supervision of Dr. Paul Pevet.

"Entrainment of circadian clock by ambient temperature and photoperiod in the camel (Camelus dromedarius)"
"Action of photoperiod and melatonin on breeding in the camel (Camelus dromedarius)."

PUBLICATIONS

1. **H. Bouâouda**, G. Mendoza, E. Challet, S. Monecke, D. Ciocca, D. Bonn, K El Allali, P. Pévet. *Integration of photoperiodic signal in the European hamster (Cricetus cricetus), a circannual species: evidence of an independent pathway of melatonin.* (Manuscript underpreparation).

2. **H. Bouâouda**, M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, Piro M., E. Challet, P. Pévet, K El Allali and A. Malan. Daily modulation of body temperature in the camel exposed to experimental conditions. (*Camelus dromedarius*). Physiol Rep, 2 (9), 1-16, 12 August 2014.

3. El Allali K., Achaâban M.R., Bothorel B., Piro M., **Bouâouda H**., El Allouchi M., Ouassat M., Malan A. and Pévet P. Entrainment of the circadian clock by daily ambient temperature cycles in the camel (*Camelus dromedarius*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol (304), 1044-1052, 13 March 2013.

4. Achaaban M.R., Kerbal I., Baiss M., **Bouâouda H**., Ouassat M., Tligui N., Oukessou M. and El allali K. The cerebral ventricular system of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*): anatomical aspect and CSF sampling techniques. Journal of forum veterinary, 9th edition 53-57, 22 March 2012.

Research school and Conference attended

1. Understanding the neural basis of diurnality, 26-28 November, 2013, Strasbourg, France

2. The mysterious world of clocks, 3 June 2013, Strasbourg. France

3. If only Descartes had known about the Habenula, 19-20Novrmber 2012, Strasbourg .France.

4. Neurex Annual Meeting, 25 October 2012, Strasbourg. France

5. 4th GDRI-Neuro school, 18-21 October 2011, Casablanca, Morocco.

6.18th meeting of the international Hamster Workgroup, 14-17 october 2011, Strasbourg, France.

8. XII European Biological Rhythm Society (EBRS) congress in Oxford, UK (20 – 26 August 2011)

Presentation in Conferences

1. **H. Bouâouda**, A. Malan, E. Challet, M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, K. El Allali and P. Pévet. A complex control of thermoregulation with a daily switching of poikilothermic and homeothermic phases in the camel (*Camelus dromedarius*). Neurex Annual Meeting, 25 October 2012, Strasbourg. France **(Poster)**

2. **H. Bouâouda**, M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, M. Piro, A. Malan, P. Pévet and K. El Allali. Identification of a complex regulation with daily switching of poïkilothermic and homeothermic phases in the camel "*Camelus dromedarius*". Doctoriales at Hassan II IAV 17-19 April 2012, Rabat, Morocco **(Poster).**

3. **H. Bouâouda**. The effect of dehydration and heat stress on body temperature in the Camel « *Camelus dromedarius* ». Doctoriales at Hassan II IAV 17-19 April 2012, Rabat, Morocco **(Oral communication).**

4. **H. Bouâouda**. The effect of dehydration and heat stress on body temperature in the Camel (Camelus Dromedarius): confirmation for the poïkilothermy. 4th GDRI-Neuro school, 18-21 October 2011, Casablanca, Morocco. **(Oral communication).**

5. **H. Bouâouda**, M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, F. Kichou, A. Malan, P. Pévet and K. El Allali.The effect of dehydration and heat stress on body temperature in the Camel (*Camelus Dromedarius*): confirmation for the poïkilothermy. 4th GDRI-Neuro school 18-21 October 2011, Casablanca, Morocco. **(Poster).**

6. Marmouzi I., Piro M., **Bouâouda H**., Bouayad H., Ouassat M., Achaaban MR., Ouichou A., and El Allali K. Rhythm of body temperature in dogs (*Canis lupus familiaris*): demonstration of the existence of a circadian clock and its entrainment by the light/dark cycles 4 th GDRI-Neuro school, 18-21 October 2011, Casablanca, Morocco. **(Poster).**

7. **H. Bouâouda**, M.R. Achâaban, M.Ouassat, M. Oukassou, F. Kichou, A. Malan, P. Pévet and K. El Allali. Effect of dehydration and heat stress on the circadian body temperature rhythm of camel (*Camelus dromedarius*): Confirmation for the presence of a heterothermy. European Biological Rhythms Society (EBRS), 20-26 August 2011, Oxford, UK **(Poster).**

8. Dahabi A., Achaaban M.R., **Bouâouda H**. and El Allali K. Contribution to the anatomical study of the nasal cavity of the camel (*Camelus Dromedarius*). 2nd day of Education and Research in Veterinary Medicine: Research in camel medicine: strategy and prospects, 25 November 2010, Rabat, Morocco. **(Oral communication).**

9. El Allali K., **Bouâouda H**., El Harf A., Achaaban MR., Piro M. and Ouassat M. The osteology of the head of the camel (*Camelus dromedarius*). 2nd Conference of the International Society of Camel Research and Development (ISOCARD), 12-14 March 2009, Djerba, Tunisia. **(Poster).**

Teaching and Supervision

1. Co-supervision of 6th year veterinary students and a master student in Neurosciences Pituitary of the camel (*Camelus Dromedarius*), morphological study.M. Maguig (2011).

2. Rhythm of body temperature in dogs (*Canis lupus familiaris*): demonstration of the existence of a circadian clock and its entrainment by the light/dark cycles. I.Marmouzi (2011).

3. Contribution to the anatomical study of the nasal cavity of the camel (Camelus Dromedarius).A. Dahabi (2010).

4. The effect of dehydration and heat stress on body temperature in the Camel (*Camelus Dromedarius*): confirmation for the poïkilothermy. M. Oukassou (2010).

5. Didacticiel of the myology of the donkey (*Asinus asinus*). A. LAHBAS (2009).

6. Myology of the head of the camel (*Camelus dromedarius*) A. EL HAMDOUCHI (2009).

7. Pharmacokinetics study of marbofloxacin in the camel (*Camelus dromedarius*). Rkia OUBELAHCEN (2009).

8. Osteology and Dissection course for students in 2nd and 3rd year in DVM (October 2008 to August 2011)

Award and Honour

1. Laureate of the Eiffel excellence PhD Science scholarship, awarded by the French Ministry of Foreign Affairs (November 2011 to August 2013)
2. Laureate of the GDRI scholarship (November 2014 to December 2014)
2. PRAD project No. 07-05 / No. 11-09 Scholarship for excellence, awarded by French Embassy (between 2010 to 2013)
3. Awarded for top of 33th promotion in Doctor of Veterinary Medicine at 26th Maghreb Congress Veterinary. (4-5 May 2009) Tripoli, Libya

Professional Membership

1. European Biological Rhythm Society. (2011 to 2013)
2. Neurex, Neuroscience Upper Rhine Network. (2011 – 2014)

Skills and Expertise

Immuno Histo Chemistry (IHC),
Radio Immuno Assay (RIA),
Animal Surgery
stereotactic surgery
Mastered softwares: Sigmaplot, STATISTICA, SHISQUARE, Cosinor, Clock Lab, ImageJ etc
Programming ibutton, by software "one ware viewer”

Hanan BOUAOUDA

Rôles des synchronisateurs externes (photopériode et température ambiante) dans l'adaptation aux conditions extrêmes de l'environnement chez deux espèces saisonnières : le dromadaire (*Camelus dromedarius*) adapté à la chaleur et le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) adapté au froid.

Résumé

L'intégrité fonctionnelle des organismes vivants, Homme y compris dépend des rythmes biologiques. La perturbation de ces rythmes due aux conditions de vie du monde moderne (travail posté, *jet-lag*,…) ou des circonstances naturelles (vieillissement), favorise l'installation de pathologies spécifiques (troubles du sommeil, l'obésité, le diabète,…). Afin de retarder l'apprition de ces troubles, la conception des projets expérimentaux sur des modèles d'animaux diurnes et des modèles d'animaux vivants dans des biotopes particuliers où l'Homme est présent (zone désertique) est nécessaire. Le but de ma thèse est d'essayer de comprendre les mécanismes neurophysiologiques d'adaptation aux conditions environnementales extrêmes chez le dromadaire (adapté à la chaleur) et le hamster d'Europe (adapté au froid). Une première partie révèle qu'en plus de la photopériode, la température ambiante est un véritable synchroniseur de l'horloge biologique du moins en absence du cycle lumière-obscurité. Dans une seconde partie, notre objectif était de vérifier si les variations saisonniers de la température ambiante sont capables comme les changements photopériodiques d'induire des modifications saisonnières sur le rythme de mélatonine et/ou de la température corporelle. Nous avons commencé par la vérification de l'existence de l'hétérothermie adaptative chez le dromadaire surtout que ce phénomène a été contesté récemment. Nos résultats démontrent que le dromadaire privé d'eau de boisson et placé sous des températures ambiantes élevées, adopte une régulation complexe de thermorégulation caractérisée par une alternance quotidienne de phase de poïkilothermie et d'homéothermie. Cet état d'hétérothermie a également été observé chez des dromadaires parfaitement hydratés, sujet d'une restriction alimentaire. Nos résultats concluent donc que l'hétérothermie adaptative chez le dromadaire est une combinaison de plusieurs facteurs qui interagissent le long du cycle lumière-obscurité, à savoir la température ambiante, la privation hydrique et la prise alimentaire. Finalement, nous avons démontré chez le hamster d'Europe que les neurones des noyaux arqués sont capables d'intégrer le signal photopériodique et cela indépendamment de la présence de la mélatonine. L'existence de ce mécanisme particulier d'intégration de la photopériode chez d'autres mammifères y compris l'Homme doit maintenant être recherchée. Nos résultats ouvrent la voie à la mise en évidence de son intérêt pratique dans le contrôle des rythmes biologiques en particulier dans celui des rythmes circannuels.
Mots-clefs : Rythmes circadiens, mélatonine, température corporelle, température ambiante, déshydratation, prise alimentaire, dromadaire, photopériode, hamster d'Europe, rythmes circannuels, reproduction, noyaux arqués.

Summary

The functional integrity of living organisms, including human, depends on the biological rhythms. Disruption of these rhythms due to the living conditions of the modern world (shift work, jet lag ...) or natural circumstances (aging), leads various abnormalities (sleep disorders, obesity, diabetes ...). In order to understand pathophysiology of these abnormalities and adaptation in extreme environment, we need to design experiments on diurnal animals that cohabitate with human in specific biotopes. The aim of my thesis is to understand the neurophysiological mechanisms of adaptation to extreme environmental conditions in the camel (adapted to heat) and the European hamster (adapted to cold). Earlier we found that in addition to photoperiod, ambient temperature is a real synchronizer of the biological clock, at least in the absence of light-dark cycle. In the second part of my project, we investigated if seasonal variations of ambient temperature are capable to changes the rhythm of melatonin secretion and/or body temperature like photoperiod. Since heterothermy in camel challenged recently, we started our study by confirming the existence of adaptive heterothermy in camels. Our results demonstrate that dehydrated camels during exposure to daily heat show adaptive heterothermy. This mechanism is more complex because it is characterized by a daily alternation of two periods of poikilothermy and homeothermy. This adaptive heterothermy was also observed when camels are hydrated and food deprived. Based on our results, we can conclude that adaptive heterothermy in the Arabian camel is a combination of three factors interacting throughout the light-dark cycle: heat stress, water restriction, and level of food intake. Finally, we have demonstrated in European hamster that neurons of the arcuate nucleus are able to integrate photoperiodic signal, independent of melatonin. The existence of this particular mechanism of integration of photoperiod in other mammals including humans must be investigated. Our results promote to study the role of this new mechanism of integration of photoperiod in the control of biological rhythms in particular the circannual rhythms

Keywords: Circadian rhythms, melatonin, body temperature, ambient temperature, dehydration, food intake, camel, photoperiod, European hamster, circannual rhythms, reproduction, arcuate nucleus.