



**HAL**  
open science

# L'influence des effets directs, non circadiens de la lumière et de la phototransduction mélanopsinergique sur l'humeur, la veille et le sommeil

Laurent Calvel

## ► To cite this version:

Laurent Calvel. L'influence des effets directs, non circadiens de la lumière et de la phototransduction mélanopsinergique sur l'humeur, la veille et le sommeil. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ039 . tel-01580956

**HAL Id: tel-01580956**

**<https://theses.hal.science/tel-01580956v1>**

Submitted on 4 Sep 2017

**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**



*ÉCOLE DOCTORALE ED 414*  
CNRS UPR 3212 - Equipe 9

**THÈSE** présentée par :  
Laurent Calvel

Soutenue le trois septembre 2014

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**  
Discipline/ Spécialité : Sciences du vivant / NEUROSCIENCES

**L'influence des effets directs, non circadiens de la lumière  
et de la phototransduction mélanopsinergique sur  
l'humeur, la veille et le sommeil**

THÈSE dirigée par :

Monsieur BOURGIN Patrice, Professeur d'Université Praticien Hospitalier, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Madame BELZUNG Catherine, Professeur d'Université, Université François Rabelais de Tours

Madame MONACA-CHARLEY Christelle, Maître de Conférence d'Université Praticien Hospitalier, Université de Lille 2

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Madame FELDER-SCHMITTBUHL Marie-Paule, Chargée de Recherche de 1<sup>ère</sup> classe, Université de Strasbourg

**« Quand tu regarderas le ciel, la nuit, puisque j'habiterai dans l'une d'elles, puisque je rirai dans l'une d'elles, alors ce sera pour toi comme si riaient toutes les étoiles. Tu auras, toi, des étoiles qui savent rire. »**

Antoine de Saint Exupéry, « le Petit prince » (1943)

*A **Benjamin**, la douce lumière de ton étoile éclaire ma vie.*

## Remerciements

A Madame Le Professeur Catherine Belzung pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail et de présider mon jury de thèse.

A Madame Le Docteur Christelle Monaca-Charley pour avoir accepté d'évaluer mon travail et de consacrer du temps à la lecture et à la rédaction du rapport de thèse pendant les congés d'été.

A Madame le Docteur Marie Paule Felder-Schmittbuhl pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, pour avoir évalué ma mi thèse et pour m'avoir encouragé tout au long de mon travail.

A Monsieur le Professeur Patrice Bourgin, mon directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et pour m'avoir confié le soin de développer l'approche comportementale chez l'animal au cœur des thèmes de l'équipe « Lumière, rythmes biologiques, homéostasie du sommeil et neuropsychiatrie ».

A Michael Reber, mon ami chercheur, qui m'a guidé, conseillé dans mes raisonnements scientifiques et dans mes expériences de biologie moléculaire et qui m'a soutenu et motivé tout au long de mon travail.

A Dominique Ciocca et Ludivine Robin-Choteau qui m'ont aidé, de manière indéfectible, dans mes réflexions et dans les mises en oeuvre expérimentales.

A Abdel-Moultalib Ouagazzal pour ses précieux conseils lors de la mise en place du protocole d'étude et du choix des approches comportementales.

A Elisabeth Ruppert avec laquelle j'ai partagé la condition de médecin-doctorant au sein de l'équipe et j'ai traversé des périodes à la fois enrichissantes et stressantes du master à la soutenance.

A Jeffrey, qui m'a précédé dans un travail de thèse au sein de l'équipe et qui m'a aidé sur les plans expérimentaux, iconographiques et linguistiques.

A Marie-Pierre, Sylvie, Martine, Sophie, Carmen, Aurore, Anita, Nicolas pour leur aide, leurs conseils, leurs corrections et leurs encouragements.

A tous les collègues de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégrées et du Chronobiotron.

A Elisabeth, Geeta, Marilyne, Virginie, mes collaboratrices et amies médecins qui m'ont soutenu et qui ont su saisir le moment opportun pour me proposer de me suppléer, pour me permettre de consacrer plus de temps à la fin de mes expériences et à la rédaction du manuscrit.

A mes collègues de l'EMSP et de l'USP qui m'ont encouragé et qui ont composé avec ma moindre disponibilité, l'espace de quelques semaines.

A mes chers amis Jacques, Adeline, Sandra, Luc, Marie-Hélène, Alain, Agnès et à tous ceux à qui je pense, que je n'ai pas cités, mais que je n'oublie pas, pour leurs présences, leurs sourires et leurs paroles réconfortantes.

A Marie Louise et Jean Claude, mes chers parents que j'aime, qui m'ont encouragé et qui m'ont transmis le goût de comprendre, d'apprendre et de m'ouvrir aux autres et aux domaines nouveaux.

A Brigitte et Marc, mes chers beaux parents que j'aime, pour leur confiance, leur soutien et leur attention.

A Sandrine, ma femme chérie que j'aime, pour sa patience et pour son amour.

A Emma, Alyah, Nicolas et Johanna, mes chers et précieux enfants que j'aime.

# TABLE DES MATIERES

<b>Table des illustrations</b>	<b>11</b>
<b>index des abréviations :</b>	<b>15</b>
<b>Introduction</b>	<b>19</b>
La lumière	20
Les structures répondant à la lumière ne contribuant pas à la formation d'une image.	
	27
<i>Les cellules à mélanopsine de la rétine</i>	27
<i>Les projections vers les structures du cerveau</i>	35
<i>Les modèles murins génétiquement modifiés</i>	39
Le sommeil	43
<i>Les rythmes veille/sommeil et leurs acteurs principaux :</i>	43
<i>Les systèmes neurophysiologiques de l'alternance veille-sommeil :</i>	48
<i>L'organisation du sommeil et son exploration :</i>	51
<i>Les rôles principaux du sommeil :</i>	53
<i>Le sommeil chez la souris et ses spécificités</i>	56
La dépression	61
Hypothèse de travail à l'origine de ce projet	65
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>68</b>
Les animaux	69
Le génotypage	72
Les tests comportementaux	75
<i>La préférence sucrose</i>	75
<i>Le labyrinthe en croix suspendu</i>	77

<i>La nage forcée</i>	79
<i>La queue suspendue</i>	80
<i>L'administration d'un antidépresseur</i>	82
L'analyse de l'activité de l'axe corticotrope	84
L'enregistrement du sommeil et de l'activité locomotrice	86
<i>L'ECOG (électrocorticogramme)</i>	86
<i>La privation de sommeil</i>	89
<i>L'enregistrement de l'activité locomotrice</i>	90
<i>Contrôle des biais potentiels</i>	91
Analyse statistique	92
<b>PARTIE 1</b>	<b>93</b>
<b>L'influence de la lumière sur le comportement via la phototransduction mélanopsinergique</b>	<b>94</b>
Les conditions expérimentales	94
Résultats	97
<i>L'activité locomotrice en fonction du paradigme lumineux</i>	97
<i>L'évaluation du phénotype induit par les conditions de lumière</i>	102
<i>L'exploration de l'activité de l'axe corticotrope</i>	111
<i>L'évolution pondérale des souris incluses dans l'étude comportementale</i>	114
Discussion	115
<i>L'activité locomotrice sous l'effet de la lumière est mélanopsine dépendante</i>	115
<i>Le profil anhédonique sous l'effet de la lumière est mélanopsine-dépendant</i>	117
<i>La pharmacosensibilité du phénotype anhédonique induit par la dim light</i>	119
<i>La résignation sous l'effet de la lumière est mélanopsine dépendante</i>	120

<i>L'anxiété, sous l'effet de la lumière, est mélanospine dépendante</i>	124
<i>La condition dim light n'est pas une condition plus stressante</i>	125
<i>Le contrôle de l'âge des souris testés</i>	127
<i>La perte de poids en dim light est mélanospine-dépendante</i>	128
<i>Corollaire et perspectives</i>	129
<b>PARTIE 2</b>	<b>133</b>

**L'influence de la variation de l'intensité lumineuse pendant la période d'éclairage sur l'architecture et l'homéostasie du sommeil.**

---

**134**

Introduction	134
<i>Contexte général, hypothèse de travail et objectifs</i>	134
<i>Les conditions expérimentales</i>	135
Article	136
<i>Figures</i>	154

**PARTIE 3** **161**

**Rôles respectifs des photorécepteurs, des SCN et de la nocturnité/diurnité dans les effets directs de la lumière sur le sommeil et l'activité locomotrice.**

---

**162**

« Les effets directs de la lumière mélanopsinergiques permettent de conserver l'alternance veille/ sommeil d'une souris sans horloge centrale fonctionnelle »	162
<i>Introduction</i>	162
<i>Article</i>	162
<i>1. TITLE PAGE. Original paper</i>	163



<i>Title: A model to predict how (melanopsin-dependent) lighting shapes the sleep-wake cycle</i>	163
<i>Short title: Light shapes the sleep-wake cycle</i>	163
<b>2. MAIN MANUSCRIPT:</b>	165
<i>Introductory Paragraph:</i>	165
<i>Main text:</i>	166
<i>Methods Summary:</i>	174
<b>3. FIGURES</b>	175
<b>4. REFERENCES</b>	181
<b>5. SUPPLEMENTARY DATA</b>	184
<b>6. EXTENDED MATERIALS &amp; METHODS</b>	191
« Validation d'un nouveau modèle animal pour l'étude du sommeil : <i>Arvicanthis ansorgei</i> »	200
<i>Introduction</i>	200
<i>Article</i>	200
<b>1. Title page. Original paper</b>	200
<i>Title: Arvicanthis ansorgei, a novel model for the study of sleep and waking in diurnal rodents</i>	200
<i>Short title: Sleep ECoG characterization of diurnal Arvicanthis ansorgei</i>	200
<b>2. Main manuscript:</b>	201
<b>ABSTRACT</b>	201
<b>INTRODUCTION</b>	203
<b>METHODS</b>	205
<i>Animals, Housing Conditions, and Sleep Deprivation</i>	205
<i>Locomotor activity monitoring</i>	206

<i>Surgery and experiments</i>	206
<i>ECoG sleep scoring and power spectrum analysis</i>	207
<i>Statistical analysis</i>	208
<b>RESULTS</b>	209
Polysomnographic Characterization of Sleep and Waking in <i>Arvicanthis Ansorgei</i>	209
Distribution of Sleep and Wakefulness during the 12L:12D Baseline	210
Circadian, Direct Photic, Crepuscular and Homeostatic Components Regulate Sleep and Waking	210
<i>Circadian and direct photic non-circadian regulation of sleep and waking in Arvicanthis ansorgei</i>	210
<i>Crepuscular regulation of sleep and waking</i>	211
<i>Process S is conserved in Arvicanthis ansorgei</i>	212
<b>DISCUSSION</b>	213
Why is <i>Arvicanthis ansorgei</i> a model of interest for sleep research?	213
<i>Arvicanthis ansorgei</i> is a Diurnal Rodent Whose Sleep is regulated by Light and Circadian, Crepuscular and Homeostatic Processes	215
<i>Arvicanthis</i> has a diurnal pattern of sleep and wakefulness resulting from clock-driven as well as direct photic influences	215
<i>Crepuscular activity overrides the circadian drive</i>	216
<i>The homeostatic regulation of sleep in Arvicanthis ansorgei</i>	217
<i>The Sleep-Wake Rhythm has a Weaker Circadian Organization as Compared to Wheel-Running Activity</i>	218
<b>FIGURES</b>	220
<b>REFERENCES</b>	229

<b>CONCLUSION</b>	<b>232</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>244</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>271</b>
Annexe 1	272
Protocoles de génotypage	272
<i>Procédure classique</i>	272
<i>Procédure propre à l'utilisation du KIT de PCR Fermentas ®</i>	276
Tableaux synthétiques des données de la partie 1	279
<i>Préférence sucrose</i>	279
<i>FST</i>	279
<i>TST</i>	279
<i>E+M</i>	280
<i>Préférence sucrose dans le cadre du test pharmacologique à la fluoxétine</i>	281
<i>Dosages de la corticostérone à ZT2 et à ZT10</i>	281
<i>Activité locomotrice globale</i>	282
<b>Résumé</b>	<b>283</b>
<b>Résumé en anglais</b>	<b>283</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. L'œil humain et son anatomie.....	22
Figure 2. La structure rétinienne .....	23
Figure 3. Sensibilité des photorécepteurs chez l'homme (Gronfier C 2009) .....	24
Figure 4. Structures cérébrales non dévolues à la vision et dont l'activation est induite par la lumière (Lockley et al., 2006).....	25
Figure 5. La conformation de la mélanopsine au niveau de la cellule ganglionnaire de la rétine (Do et Yau 2010).....	29
Le réseau rétinien .....	30
Figure 7. Le réseau rétinien (Lok 2011).....	31
Figure 8. Les sous types d'ipRGCs (Schmidt et al., 2011).....	33
Figure 9. Les principales projections cérébrales des ipRGCs (LeGates et al 2014, d'après Hattar et al., 2006) .....	36
Figure 10. La représentation schématique des principales fonctions biologiques contrôlées par l'horloge biologique circadienne (Gronfier C 2009).....	37
Figure 11. Les fonctions principales contrôlées négativement (flèche rouge vers le bas) ou positivement (flèche verte vers le haut) par la boucle moléculaire de l'oscillateur circadien constitué des gènes « horloges » et de leurs facteurs de transcription (Richards et Gumz 2013).....	38
Figure 12. Le modèle de boucle moléculaire (Transcription-translation) oscillante de l'horloge des mammifères (Richards et Gumz 2013) .....	39
Figure 13. Les modèles transgéniques Opn4 utilisés depuis 12 ans, dont la souris Opn4 de Ruby en 2002 que nous avons utilisée dans ce projet (Mouse Genome Informatics (MGI), Gene in pubmed). .....	40

Figure 14. La construction du modèle transgénique selon Ruby (A) , exemple de bandes révélées (allèle mutant, allèle sauvage) après la PCR ( B) et analyse génotypique (C) , coupe de rétine avec marquage Lac Z de quelques cellules ganglionnaires (D). .....	42
Figure 15. Les processus S et C (d'après Achermann et Borbely 1992).....	44
Figure 16. Les structures, voies et neurotransmetteurs impliqués dans l'état de veille (Saper et al., 2005) .....	45
Figure 17. Les structures, voies et neurotransmetteurs impliqués dans l'état de sommeil (Saper et al., 2005).....	46
Figure 18. Modèle de régulation (Flip Flop) : Inhibition réciproque entre les structures d'éveil et de sommeil (d'après Saper et al., 2005).....	47
Figure 19. Les structures, voies et neurotransmetteurs favorisant la veille (en rouge) et le sommeil (en bleu) (Mignot et al., 2002) .....	49
Figure 21. Un exemple d'hypnogramme normal d'homme .....	51
Figure 22. Les tracés EEG caractéristiques en fonction de l'état de vigilance .....	53
Figure 23. Les coupes sagittales montrant les structures et les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation des états de vigilance chez la souris (Andretic et al., 2008).....	59
Figure 24. Les tracés d'électrocorticogramme de souris adulte en fonction des 3 états de vigilance (en haut) et exemple de répartition du NREM (1 <sup>er</sup> en bas)se rapprochant d'une partie d'hypnogramme pour les stades de sommeil non paradoxal chez l'homme et de l'activité motrice( 2 <sup>ème</sup> en bas) intitulée « motion » (Nelson et al., 2013) .....	59
Figure 26. La relation entre développement, horloge circadienne, facteurs environnementaux et psychopathologie (Frank et al., 2013).....	63

Figure 27. L'impact de la lumière sur des structures impliquées dans la modulation de l'humeur (Mac Carthy et Welsch 2012) .....	63
Figure 28. Exmple de bandes d'intérêts après révélation lors du génotypage. M est une DNA Ladder 100bp de Fermentas®: .....	74
Figure 29. Le déroulement des expériences comportementales .....	75
Figure 30. Un schéma de l'E+M d'après Cryan et Holmes 2005.....	77
Figure 31. Une photographie d'une souris Opn4 en train d'effectuer le test de l'E+M, d'après nos enregistrements en 2012. ....	77
Figure 32. Un schéma de la FST d'après Cryan et Holmes 2005. ....	79
Figure 33. Une photographie d'une paire de souris Opn4 en train d'effectuer le test de la nage forcée, d'après nos enregistrements en 2012.....	79
Figure 34. Un schéma du TST d'après Cryan et Holmes 2005 : .....	81
Figure 35. Une photographie d'une paire de souris Opn4 en train d'effectuer le test de la queue suspendue, d'après nos enregistrements en 2012 : .....	82
Figure 36. Le déroulement temporel du test pharmacologique à la fluoxétine .....	83
Figure 37. Le déroulement temporelle des prélèvements de sang pour la mesure des taux de corticostérone circulante : .....	84
Figure 38. Le déroulement temporel de la partie « sommeil et actimétrie » en fonction du paradigme lumineux appliqué).....	86
Figure 39. Les résultats d'actimétrie: A) Exemples d'actogrammes B) Tableau des périodes des animaux dans chaque groupe C) Histogrammes des amplitudes et des répartitions de l'activité locomotrice D) Déroulement temporel de l'activité locomotrice globale.....	97

Figure 40. La répartition de l'activité locomotrice entre le jour et la nuit en fonction du génotype, de la période d'éclairage et de l'intensité lumineuse d'exposition en phase éclairée. ....	101
Figure 41. L'évolution de la préférence sucrose sur une base 100 entre l'état avant et après l'exposition lumineuse.....	102
Figure 42. La préférence sucrose après l'exposition en fonction de l'intensité d'exposition et le génotype .....	103
Figure 43. Le test de la nage forcée après exposition lumineuse en fonction de l'intensité et du génotype .....	105
Figure 44. Le test de la suspension caudale après exposition lumineuse en fonction de l'intensité et du génotype .....	106
Figure 45. L'évolution de la préférence sucrose avant et après une exposition à faible intensité et après l'administration aiguë de Fluoxétine.....	107
Figure 46. Le test du labyrinthe en croix suspendu en fonction de l'exposition lumineuse .....	109
Tableau des âges .....	111
Figure 47. Les taux de corticostérone à ZT2 et à ZT10 avant et après l'exposition en fonction du génotype .....	111
Figure 48. L'évolution du poids des souris en fonction du génotype, de l'intensité lumineuse appliquée et de la tranche d'âge .....	114

## INDEX DES ABREVIATIONS :

<10lux ou Dim light : exposition à une faible intensité

150lux ou standard : exposition à une intensité standard

5HT : sérotonine

600lux ou high light : exposition à forte intensité

A10 OU VTA : Aire tegmentale ventrale (dopaminergique)

Ach : acétylcholine

AH : hypothalamus antérieur

AVP : Alanine vasopressine

BF : noyaux de la base du crâne (cholinergique)

*Bmal1*=Arntl: Brain and Muscle ARNT-Like protein 1 ou aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like;

bp ou pb : paire de bases

BST : Noyau du lit de la strie terminale

*Clock*: Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CR : Raphé caudal

*Cry 1 et 2* : Cryptochrome 1 et 2

D : phase d'obscurité ou nuit

DA : dopamine

DR : Raphé Dorsal (sérotoninergique)

E+M : test du labyrinthe en croix suspendu

ECoG : électrocorticogramme

EMG : électromyogramme

Fr/Cin Ctx : Cortex frontal/Cingulaire



FST : test de la nage forcée

GABA : acide  $\mu$  aminobutyrique

GAL : Neurones GABAergiques/galaninergique

GLU ou Glut: Glutamate

GLY : Glycine

*Gnat*<sup>1-/-</sup>, *Cnga*<sup>3-/-</sup> : modèle de souris avec une invalidation respective des bâtonnets, des cônes de fond génétique C57BL6/J

HC ou HPC : Hippocampe

IGL : Bandelette intergénéculée

ipRGCs: cellules ganglionnaires de la rétine disposant d'une photosensibilité intrinsèque ou cellules ganglionnaires de la rétine à mélanospine

L : phase de lumière ou jour

L : D12:12 : cycle lumière obscurité de 12h

LC : Locus Coeruleus (Noradrénergique)

LDT : Noyau tegmental latérodorsal

LGNd : Noyau géniculé dorsolatéral

LGNv : Noyau géniculé ventrolatéral

LH : Hypothalamus latéral

LHb : Habenula latérale

MA ou Amygdala : Amygdale médiale

Mel : Mélanopsine

mvPFC: Partie ventromédiale du cortex préfrontal

NE ou Nad : norépinéphrine ou noradrénaline

*Npas2* (in neuronal tissue) : Neuronal PAS domain protein2

NREM : Non-Rapid Eye Movement ou sommeil hors sommeil paradoxal

OPN : Noyau olivaire prétectal

Opn4<sup>-/-</sup> ou KO : souris mutante par l'inactivation du gène de la mélanopsine

Opn4<sup>+/+</sup> ou WT : souris sauvage possédant le gène de la mélanopsine

PACAP: Pituitary Adenyl Cyclase Activating Peptid (neuropeptide)

PAG : Substance grise périaqueducule

Per 1, 2, 3 : Period Homologue 1, 2 et 3

PPT : Noyau tegmental pédonculopontin

PRF : Formation réticulaire pontine

PS : test de la préférence sucrose

pSON: Noyau supraoptique

PVN : Noyau para ventriculaire

Raphe : Noyaux du raphé

*rd/rd cl* : modèle de souris avec une dégénérescence des bâtonnets et des cônes fonctionnels de fonds génétique CH3/HE

REM : Rapid Eye Movement ou sommeil paradoxal

ROR (abg): Retinoic acid-related Orphan Receptor

SC : Colliculus supérieur

SCN ou NSC : Noyau suprachiasmatique

SN : Substance noire

*Syn10<sup>Cre/Cre</sup> Bmal1<sup>fl/-</sup>* : modèle de souris sans horloge circadienne fonctionnelle

TH : Tyrosine-3-hydroxylase, enzyme qui catalyse la transformation de la tyrosine en L-Dopa (DihydroxyPhénylAlanine), étape essentiel dans la synthèse des catécholamines

TMN : Noyau tubéromamillaire (histaminergique)

TST : test de la queue suspendue

VLPO : Aire ventrolatérale préoptique

vSPZ: zone sous paraventriculaire ventrale

ZT ou Zeitgeber : contrôleur du temps,

ZT0= début de la période de jour

ZT12= début de la période de nuit

# **INTRODUCTION**

Le sommeil et l'humeur sont des comportements ayant de très fortes interactions fonctionnelles (Brunner *et al.*, 1996, Armitage *et al.*, 2001, Even et Schröder 2008, Frey *et al.*, 2012). La majorité des sujets insomniaques présentent un trouble de l'humeur. A l'inverse, la plupart des patients souffrant de dépression ont également des perturbations de l'initiation et du maintien du sommeil. Ces interactions fonctionnelles entre sommeil et dépression sont bien décrites, mais les mécanismes les sous-tendant restent mal compris. La chronobiologie constitue depuis de nombreuses années un axe majeur des Neurosciences de Strasbourg et plusieurs équipes étudient les mécanismes nerveux et neuroendocrines impliqués dans le contrôle des rythmes biologiques ; ces derniers permettent à l'organisme de s'adapter aux variations journalières et saisonnières de l'environnement. Notre équipe s'intéresse plus particulièrement aux régulations du sommeil, et en particulier au rôle de la lumière qui constitue le synchroniseur principal de l'horloge. Notre projet de recherche s'inscrit dans une problématique de santé publique et la démarche de l'équipe est translationnelle de l'animal à l'homme. Ce travail a été effectué chez le rongeur et nous nous sommes intéressés au rôle qu'exerce la lumière sur les interactions fonctionnelles entre sommeil et humeur.

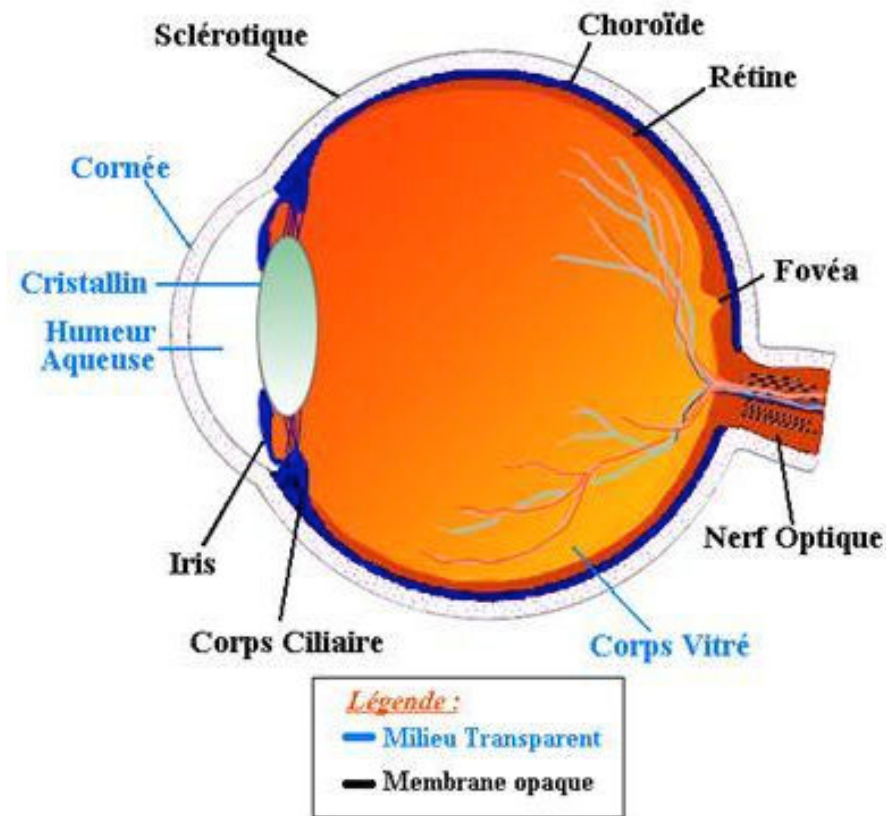
## **La lumière**

De tout temps la lumière a compté aux yeux des hommes. Dans un premier temps par le biais de celle créée par les rayons du soleil qui réchauffaient la terre et les êtres, qui permettaient de se repérer dans le temps et dans l'espace. Dans un second temps l'homme a cherché à comprendre sa genèse et ses bases physiques

dans le but de la créer indépendamment du soleil et de la maîtriser pour notamment la commercialiser et pour optimiser son utilisation.

Jusqu'à une période relativement récente, on pensait que le rôle joué par la lumière en physiologie humaine était essentiellement restreint à la vision, Ce n'est donc que plus récemment que les recherches ont mis en évidence que la lumière exerçait des effets non-visuels sur un grand nombre de paramètres physiologiques et comportementaux. Ce domaine fait d'ailleurs maintenant l'objet d'un intérêt particulier depuis la découverte d'un nouveau photopigment, la mélanopsine (voir plus loin).

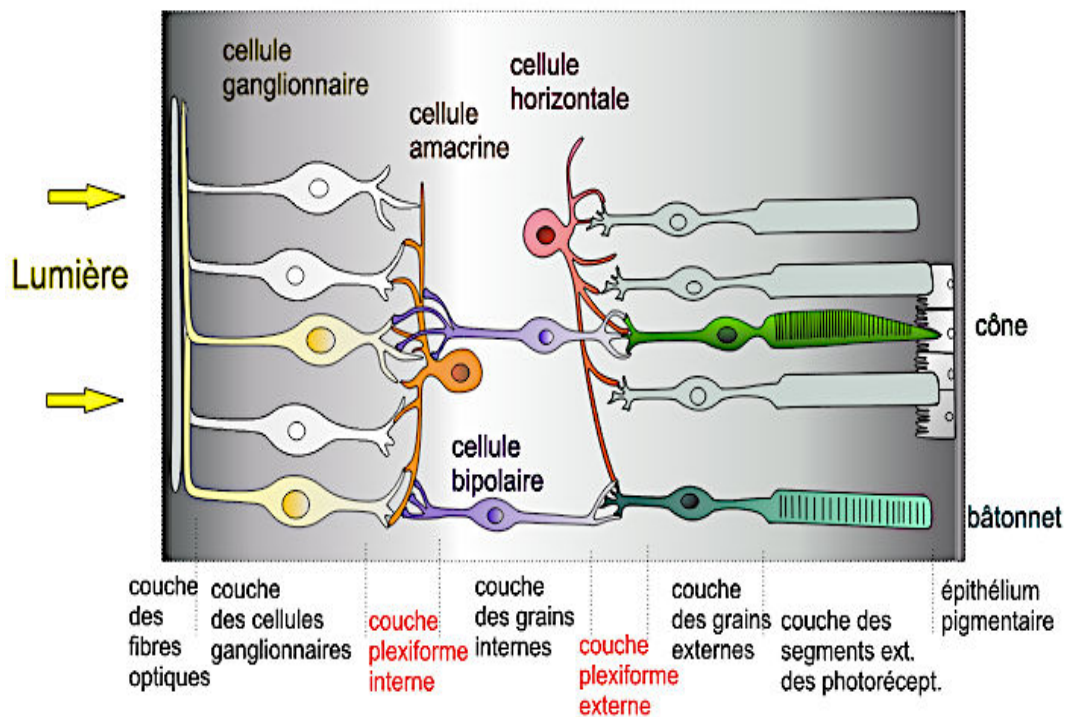
Au sein de notre institut, de nombreux chercheurs s'intéressent à la lumière en tant que synchroniseur des rythmes biologiques. En effet, la vie sur terre est rythmée par la rotation qu'effectue la terre sur son axe qui dure environ 24 heures et par la course qu'elle poursuit sur son orbite autour du soleil qui dure environ 365 jours. La lumière joue un rôle essentiel dans la synchronisation des rythmes biologiques, mais également dans le maintien de leur équilibre et de leur organisation temporelle. La lumière contribue, ainsi, à ce que les êtres vivants puissent vivre tout en s'adaptant aux contraintes environnementales, harmonieusement (Zeitzer *et al.*, 2000, Cajochen *et al.*, 2000, Brainard *et al.*, 2001, Lockley *et al.*, 2003, 2007, Perrin *et al.*, 2004, Challet *et al.*, 2007, Hubbard *et al.*, 2013).



*Figure 1. L'œil humain et son anatomie*

L'œil est un organe sensoriel essentiel qui occupe une place centrale dans le rôle joué par la lumière en physiologie. En effet, la lumière pénètre dans l'œil par la cornée. La quantité de lumière transmise est modulée par la pupille qui a la capacité de faire varier son diamètre en fonction de l'importance des rayons lumineux focalisés par le cristallin et projetés sur la rétine (figure 1). Cette dernière transforme l'énergie apportée par la lumière en un signal électrique grâce à la phototransduction. Ce mécanisme s'effectue au sein des photorécepteurs, localisés dans la rétine. La photodétection est assurée par les cônes et bâtonnets, mais aussi par un troisième photodétecteur, identifié plus récemment la mélanopsine. Les cônes et bâtonnets sont disposés sur la couche externe de la rétine, tandis que la mélanopsine est exprimée dans la couche la plus interne de la rétine par un sous-

groupe (environ 2%) de cellules ganglionnaires de la rétine leur conférant ainsi la propriété d'être intrinsèquement photosensibles (ipRGCs). L'information lumineuse est transmise aux différents acteurs cellulaires de la rétine disposés en couches contiguës. Les axones des cellules ganglionnaires de la rétine forment le nerf optique ce qui permet d'acheminer les informations lumineuses visuelles et non visuelles vers les structures cérébrales d'intérêt. Par ailleurs, les cellules amacrines, les cellules bipolaires, les cellules horizontales, toutes trois, cellules de constitution et de transmission modulent également le transfert de l'information lumineuse (figure 2).



*Figure 2. La structure rétinienne*

Contrairement aux ipRGCs qui se dépolarisent en présence de lumière, les bâtonnets et les cônes s'hyperpolarisent (Peirson *et al.*, 2006, Hatori et Panda 2010). Les bâtonnets, chez les mammifères, sont les plus nombreux, répartis, régulièrement, au niveau de la couche externe de la rétine en dehors de la fovéa. Ils



ont un seuil de sensibilité à la lumière très bas et participent à la vision nocturne et en niveaux de gris tandis que les cônes sont essentiellement concentrés au niveau de la fovéa. Vingt fois moins nombreux que les bâtonnets (ou rods en anglais), les cônes (ou cones en anglais) ont un seuil de sensibilité à la lumière plus haut, nécessitant une ambiance lumineuse plus intense. Ils sont impliqués dans la vision des couleurs, dans l'acuité visuelle, dans la vision fine ce qui explique leur forte densité au niveau de la fovéa (Lall *et al.*, 2010, Altimus *et al.*, 2008, Dkhissi-benyahya *et al.*, 2007). Pour la vision des couleurs, il existe des cônes qui disposent d'un pigment sensible aux longueurs d'onde (Chang L *et al.*, 2013) du rouge (L-cone), du vert (M-cone) ou du bleu (S-cone) (figure 3).

[Figure 3. Sensibilité des photorécepteurs chez l'homme \(Gronfier C 2009\)](#)

Ces deux photorécepteurs sont connectés par leurs segments externes à la couche membranaire pigmentaire de la rétine et libèrent par leurs segments internes

connectés aux cellules bipolaires, le neurotransmetteur de deux manières, proportionnée au flux photonique ou tonique dans l'obscurité. La répartition, la proportion, les caractéristiques, les sensibilités à telle ou telle ambiance lumineuse ou longueur d'onde de ces photorécepteurs varient éminemment en fonction de l'espèce étudiée.

*Figure 4. Structures cérébrales non dévolues à la vision et dont l'activation est induite par la lumière (Lockley et al., 2006)*

A travers ces constats et les travaux antérieurs, il semble important de dépasser le rôle premier de la lumière dans sa fonction visuelle et d'étudier ses impacts, ses influences et ses mécanismes dans d'autres fonctions neurobiologiques qui participent à l'homéostasie de la vie physiologique.

Notre équipe a choisi depuis plusieurs années d'orienter sa recherche vers l'étude du sommeil et de ses interactions fonctionnelles et neurobiologiques avec la

lumière. Nos travaux visent à appréhender l'influence de la lumière et le rôle joué par la rétine dans la transmission des informations lumineuses non visuelles à de nombreuses structures cérébrales impliquées dans le sommeil, dans la locomotion, dans la cognition ou encore dans l'humeur (Vandevallé *et al.*, 2011, Frey *et al.*, 2012, Stephenson *et al.*, 2012) au travers de laquelle les cellules à mélanopsine jouent un rôle essentiel.

**Les structures répondant à la lumière ne contribuant pas à la formation d'une image.**

### ***Les cellules à mélanopsine de la rétine***

La photodétection de la lumière par la rétine, la phototransduction, la transmission aux centres supérieurs et le traitement de l'information lumineuse ont longtemps été pensés, ne reposer que sur les seuls cônes et bâtonnets (Hattar *et al.*, 2003). Pourtant, à la fin des années 90, des études ont été réalisées notamment chez les rongeurs et chez les humains atteints de dégénérescences innées ou acquises des bâtonnets et des cônes. Leurs observations rapportaient que chez ces sujets, le photoentrainement circadien, la photosuppression du pic de mélatonine sécrétée par la glande pinéale, les décalages de phase liés aux variations des cycles lumière-obscurité, le réflexe pupillaire à la lumière étaient conservés (Panda *et al.*, 2003, Lucas *et al.*, 2003, Ruby *et al.*, 2003). Une seule explication commune était donnée : la présence d'un troisième type de photorécepteur non encore identifié, capable de maintenir ces fonctions en l'absence des cônes et des bâtonnets et disposant d'un photopigment vitamine A dépendant sensible à une longueur d'onde lumineuse dans le turquoise (environ 480nm) (Freedman 1999, Lucas 1999).

Dans le même temps, Provencio et ses collaborateurs découvraient en étudiant les mélanophores photosensibles du derme de *Xenopus laevis*, une protéine de la famille des opsines qu'ils nommèrent la mélanopsine. Il existe deux familles de gènes de la mélanopsine, le premier présent chez tous les vertébrés en dehors des mammifères, nommé *Opn4x* et le deuxième présent chez tous les vertébrés y compris les mammifères, nommé *Opn4m*, sur lequel repose notre projet et que nous

appellerons simplement le gène de la mélanopsine (Do et Yau 2010, Sexton *et al.*, 2012). La mélanopsine était très vite mise en évidence dans les rétines de mammifères, tout particulièrement de l'homme et des rongeurs (Provencio *et al.*, 2000).

Dès lors, la mélanopsine apparaît comme un photopigment clé pour la détection des ambiances lumineuses, notamment, de haute intensité. Son rôle est important dans les fonctions visuelles non impliquées dans la constitution d'une image, comme le photoentrainement circadien de l'activité locomotrice ou du cycle veille sommeil, la photosuppression de la production de mélatonine par la glande pinéale, le photoréflexe pupillaire, notamment ; ceci repose sur les nombreuses projections des cellules à mélanopsine de la rétine vers des structures cérébrales d'intérêt.

La mélanopsine est exprimée par une sous-population de cellules ganglionnaires de la rétine (moins de 2% dans la rétine de rongeurs adultes). Ces cellules ganglionnaires de la rétine et elles seules sont intrinsèquement photo répondantes d'où l'acronyme en anglais qui les désigne : ipRGCs. Ces cellules expriment toutes la mélanopsine et uniquement ce photopigment. Leurs corps cellulaires sont situés dans la couche interne de la rétine des mammifères notamment des humains et des rongeurs (souris et *Arvicanthis*) (Dkhissi-Benyahya *et al.*, 2006, Fu *et al.*, 2005, Peirson *et al.*, 2004).

La mélanopsine des hommes et des rongeurs est une opsine proche aux niveaux phylogénétique et fonctionnel de l'opsine rhapsodérique retrouvée chez les invertébrés. C'est une protéine de type récepteur à sept domaines transmembranaires (figure 5) couplé à une protéine Gq avec une Phospholipase C,

comme second messenger intracellulaire et dont l'activation entraîne une dépolarisation cellulaire.

*Figure 5. La conformation de la mélanopsine au niveau de la cellule ganglionnaire de la rétine (Do et Yau 2010)*

Au sein de la même cellule, la mélanopsine absorbe un second photon à une longueur d'onde opposée (rouge) au premier photon absorbé dans le bleu. Ceci permet une réisomérisation du all-trans-retinal (état actif du chromophore) en 11 cis-retinal (état inactif du chromophore) sans libération par la mélanopsine du all-trans-retinal et sans nécessité d'utiliser une deuxième cellule pour permettre la réisomérisation et le changement d'état comme cela est observé chez les cônes et les bâtonnets (figure 6).

Figure 6. Schéma qui illustre les phototransductions de différentes opsines dont celle des ipRGCs (Hatori et Panda 2010)

La mélanopsine est présente au niveau de la rétine dès le 10<sup>ème</sup> jour de la vie embryonnaire des souris et est fonctionnelle dès le 10<sup>ème</sup> jour post natal (P10). Sa densité d'expression est la même entre les dendrites et le corps cellulaire des ipRGCs. Les axones expriment également la mélanopsine, mais à distance de la papille (Hattar *et al.*, 2003, Hatori et Panda 2010, Do et Yau 2010, Sexton *et al.*, 2012).

Le réseau rétinien

L'information lumineuse non-visuelle provenant des cônes et des bâtonnets est transmise aux ipRGCs. L'ensemble de l'information lumineuse utilisée pour les fonctions non-visuelles, en particulier mélanopsinergiques, mais aussi celle issue des

cônes et des bâtonnets est transmis au cerveau par les ipRGCs. Cela aboutit à la dépolarisation des ipRGCs permettant une propagation du potentiel d'action, ainsi généré le long de leurs axones qui constituent le nerf optique et des voies conduisant aux centres supérieurs. La particularité de la réponse des ipRGCs à l'influx lumineux est de ne pas participer à la formation d'une image contrairement à la fonction des deux autres photorécepteurs de la rétine. Chez ces derniers, situés dans la couche externe, l'influx lumineux provoque non pas une dépolarisation, mais une hyperpolarisation cellulaire (Schmidt *et al.*, 2011, Sexton *et al.*, 2012). Cette particularité neurophysiologique repose en grande partie sur les spécificités des opsines exprimées par ces photorécepteurs, dont les mécanismes d'utilisation et de transformation d'un état à un autre des chromophores conduisent à une polarisation cellulaire opposée.

Cependant, les cellules constitutives de la rétine, y compris ces trois types de photorécepteurs forment un réseau interactif et collaboratif permettant une transmission et une traduction optimales de l'information lumineuse visant à constituer ou non une image (figure 7)

[Figure 7. Le réseau rétinien \(Lok 2011\)](#)



Il existe plusieurs sous types d'ipRGCs qui se distinguent morphologiquement, mais également et éventuellement par leurs connexions dendritiques et leurs projections (figure 8). Le sous type M1 établit des contacts dendritiques avec les cellules bipolaires de la partie externe de la couche interne plexiforme OFF, les sous types M2, M4, M5 établissent des connexions dendritiques avec les cellules bipolaires de la partie interne de la couche interne plexiforme ON. Le sous type M3 établit des connexions dendritiques avec les cellules bipolaires ON et OFF de la couche interne plexiforme. Le signal exciteur émanant des cellules bipolaires OFF et aboutissant aux cellules ganglionnaires de la rétine dont les dendrites sont stratifiés dans la couche OFF répond à une intensité lumineuse décroissante et celui provenant des cellules bipolaires ON et aboutissant aux cellules ganglionnaires de la rétine dont les dendrites sont stratifiés dans la couche ON répond à une intensité lumineuse croissante (Do et Yau 2010, Schmidt *et al.*, 2011).

*Figure 8. Les sous types d'ipRGCs (Schmidt et al., 2011)*

La voie ON est réputée la plus importante dans l'élaboration des réponses directes, non circadiennes, non réduites aux fonctions de la vision constitutives de l'image visuelle ( activité locomotrice, cycle veille sommeil, humeur, cognition) à la lumière alors que la voie OFF participe principalement à la phototransduction via la mélanopsine impliquée dans le photoentrainement à travers ses projections axonales sur le SCN et à la photocontraction pupillaire à travers les projections axonales sur le noyau olivaire prétectal. Cependant il est à noter que les ipRGCs sont sensibles à des hautes intensités et à un spectre lumineux étroit proche du bleu à une longueur d'onde de 460-480 nm. En dehors de ces paramètres, leur sensibilité à la lumière est faible, notamment à basse intensité pour laquelle les bâtonnets jouent un rôle clé en s'hyperpolarisant. Il existe un circuit rétinien multisynaptique et complexe entre les

photorécepteurs de la couche externe (bâtonnets et cônes) et les ipRGCs. Ces interconnexions facilitent les collaborations entre chacun et permettent d'optimiser le recueil de l'information lumineuse, sa transduction et sa transmission au delà de la rétine vers les centres supérieurs à travers les ipRGCs, relais incontournable entre la rétine et le cerveau. Cela nécessite de s'adapter aux caractéristiques de la lumière, aux compétences et aux limites physiologiques de chacun des photorécepteurs.

Les ipRGCs répondent à la lumière de forte intensité, de durée d'exposition prolongée mais sont moins sensibles que les cônes et encore bien moins que les bâtonnets. Les études morphofonctionnelles ont montré que cette basse sensibilité même par rapport aux cônes est sans doute liée à une densité moléculaire de l'ordre de 3 molécules par  $\mu\text{m}^2$  pour les ipRGCs et de 25000 molécules par  $\mu\text{m}^2$  pour les cônes et les bâtonnets. Les ipRGCs ont des probabilités de capture de photon faibles, mais ont un grand potentiel d'amplification de la réponse unitaire, à la différence des cônes et qui plus est des bâtonnets qui ont la plus grande réponse unitaire.

Toutefois, la contribution des bâtonnets au photoentrainement circadien est de deux ordres selon l'intensité de la lumière :

A basse intensité, les bâtonnets captent l'information et sont indispensables à la phototransduction à ce moment précis compte tenu de l'insensibilité des ipRGCs. Ils participent dans ces conditions au photoentrainement circadien en transmettant l'information lumineuse traduite via les ipRGCs aux centres supérieurs à partir de la rétine. Lors d'exposition à une lumière prolongée, les bâtonnets continuent à transmettre l'information en collaboration avec les cônes et surtout avec les ipRGCs grâce au circuit rétinien, même si leur courant photique est saturé.

## ***Les projections vers les structures du cerveau***

Depuis la mise en évidence il y a plus de 10 ans des ipRGCs chez les mammifères, leur étude chez l'homme et les rongeurs a permis de mieux préciser et comprendre les rôles qu'elles jouent dans la traduction et la transmission de l'information non visuelle de la lumière, celle qui ne participe pas à la constitution d'une image. Il existe de nombreuses projections vers les centres supérieurs issues des ipRGCs qui participent aux fonctions non visuelles. L'une d'elle via le tractus rétino hypothalamique est majeure et spécifique de ce photorécepteur et aboutit aux noyaux suprachiasmatiques (SCN), autrement appelés, l'horloge biologique centrale ce qui explique l'implication des ipRGCs dans le photoentrainement circadien. D'autres cibles cérébrales des ipRGCs (Hannibal et Fahrenkrug 2004, Hattar *et al.*, 2006, Ecker *et al.*, 2010) ont été identifiées parmi elles :

La zone sous paraventriculaire ventrale impliquée dans la régulation circadienne du sommeil et de l'activité locomotrice

L'aire préoptique ventrolatérale impliquée dans la régulation des états veille/sommeil

La bandelette intergénéculée impliquée dans la régulation photique et non photiques de l'activité des SCN

Le noyau olivaire prétectal impliqué dans le photocontraction pupillaire

Le colliculus supérieur impliqué dans l'attention visuelle et dans la perception des mouvements.

Par ailleurs, d'autres zones clés sont des projections des ipRGCs :

L'*habenula* latérale qui est un noyau diencephalique (l'autre étant l'*Habenula* médiale) contribuant à la modulation des comportements, jouant un rôle essentiel également dans les fonctions cognitives telle que l'attention ; elle est impliquée dans la régulation des activités monoaminergiques au niveau du tronc cérébral,

intervenant ainsi dans l'interaction fonctionnelle entre les troubles du sommeil et la dépression,(Aizawa *et al.*, 2013a, 2013b).

L'amygdale qui est une aire constituée d'un ensemble de noyaux temporaux constitutifs d'une partie du système limbique et divisée en deux parties (une centrobasolatérale et une corticomédiale ) ; elle est impliquée dans la régulation des émotions telles que la peur et l'anxiété.

La substance grise périaqueducale qui est située dans le tronc cérébral intervient, entre autres, dans la régulation des comportements défensifs.

*Figure 9. Les principales projections cérébrales des ipRGCs (LeGates et al 2014, d'après Hattar et al., 2006)*

Sous l'influence de la lumière, l'horloge endogène et centrale (Moore et Eichler 1972) située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus antérieur à la base du 3<sup>ème</sup> ventricule régule de nombreuses fonctions biologiques de

l'organisme. Par exemple, la lumière supprime ou décale, la synthèse de la mélatonine qui a lieu au sein de la glande pinéale et sa libération normalement effectuée lors de la nuit chronologique.

*Figure 10. La représentation schématique des principales fonctions biologiques contrôlées par l'horloge biologique circadienne (Gronfier C 2009)*

L'horloge contrôle la rythmicité d'un nombre important de fonctions physiologiques (figure 10) ayant une période proche de 24 (rythme circadien). Cette activité rythmique endogène et circadienne est sous tendue et modulée par des boucles moléculaires positive ou négative contrôlant l'expression des gènes dit « horloges » et la synthèse des protéines associées (figure 11).

Figure 11. Les fonctions principales contrôlées négativement (flèche rouge vers le bas) ou positivement (flèche verte vers le haut) par la boucle moléculaire de l'oscillateur circadien constitué des gènes « horloges » et de leurs facteurs de transcription (Richards et Gumz 2013)

BMAL1 et CLOCK sont des protéines qui activent la transcription des gènes «horloges », tels que *Per*, *Cry* qui eux mêmes sont sous l'influence de régulateurs transcriptionnels tels que *Ror*, *Rev-Erb*. Il existe plusieurs boucles de régulation, l'une d'elles correspond à l'accumulation des protéines PER (1, 2, 3) et CRY (1,2) qui vont former à partir d'un certain seuil, un complexe avec le dimère BMAL1-CRY, ce

qui va inhiber leurs propres transcriptions. Une autre boucle fait intervenir la protéine REV-ERB qui inhibe la transcription de *Bmal1* tandis que la protéine ROR l'active. Enfin la protéine SIRT1 se lie au complexe BMAL1-CRY et active la dégradation de PER2 (figure 12). L'ensemble de ce réseau composé de gènes «horloges » et de régulateurs transcriptionnels constitue le cœur cellulaire de l'horloge centrale et permet grâce à ces boucles de régulation de maintenir l'expression des cibles de ces gènes selon des cycles d'environ 24h (Challet E. 2007, Gronfier C. 2009, MC Carthy et Welsch 2012).

*Figure 12. Le modèle de boucle moléculaire (Transcription-translation) oscillante de l'horloge des mammifères (Richards et Gumz 2013)*

***Les modèles murins génétiquement modifiés***



Depuis le début des années 2000, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développés pour permettre d'étudier la neurophysiologie, la neuroanatomie, la neurobiologie et les projections des ipRGCS en fonction de l'expression ou de l'inactivation du gène de la mélanopsine.

Chez la souris (*Mus musculus*), le gène de la mélanopsine se situe sur le chromosome 14 à 20,83 cM et comprend 9525 paires de bases et 9 exons. Chez l'homme (*Homo sapiens*), le gène de la mélanopsine se situe sur le bras court du chromosome 10 (10q22), comporte 11800 paires de bases et 10 exons (Provencio *et al* 2000).

MGI: numéro d'identification de l'allèle modifié	Symbole de l'allèle	Code de la mutation, auteur du modèle	Chromosome	Synonyme	code et type de mutation	Transmission	Abnormal Phenotypes Reported in these Systems
3798479	Opn4 <sup>tm1(cre)</sup>	targeted mutation 1, Satchidananda Panda	14	Opn4<Cre>	targeted mutation 1, recombinase	Germline	behavior   cellular   nervous system   vision/eye
4881482	Opn4 <sup>tm1.1(cre)</sup>	targeted mutation 1.1, Samer Hattar	14	Opn4<Cre>	targeted mutation 1.1, recombinase	Germline	behavior   nervous system   vision/eye
5520169	Opn4 <sup>tm1.1Yau</sup>	targeted mutation 1.1, King-Wai Yau	14		targeted mutation 1.1, Null/knockout, Reporter	Germline	no abnormal phenotype observed
2449696	Opn4 <sup>tm1Ruby</sup>	targeted mutation 1, Norman F Ruby	14		targeted mutation 1, Null/knockout, Reporter	Germline	behavior
2449695	Opn4 <sup>tm1Skay</sup>	targeted mutation 1, Steve A Kay	14	Opn4<->   Opn4<neo>	targeted mutation 1, Null/knockout	Germline	behavior   homeostasis   nervous system   vision/eye
2449781	Opn4 <sup>tm1Yau</sup>	targeted mutation 1, King-Wai Yau	14	MKO   mop<->   Opn4-   Opn4<taulac>   Opn4<tau-lacZ>	targeted mutation 1, Null/knockout, Reporter	Germline	nervous system   vision/eye
3790239	Opn4 <sup>tm2(DTAYau)</sup>	targeted mutation 2, King-Wai Yau	14	Opn4<aDTA>	targeted mutation 2	Germline	behavior   nervous system   vision/eye
5285845	Opn4 <sup>tm2.1(creERT2)Saha</sup>	targeted mutation 2.1, Samer Hattar	14	Opn4<CreERT2>	targeted mutation 2.1, Inducible, Recombinase	Germline	nervous system

[Figure 13. Les modèles transgéniques Opn4 utilisés depuis 12 ans, dont la souris Opn4 de Ruby en 2002 que nous avons utilisée dans ce projet \(Mouse Genome Informatics \(MGI\), Gene in pubmed\).](#)

Différents modèles de souris transgéniques ont été réalisés depuis la découverte de la mélanopsine pour permettre notamment une caractérisation neuro

anatomofonctionnelle de ces cellules. Le modèle de souris avec lequel, nous avons travaillé, avait été généré par Deltagène Inc. et décrit d'un point de vue génotypique et phénotypique par Norman Ruby dans un article et son supplément parus dans Science en 2002 (Ruby *et al.*, 2002). L'inactivation du gène de la mélanopsine a consisté au remplacement d'un fragment de 38bp qui correspond à un segment de la région codant pour la protéine OPN4 par un fragment IRES-lacZ-neo, rapporteur associé à une cassette résistante à la néomycine, sur un allèle dans l'exon 3 générant une mutation « perte de fonction » par délétion des acides aminés 116 à 128. Après électroporation de cellules souches embryonnaires de souris de souche 129P2/OlaHsd et sélection de celles présentant une résistance à la généticine (G418), les cellules ont été injectées dans des blastocytes de la souche C57BL6/J pour donner lieu à la première génération (F1) de souris Opn4 modifiée.

Figure 14. La construction du modèle transgénique selon Ruby (A) , exemple de bandes révélées (allèle mutant, allèle sauvage) après la PCR ( B) et analyse génotypique (C) , coupe de rétine avec marquage Lac Z de quelques cellules ganglionnaires (D).

La pérennisation de ce modèle a reposé sur une reproduction maintenant un fond génétique hétérogène (C57BL6/J-sv129) d'une part et sur une reproduction réalisant un croisement en retour permettant de purifier le fond génétique avec un génome de près de 99,9% de fond C57BL6/J à la 9ème-10<sup>ème</sup> génération (F9-F10). Nous ne souhaitons pas perturber les analyses phénotypiques par des biais induits par la part de tel ou tel fond génétique dans l'expression comportementale. Ainsi, nous avons choisi de ne travailler qu'avec des souris de fond génétique C57BL6/J, mâles, homozygotes.

Chez les souris mutantes *Opn4<sup>-/-</sup>*, quel que soit le type d'invalidation (absence de protéine, protéine tronquée), les ipRGCs se développent avec une morphologie, des projections centrales et un nombre de cellules au niveau de la couche interne de la rétine normaux. Comme cela a été décrit dans l'article de R. Lucas *et al* 2003 qui faisait état d'un phénotypage normal de ce modèle de souris transgéniques en dehors de la perte de fonction portée par l'invalidation du gène de la mélanopsine qui est la photosensibilité intrinsèque.

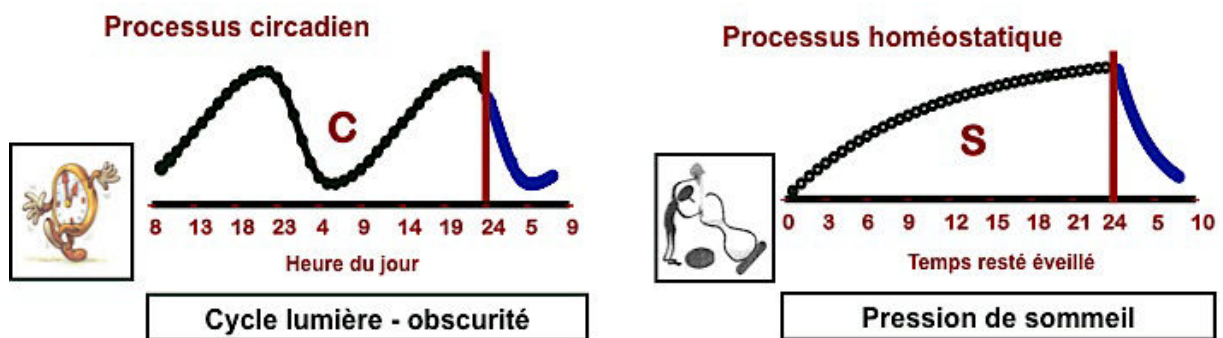
## **Le sommeil**

Le sommeil est une fonction physiologique primordiale et vitale. L'harmonie autant dans ses rythmes que dans sa qualité et dans sa quantité est indispensable à l'équilibre et au bon fonctionnement de l'organisme puisqu'il s'agit d'une étape de récupération, de régénération de nombreuses fonctions biologiques (Markov et Goldman 2006, Rechtschaffen *et al.*, 1998, Fuller *et al.*, 2006)

### ***Les rythmes veille/sommeil et leurs acteurs principaux :***

Le sommeil est sous le contrôle de deux mécanismes (figure 15). Un mécanisme circadien (processus C) d'une part, correspondant au cycle veille/sommeil durant 24 heures déterminé par l'horloge interne située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC) et un mécanisme homéostatique (processus S) d'autre part, celui-ci est un équilibre dynamique entre la dette et la récupération du sommeil ; la pression de sommeil augmente avec l'éveil

et diminue avec le sommeil (Borbely AA 1982, Borbely et Achermann 1999, Czeisler et Gooley 2007).



*Figure 15. Les processus S et C (d'après Achermann et Borbely 1992)*

La composante circadienne liée aux noyaux suprachiasmatiques du rythme veille sommeil est un processus robuste. Les structures telles que le noyau préoptique ventrolatéral, la zone sous paraventriculaire, le noyau dorsomédial de l'hypothalamus impliquées dans l'initiation et le maintien du sommeil se situent en aval des NSC.

## Eveil

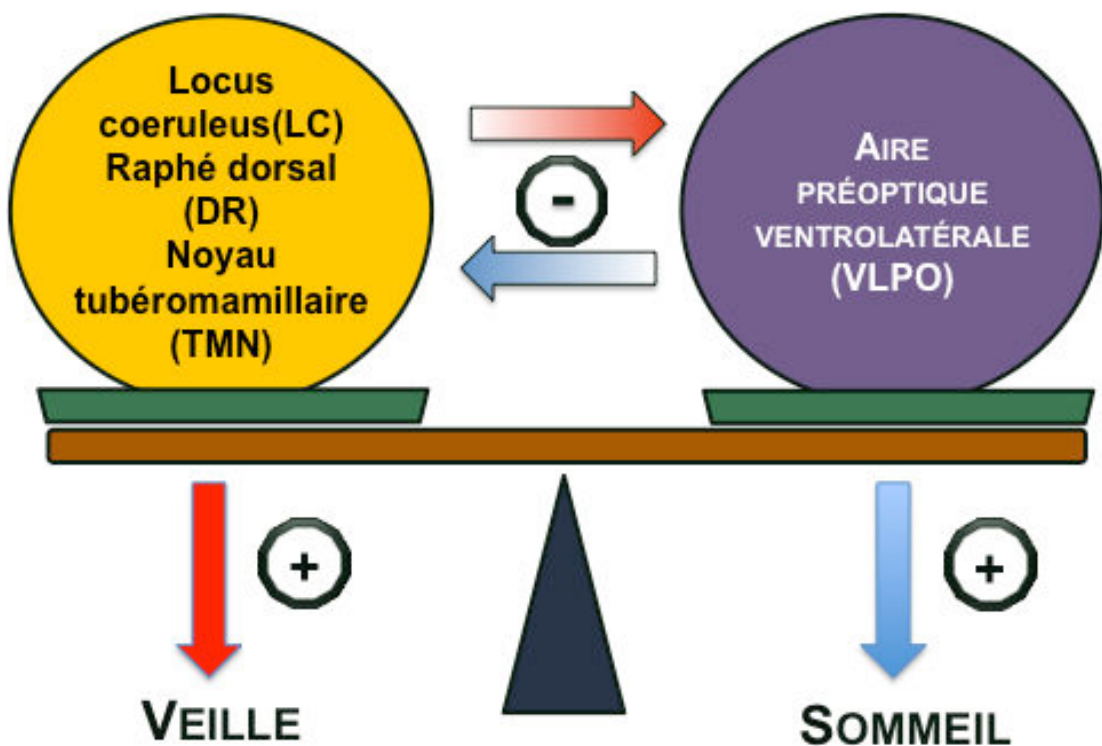
Figure 16. Les structures, voies et neurotransmetteurs impliqués dans l'état de veille (Saper et al., 2005)

# Sommeil

*Figure 17. Les structures, voies et neurotransmetteurs impliqués dans l'état de sommeil (Saper et al., 2005)*

Comme nous l'avons abordé dans les premiers chapitres de notre introduction, différents acteurs sont impliqués dans la régulation des rythmes biologiques. La lumière est le synchroniseur principal de l'horloge et elle exerce des effets importants sur ces mécanismes de régulation. Les informations de mise à jour quotidienne de l'horloge transitent par la rétine et ses photorécepteurs, les cônes, les bâtonnets et les cellules à mélanopsine (Provencio *et al.*, 2000), photorécepteur d'importance découvert chez l'homme en 1999. Ce dernier joue un rôle primordial dans la transmission des informations non visuelles de la lumière à de nombreux centres cérébraux impliqués dans des fonctions aussi diverses que la régulation des affects (habenula latérale, amygdale), du cycle veille/sommeil (zone ventrolatérale

préoptique, substance grise périaqueducule ventrale) (figures 16 et 17), de l'activité locomotrice (zone sous paraventriculaire ventral), des rythmes biologiques (noyaux suprachiasmatiques). Plusieurs études conduites chez l'homme et chez l'animal ont confirmé la stabilité de la période de 24h du rythme circadien dans l'entraînement veille/ sommeil. La mélatonine est une neurohormone synthétisée, libérée par la glande pinéale selon un rythme quotidien et annuel qui est contrôlée par l'horloge centrale. La lumière bloque la libération de mélatonine *via* les cellules à mélanopsine et peut décaler la rythmicité circadienne du cycle veille/sommeil. La balance veille/sommeil oscille entre un état d'éveil et un état de sommeil en fonction des informations transmises par les centres régulateurs de l'un ou de l'autre état, par les régulateurs circadiens intrinsèques ou extrinsèques et par les régulateurs humoraux (figure 18) (Dijk *et al.*, 1999, Saper *et al.*, 2005).



*Figure 18. Modèle de régulation (Flip Flop) : Inhibition réciproque entre les structures d'éveil et de sommeil (d'après Saper *et al.*, 2005)*



### ***Les systèmes neurophysiologiques de l'alternance veille-sommeil :***

Deux systèmes neurophysiologiques participent de ce rythme veille/sommeil. Le système de l'éveil associe les systèmes glutamatergique, cholinergique, noradrénergique, dopaminergique, histaminergique, hypocrétinergique et sérotoninergique, dont les localisations neuroanatomiques respectives sont la formation réticulée, le tegmentum pontique et les noyaux de la base, le locus coeruleus, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale, l'hypothalamus postérieur et latéral, les noyaux du Raphé (figures 16, 17, 19). L'adénosine dans ce système joue un rôle particulier et différencié puisqu'elle inhibe le système cholinergique et précipite l'endormissement au terme d'une lente accumulation pendant l'éveil prolongé (Mignot *et al.*, 2002, Saper *et al.*, 2010).

*Figure 19. Les structures, voies et neurotransmetteurs favorisant la veille (en rouge) et le sommeil (en bleu) (Mignot et al., 2002)*

La transition entre la veille et le sommeil, appelé endormissement, coïncide à un état anti éveil, impliquant l'adénosine, la sérotonine et l'hypocrétine et fonctionnant comme une bascule entre le sommeil et la veille .

Le système du sommeil est également complexe et met en jeu des structures différentes en fonction du type de sommeil exploré; le sommeil lent est le fruit d'une mise en jeu des systèmes thalamo-corticaux de synchronisation, des noyaux de la base et des noyaux préoptiques ventrolatéraux, en inhibant les centres de l'éveil (figure 20).

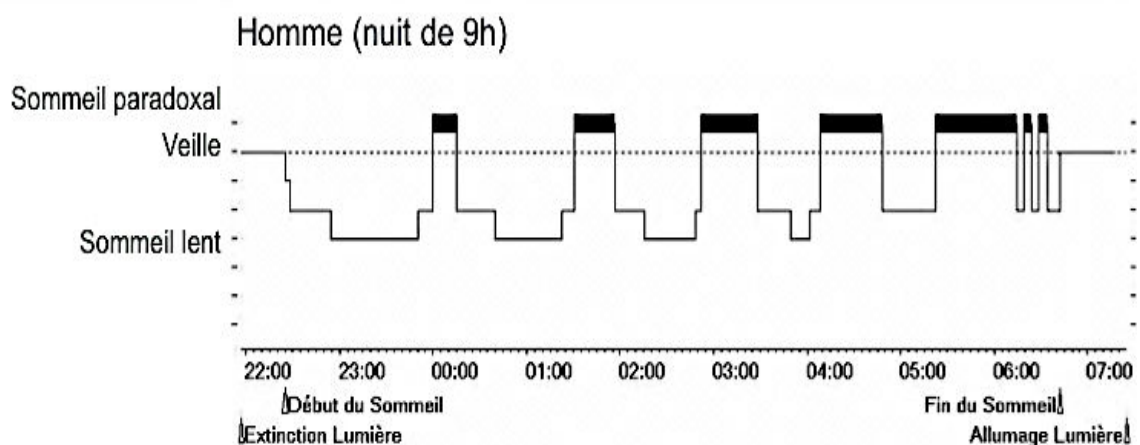
Figure 20. Les systèmes de régulation veille sommeil hypothalamique et mésencéphalique (Mignot et al., 2002)

Les systèmes du sommeil paradoxal (ou REM sleep) quant à eux sont organisés en deux réseaux. Ils oscillent entre un état favorisant l'entrée en REM (SP-on) et un état bloquant le REM (SP-off), Le réseau SP-on est principalement constitué du locus coeruleus alpha, du noyau sub latéral dorsal, du tegmentum pontique dorsal gérant respectivement l'atonie musculaire, les troubles du comportement et l'activité phasique du REM. Le réseau SP-off est quant à lui constitué de la substance grise périaqueducale, du tegmentum pontique latéral, du locus coeruleus et du noyau dorsal du raphé (Fuller *et al.*, 2006, Saper *et al.*, 2010, Cirelli *et al.*, 2011). Le sommeil paradoxal sera entraîné par la succession

d'inhibitions sur l'hypothalamus postérieur et sur les structures du réseau SP-off émanant des noyaux de la base et des noyaux préoptiques ventrolatéraux ; à l'inverse si les centres du sommeil sus nommés sont inhibés ou au repos, il y aura une levée des inhibitions et le réseau SP-off pourra prendre le dessus. Ainsi grâce à ses réseaux de neurones interconnectés, l'alternance du sommeil lent et du sommeil paradoxal se fait selon un processus ultradien.

### ***L'organisation du sommeil et son exploration :***

L'architecture du sommeil dans des conditions physiologiques normales ( figure 21) est un enchaînement harmonieux d'états de vigilance allant de la veille au sommeil profond en passant par un état particulier et caractéristique du sommeil qui est le sommeil paradoxal ( SP ou REM) pendant lequel la posture musculaire est atone, mais le cortex, les fonctions cardiaques et respiratoires notamment ainsi que les mouvements oculaires sont phasiques et actifs (Lu *et al.*, 2006, Fuller *et al.*, 2007, Dijk *et al.*, 1997).



[Figure 21. Un exemple d'hypnogramme normal d'homme](#)

La prise en compte de nombreuses variables physiologiques est utile à l'analyse du sommeil. Chez l'homme, on appelle polysomnographie, l'enregistrement des paramètres du sommeil (électroencéphalogramme-EEG-, électro-oculogramme-EOG-, électromyogramme-EMG-) et des paramètres végétatifs notamment cardiorespiratoires et musculaires (mouvements des membres inférieurs). Le recueil des données de trois dérivations EEG frontal, central, occipital permet de déterminer à quel stade du sommeil, on se situe en fonction de la prédominance par tranche de 30 secondes du type d'ondes recueillies (delta, théta, alpha, bêta, gamma) caractérisées par leur fréquence et par leur amplitude ou de certains graphoéléments caractéristiques d'un stade (figure 22). Ces données sont confrontées à celles recueillies par l'EOG, par l'EMG et on code la période en éveil (W), sommeil léger (N1), sommeil profond (N2, N3) ou sommeil paradoxal (SP) (The American Academy of Sleep Medicine: Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events, 2007).

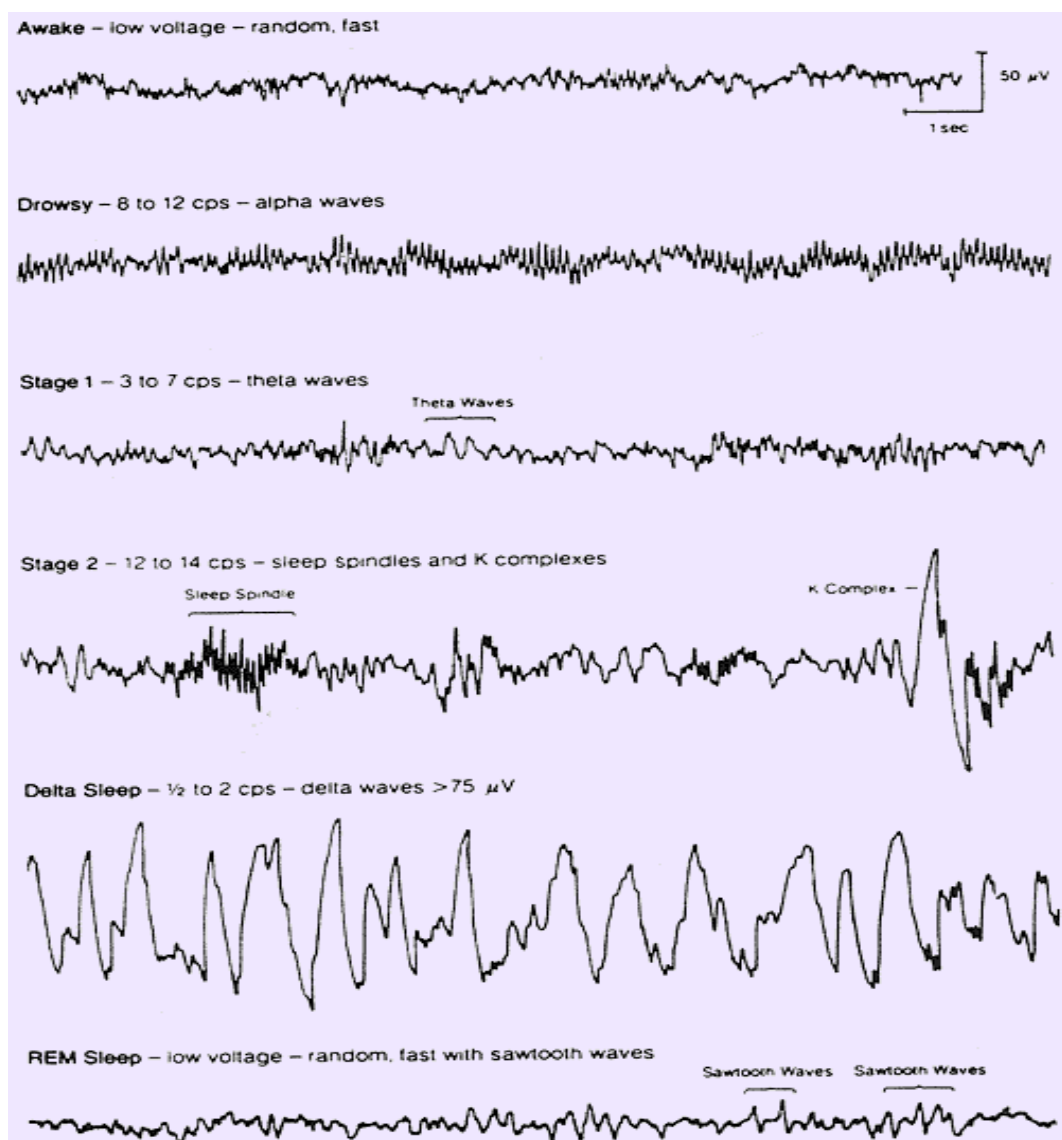


Figure 22. Les tracés EEG caractéristiques en fonction de l'état de vigilance

**Les rôles principaux du sommeil :**

Les grandes fonctions physiologiques ont une régulation et une variation oscillant en fonction des états du sommeil ; au delà des fonctions ventilatoires, cardiovasculaires et endocrines, d'autres fonctions telles que la digestion, la sexualité, la thermorégulation, le métabolisme cérébral sont modifiés en fonction des états de veille et de sommeil par des mécanismes complexes bidirectionnels qui

peuvent engendrer dans certains cas des dysfonctionnements physiologiques et être à l'origine de pathologies somatopsychiques et de troubles du sommeil.

Pour illustrer le propos et l'impact du sommeil, on peut citer quelques rôles joués d'une part par le sommeil lent (restauration métabolique, repos du cortex cérébral, conservation énergétique, processus mnésique) et d'autre part par le sommeil paradoxal (stimulation du développement, contrôle de la plasticité cérébrale, consolidation de la mémoire, immunité) (Tononi et Cirelli 2006).

Le sommeil est rythmé différemment en fonction de la période de la vie ou de l'état psychologique (Adrien 2002) :

La synchronisation de l'horloge permet l'expression des fonctions biologiques au bon moment. Chez l'homme, le rythme veille/sommeil varie en fonction de l'âge. Trois périodes de la vie sont remarquables par leurs caractéristiques et peuvent aboutir à l'extrême à d'authentiques troubles circadiens du sommeil. Tout d'abord le rythme des nouveaux nés est ultradien caractérisé par une alternance veille/sommeil proche du rythme de prises alimentaires et comporte des récurrences toutes les 3 à 4 heures, la fréquence et la durée du temps de sommeil sont augmentées par rapport à l'enfant et à l'adulte jeune. Deux autres périodes de la vie peuvent se distinguer quant aux rythmes veille/sommeil ; pendant l'adolescence, les facteurs physiologiques et sociopsychologiques ont tendance à conduire à un coucher et à un lever plus tardifs ce qui concrètement peut aboutir à un trouble circadien du sommeil appelé retard de phase ; inversement la personne âgée a tendance à un coucher plus précoce associé à une durée de sommeil diminuée parallèlement au vieillissement ce qui conduit à un profil d'avance de phase. Ces troubles circadiens du sommeil peuvent être jugulés en première intention par une évaluation de l'hygiène de sommeil, mais aussi par un apport de mélatonine exogène (circadin®)

et une exposition lumineuse dont les horaires d'administration seront fixés par le type de décalage de phase à traiter.

Le sommeil tout comme l'humeur sont sous le contrôle de processus circadien et homéostatique puisqu'ils sont fortement influencés par une interaction complexe et non-additive de la phase circadienne et du temps passé éveillé (Boivin *et al.*, 1997).

Les états dépressifs se traduisent par des perturbations du sommeil comme des difficultés d'endormissement, des fragmentations du sommeil ou des réveils précoces. Ces troubles du sommeil ne sont pas spécifiques de la dépression puisqu'on les retrouve dans des insomnies d'étiologie différente, mais aussi dans d'autres pathologies du sommeil. Pourtant leur impact en terme de santé publique et leur association signent l'importance que revêt leur interaction fonctionnelle, d'où la nécessité de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques sous jacents. Certaines perturbations de l'architecture du sommeil peuvent être relevés lors de l'enregistrement du sommeil d'un patient dépressif. On pourra noter, chez le patient dépressif, une diminution de la latence du premier REM, une augmentation des périodes de REM en première partie de nuit, une augmentation de la latence du NREM, une diminution de la puissance delta, une diminution de l'activité EEG à type d'ondes lentes, une tendance à augmenter les éveils en deuxième partie de nuit. Ces figures ne sont pas toujours présentes, mais elles font état de perturbations des processus C et S (Frey *et al.*, 2012, Armitage et Hoffmann 2001).

La privation de sommeil a un effet antidépresseur. La lumière exerce des effets importants sur ces mécanismes de régulation. Elle resynchronise le rythme circadien veille/sommeil. Depuis plusieurs décennies, l'accent a été mis sur l'utilisation de la lumière appliquée à une heure précise du nyctémère (le matin ou



le soir), selon une longueur d'onde (lumière blanche à large spectre ou lumière bleue), à une distance des yeux et à une intensité précises (Glickmann *et al.*, 2006, Golden *et al.*, 2005). En effet, la luminothérapie constitue un traitement anti déresseur dans certains sous-types de dépression comme la dépression saisonnière, notamment par un effet d'avance de phase du rythme circadien (Even *et al.*, 2008). Cet effet sur l'horloge ne peut cependant expliquer à lui seul le rôle anti déresseur de la lumière. Les patients souffrant de dépression saisonnière sont en majorité des femmes, leurs symptômes débutent à l'automne et régressent au printemps, le décalage de phase que l'on rencontre le plus souvent est un retard de phase (Lewy 2010). Toutefois, l'homéostasie du sommeil, en comparaison à des sujets sains, est aussi altérée chez ces patients souffrant de dépression saisonnière et la luminothérapie augmente le seuil de l'homéostat de sommeil dans des proportions plus importantes chez ces patients. Pourtant, la possibilité que la lumière puisse exercer un effet anti déresseur *via* une modulation conjointe du processus homéostatique de sommeil n'a encore jamais pu être démontrée.

### ***Le sommeil chez la souris et ses spécificités***

La souris commune (*Mus musculus*) est un petit mammifère rongeur et nocturne de la famille des muridés. La lignée C57BL6/J correspond à la lignée de souris transgéniques la plus utilisée dans les laboratoires pour ses caractéristiques adaptées, notamment, à l'étude des maladies ou troubles humains. La C57BL6/J a la particularité de ne pas sécréter de mélatonine à partir de la glande pinéale, en raison d'une perte de fonctionnalité de l'enzyme AANAT (arylalkylamine N-acetyltransferase) qui permet la transformation de la sérotonine en mélatonine (Roseboom *et al.*, 1998, Kasahara *et al.*, 2010).

Les quantités et la répartition des périodes de repos et d'activité sont inversées par rapport à un être diurne comme l'homme. Chez un animal nocturne, on parle de phase active, en obscurité et de phase de repos, en lumière. Les quantités de sommeil et d'éveil en période de lumière et d'obscurité ont également des caractéristiques particulières sous tendues par la nocturnalité. Elles ont été étudiées et décrites pour cette souche par Paul Franken en ces termes : « en phase d'obscurité qui dure 12 heures, l'éveil représente 75% du temps, le sommeil 25% (22% de sommeil lent et 3 % de sommeil paradoxal), en phase de lumière de 12 heures également, l'éveil représente 44% du temps, le sommeil 56% (49% de sommeil lent, 7% de sommeil paradoxal). Ainsi, pendant la période de près de 24H du rythme circadien de la souris, l'éveil représente 59% du temps et le sommeil 41% (36% de sommeil lent et 5% de sommeil paradoxal) » (Franken *et al.*, 1999). Chez la souris (figure 23), on retrouve des structures cérébrales impliquées dans la régulation des états de vigilance identiques à celles décrites chez l'homme, notamment par Saper et collaborateurs (Saper *et al.*, 2005 et 2010). Schématiquement, le maintien de l'éveil est assuré par des influx ascendants cholinergiques émanant du mésencéphale (la formation réticulaire pontique (PRF), le tegmentum latérodorsal (LDP), le tegmentum pédonculopontique (PPT)) vers le thalamus et du cortex antérobasal (le septum, le tubercule olfactif, la substantia innominata et une partie de l'amygdale) activant ainsi le cortex. L'activation éveillante du cortex est également assurée par les noyaux tubéromamillaires (histamine), l'hypothalamus postérolatéral (hypocrétine), le noyau du raphé dorsal (sérotonine), la partie ventrale de la substance grise périacqueducale (dopamine) et le locus coeruleus (noradrénaline). La structure du NREM est représentée par l'aire préoptique ventrolatérale (GABA, Galanine) qui permet l'induction et le maintien du

NREM grâce à ses projections inhibitrices sur l'ensemble des structures favorisant l'éveil. Le déclenchement, le maintien du REM et l'activation corticale pendant cet état émanent des voies cholinergiques du tegmentum pontique (LDT et PPT) et glutamatergiques de la partie dorso médiane de la formation réticulée pontique (noyau latérodorsal). Les projections pontobulbaire et spinales (glutamatergiques) à partir du noyau latérodorsal participent à la partie tonique du REM (Andretic *et al.*, 2008).

Figure 23. Les coupes sagittales montrant les structures et les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation des états de vigilance chez la souris (Andretic et al., 2008)

Figure 24. Les tracés d'électrocorticogramme de souris adulte en fonction des 3 états de vigilance (en haut) et exemple de répartition du NREM (1<sup>er</sup> en bas) se rapprochant d'une partie d'hypnogramme pour les stades de sommeil non paradoxal chez l'homme et de l'activité motrice (2<sup>ème</sup> en bas) intitulée « motion » (Nelson et al., 2013)

L'enregistrement du sommeil d'une souris s'effectue à partir d'un électrocorticogramme (ECoG) et d'un électromyogramme (EMG). Ces techniques sont plus invasives que chez l'homme puisqu'elles consistent à implanter sous anesthésie profonde et de manière stéréotaxique, deux électrodes de recueil d'ondes thalamocorticales au niveau des cortex frontal et pariétal de chaque hémisphère et deux électrodes insérées au niveau des muscles du cou pour l'enregistrement du tonus musculaire.

Les ondes d'activité électroencéphalographiques ont des caractéristiques variant en fonction des états de vigilance (figure 24). Les ondes delta caractéristiques du sommeil lent ont une grande amplitude et une fréquence de 1 à 4 Hertz (Hz) dominant, elles sont associées également à des oscillations sigma (« spindles ») dans la gamme de 11 à 15 Hz et à quelques composantes dans la gamme des ondes théta (5 à 9 Hz). Pendant l'éveil, les ondes théta majoritaires indiquent un comportement exploratoire, elles sont associées aux ondes gamma d'une fréquence de plus 20Hz signant l'attention, aux ondes alpha entre 8 et 13Hz signant la veille calme, yeux fermés et aux ondes delta de plus faible amplitude présentent lors la zone de transition entre sommeil lent et l'éveil. Enfin le sommeil paradoxal est également indiqué par la présence d'onde théta, mais dans cet état l'EMG est atone (plat) à la différence de l'éveil, c'est d'ailleurs l'analyse simultanée de l'EMG et de l'EEG qui permet de distinguer ces états de vigilance (Franken *et al.*, 1998).

## La dépression

La prévalence des troubles dépressifs dans les pays occidentaux augmente depuis 50 ans, plusieurs centaines de millions en souffrent chaque année à travers le monde (Bartolomucci *et al.*, 2009). L'impact sociale et la morbidité qu'ils constituent en font un des sujets préoccupants et d'importance de la recherche en neurosciences. Ceux qui ont choisi d'orienter leur recherche vers cette thématique tentent d'expliquer les causes (environnementales, épigénétiques, métaboliques), les mécanismes neurobiologiques sous-jacents, les facteurs favorisants, les facteurs aggravants (Krishnan et Nestler 2008, Massart *et al.*, 2012) (figure 25).

*Figure 25. Les facteurs étiologiques impliqués dans la dépression (Tanti et Belzung 2010)*

Pourtant, aucune hypothèse ne s'est avérée exclusive, déterminante ou totalement explicative. Les signaux et les réseaux monoaminergiques, les prédispositions génétiques, l'activation de l'axe corticotrope, les neurosciences comportementales et moléculaires, les fonctions peptidométaboliques, le stress ont été proposés pour élaborer une théorie neurobiologique explicative de la dépression. Les causes et leurs rôles sont de mieux en mieux identifiés et compris, mais n'expliquent pas tout non plus que ce soit les théories neurogéniques et neurotrophiques, la contribution des modifications épigénétiques, le rôle des circuits de la récompense, l'influence du genre, des stéroïdes, de l'immunité, les médiateurs de l'homéostasie énergétique (Berton *et al.*, 2012, Krishnan et Nestler 2010, Hariri AR 2010) (figure 26).

*Figure 26. La relation entre développement, horloge circadienne, facteurs environnementaux et psychopathologie (Frank et al., 2013)*

Les études chez l'homme reposant sur l'imagerie fonctionnelle ou sur des coupes neuroanatomiques autopsiques ont contribué à identifier des structures cérébrales impliquées dans les troubles qui caractérisent la dépression (Desseilles et al., 2009). Parmi elles, les cortex préfrontal et cingulaire, l'hippocampe contribueraient aux troubles cognitifs et aux troubles du contrôle des émotions (Snyder et al., 2011), L'amygdale et le striatum à travers, notamment, le noyau accumbens participeraient aux réponses aversives et dysfonctionnelles de la récompense au décours d'un déclencheur émotionnel. Enfin un rôle non négligeable serait joué par l'hypothalamus concernant les troubles du sommeil, de l'appétit, de la libido, de l'élan vital.

*Figure 27. L'impact de la lumière sur des structures impliquées dans la modulation de l'humeur (Mac Carthy et Welsch 2012)*



Ces structures interagissent et s'inscrivent dans des circuits neuronaux complexes d'une part monoaminergiques ce qui sous tendaient les théories mécanistiques et thérapeutiques de la dépression avancées, autrefois, sur lesquelles reposent la grande partie des antidépresseurs, et d'autre part non monoaminergiques : peptidergiques, glutamatergiques (Cunha et al., 2013, Willner *et al.*, 2013).

Les recherches fondamentales sont basées sur des modèles animaux qui, certes, peuvent reproduire certains signes (la perte de poids, la perte de l'appétit, l'altération de la locomotion, de l'exploration, de la cognition, de l'envie) nécessaires pour établir un diagnostic de dépression, mais avec les limites liées à l'interprétation d'un trouble observé chez un rongeur (El Yacoubi et Vaugeois 2007, Krishnan et Nestler 2008). La limite principale réside dans la difficulté à décliner pour un modèle animal, l'ensemble des signes cliniques et comportementaux faisant le lit d'un diagnostic de dépression chez l'homme tel qu'il est défini dans le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM IV TR, American Psychiatric Association, version IV révisée en 2000) sans risquer de verser dans l'interprétation erronée et dans l'anthromorphisme (Berton *et al.*, 2012).

Paradoxalement alors que nombre d'études notamment pharmacologiques reposent sur des tests comportementaux, le domaine qui a fourni le moins de réponses novatrices et efficaces se situe dans le domaine de la thérapie antidépressive. Nous disposons actuellement de molécules thérapeutiques essentiellement basées sur le concept monoaminergique datant de près de 50 ans et qui ne contrôlent de loin pas toutes les formes de dépressions, leurs installations, leurs récurrences (O'leary et Cryan 2013). Les études futures devraient explorer d'autres voies thérapeutiques alternatives sous tendues par une meilleure

compréhension des mécanismes et des structures impliquées et spécifiques des différentes formes de dépressions (Terman et Terman 2005, Berton et Nestler 2006, Even *et al* 2008, Srinivasan *et al.*, 2009, Lobo *et al.*, 2012, Tanti et Belzung 2013, Belzung *et al* 2014,).

La dépression saisonnière (figure 27) revêt des signes cliniques correspondant au tableau du syndrome dépressif tel qu'il est décrit dans le DSM IV TR, mais cet état est transitoire, constaté en période hivernale, le plus souvent, entre les mois d'octobre et de mars dans les pays de l'hémiphère nord du globe terrestre. Le mécanisme neurobiologique avancé repose sur un décalage de phase du rythme circadien lié à la baisse de luminosité à cette période de l'année (Lam et Levitan 2000). Cependant, les éléments circadiens n'expliquent pas l'intégralité des présentations cliniques, des récurrences et des rémissions des patients souffrant d'authentiques dépressions saisonnières (Wirz Justice A 2003, Vandevallée *et al.*, 2011, Frey *et al.*, 2012, Roecklein *et al.*, 2013).

## **Hypothèse de travail à l'origine de ce projet**

Comme nous l'énoncions précédemment, le sommeil est sous le contrôle des mécanismes circadien (C : correspondant à l'alternance de veille/sommeil de 24 heures déterminé par l'horloge interne située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus -NSC) et homéostatique (S : équilibre dynamique dette/récupération du sommeil, la pression de sommeil augmentant avec l'éveil et diminuant avec le sommeil). L'humeur est également sous le contrôle des processus circadien et homéostatique puisqu'elle est fortement influencée par une interaction complexe et non-additive de la phase circadienne et du temps passé éveillé

(Stephenson *et al* 2012). La privation de sommeil a d'ailleurs montré un effet antidépresseur au sein d'une population de dépressifs (Boivin 2000)

La lumière exerce des effets importants sur ces mécanismes de régulation. Elle resynchronise le rythme circadien veille/sommeil. La luminothérapie constitue un traitement anti dépresseur dans certains sous-types de dépression comme la dépression saisonnière par un effet d'avance de phase du rythme circadien. Cet effet sur l'horloge ne peut cependant expliquer à lui seul le rôle anti dépresseur de la lumière. Chez les patients souffrant de dépression saisonnière, l'homéostasie du sommeil est altérée, en comparaison à des sujets sains, et la luminothérapie augmente le seuil de l'homéostat de sommeil dans des proportions plus importantes chez les patients dépressifs. Pourtant, la possibilité que la lumière puisse exercer un effet direct, non circadien (Hubbard *et al*, 2013) de l'humeur impliquant une modulation du processus homéostatique de sommeil n'a jamais pu être démontrée. A cet égard, nos récents travaux sur le rôle de la mélanopsine dans la régulation du sommeil ouvrent des perspectives intéressantes. Notre récente observation (Tsai *et al.*, 2009) qu'un photopigment, la mélanopsine, influence l'homéostasie du sommeil apporte une dimension nouvelle et permet pour la première fois d'envisager un lien entre lumière, mélanopsine, homéostasie du sommeil et trouble de l'humeur.

L'objectif de notre projet est d'étudier l'effet bénéfique exercé par la lumière sur l'humeur par une action directe, non circadienne à travers les cellules ganglionnaires à mélanopsine de la rétine et leurs projections cérébrales. Nous souhaitons participer à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques qui sous-tendent les phénomènes de dépression saisonnière observée chez l'homme et les effets positifs de la luminothérapie et de la privation de sommeil (effet sur l'homéostat et effet antidépresseur) sur les dépressions. Grâce à

un modèle de souris transgéniques, où le gène de la mélanopsine est invalidé, nous pourrions évaluer les effets directs, non circadiens de la lumière et mieux comprendre le rôle spécifique des cellules à mélanopsine sur le comportement anxio dépressif et le sommeil.

# **MATERIELS ET METHODES**

Toutes les expériences de notre projet ont été conduites dans le respect de la directive européenne 2010/63/UE du 22 septembre 2010 et du décret d'application en France datant du premier janvier 2013 et ont fait l'objet de saisines approuvées par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animal de Strasbourg (CREMEAS).

## **Les animaux**

Au laboratoire, nous avons établi la lignée de souris de fond génétique C57BL6/J (Gardier et Bourdin 2001) originaires de Deltagen Inc, invalidées pour le gène *Opn4* (homozygotes *Opn4<sup>-/-</sup>* et hétérozygotes *Opn4<sup>+/-</sup>*) à partir d'un couple de souris hétérozygotes *Opn4<sup>+/-</sup>* de fond génétique 129Sv, obtenu du département de sciences biologiques de l'université de Stanford (Palo Alto, CA, USA). L'obtention de nos souris mutantes pour *Opn4* sur un fond génétique C57BL6/J (pur à 99%) a nécessité 9 générations d'un rétro-croisement  $F_{(n)}$  X C57BL6/J. Le phénotype associé à une mutation génétique peut varier selon le fond génétique des animaux étudiés. Cette variation phénotypique est d'autant plus importante chez des individus hybrides, issus de fonds génétiques différents (typiquement 129Sv et C57BL6/J dans le cas de souris génétiquement modifiées). Il est donc nécessaire, afin de diminuer la variation inter-individuelle, de mener notre étude sur des animaux ayant un fond génétique « pur », à 99% C57BL6/J. Un second argument pour l'étude sur un fond C57BL6/J provient des connaissances éthologiques et comportementales générales chez la souris (Rodgers *et al.*, 2002, Crawley 2007). Ces données ont été recueillies au cours des décennies par les neurosciences comportementales chez des souris sauvages de fond génétique C57BL6/J.

Dès leur naissance et jusqu'au moment du sevrage maternel aux environs de la 4<sup>ème</sup> semaine, nos souris continuent à être hébergées en zone transgénique. Pendant cette période notamment à partir de P10, les extrémités de leurs queues sont prélevées, congelées à -20°C et transmises par lot (généralement une même portée) à notre équipe pour permettre le génotypage de ces souris vis à vis du gène de la mélanopsine.

Dès leur transfert en zone expérimentale, les souris sont isolées socialement et disposées dans des cages individuelles de type 2 (L x l x h= 265x205x140 en mm) ou de type 2L (L x l x h= 365x205x140 en mm) pour celles, dont le sommeil est enregistré par ECoG et EMG. La nourriture sous forme de cylindres calibrés et normocaloriques, dont les caractéristiques sont 2.89 kcal/g, 14% kcal de lipide, 27% kcal de protide and 59% de glucides (SAFE 105; SAFE, Augy, France) et l'hydratation (eau dans un biberon de 250ml) sont mis à disposition, ad libitum, et disposées sur une grille au dessus de la cage. Les souris ont, dans des conditions physiologiques normales de stabulation en laboratoire, une consommation moyenne par 24h en nourriture de 15g par 100g de poids et en eau de 15ml par 100g de poids. L'approvisionnement en eau, en aliments calibrés (5g par cylindre) et le changement de la litière sont effectués une fois par semaine, au minimum, associés à un contrôle quotidien de la qualité de la stabulation et de l'état sanitaire des animaux.

Simultanément, nous procédons à une inversion des temps de lumière et d'obscurité par rapport au rythme habituel : lumière blanche de 19 h à 7 h et obscurité totale (sans lumière rouge) de 7 h à 19 h. Nous avons opté pour cette répartition de la lumière au cours du nycthémère, car nous souhaitions réaliser les tests comportementaux en phase d'obscurité (phase active, la nuit pour un

mammifère nocturne) qui est la phase d'activité d'une souris. Ceci nous paraissait plus approprié, plus pertinent et surtout plus proche de la réalité des signes cliniques de dépression mis en évidence chez l'humain qui s'observent et se manifestent plutôt pendant l'éveil (phase active, jour pour un mammifère diurne) que pendant le sommeil (phase de repos, la nuit chez un mammifère diurne). Cette période d'habituation dure trois semaines, elle permet d'observer les animaux, de vérifier leurs états sanitaire et physiologique et de les manipuler avant de débiter les tests expérimentaux.

Pendant les phases expérimentales d'exposition lumineuse modulée en fonction du paradigme choisi, les souris sont hébergées dans une armoire de grande capacité contrôlant l'humidité, la température ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ ) et les modalités d'éclairage. Cette armoire ventilée a été conçue, à façon, par la société Charles River en collaboration avec son service d'ingénierie et la plateforme du Chronobiotron pour répondre à nos exigences expérimentales de contrôle de l'intensité lumineuse. Elle comporte deux compartiments indépendants, ventilés, dont l'éclairage est en cycle jour/nuit et qui disposent de dix emplacements chacun répartis sur cinq niveaux permettant de disposer deux cages par niveau. Le fond de l'armoire est équipé de barrettes de LED (Diode Electroluminescente) qui diffusent une lumière, blanche, homogène sans émission de chaleur, dont le cône d'éclairage orienté vers les cages en plexiglas est ouvert d'arrière en avant. Le fond comporte également un néon rouge amovible que nous retirons pour obtenir une période d'obscurité totale et pour éviter une intensité de lumière résiduelle délivrée par ce néon, même si chez la souris, la vision est bichromatique (la couleur rouge n'est pas perçue), le flux photonique persiste.



Grâce à la mise en place d'un variateur de lumière, l'intensité lumineuse délivrée dans chaque compartiment est programmable de manière indépendante, selon la gamme suivante :

Durée de l'impulsion (secondes)	Intensités mesurées dans la cage (lux)
1	600
2	50
3	150
4	300
5	450
6	600

La plus basse intensité obtenue dans l'armoire était de 50 lux, ainsi pour obtenir une condition dim light, nous avons disposé des films en plastic noir au fond de l'armoire laissant filtrer moins de 5 lux, l'homogénéité et l'intensité de l'éclairage étant contrôlées par des mesures itératives préalables à l'aide d'un luxmètre situé au milieu d'une cage vide, recouverte de sa grille chargée de nourriture et d'un biberon d'eau et posée à chaque emplacement potentiel dans le compartiment.

Les animaux nés, hébergés en zone transgénique et non susceptibles d'être utilisés dans le cadre de nos projets ou à des fins de reproduction et d'entretien de la lignée sont euthanasiées avant la fin du sevrage. Les animaux correspondant à nos critères sont transférés en zone expérimentale dès leur sevrage.

## **Le génotypage**

Cette étape a pour but de sélectionner les souris au sein d'une même portée, à savoir les souris sauvages (*Opn4+/+*), les souris mutantes hétérozygotes (*Opn4+/-*) et homozygotes (*Opn4-/-*) pour le gène de la mélanospine. Le protocole détaillé est en annexe 1. Brièvement, l'ADN génomique est extrait d'un morceau de queue de souris, purifié puis le locus du gène *Opn4* est amplifié par réaction d'amplification en chaîne (ou polymerase chain reaction – PCR). Les fragments d'ADN obtenus sont séparés lors de la migration sur un gel d'agarose puis visualisés lors de l'opération de révélation. Le fragment correspondant à l'allèle *Opn4* sauvage (wild-type - *OPN4+/+*) présente une taille de 289 paires de bases (bp), l'allèle muté une taille de 919 bp (figure 28).

L'allèle sauvage est analysé par les amorces suivantes :

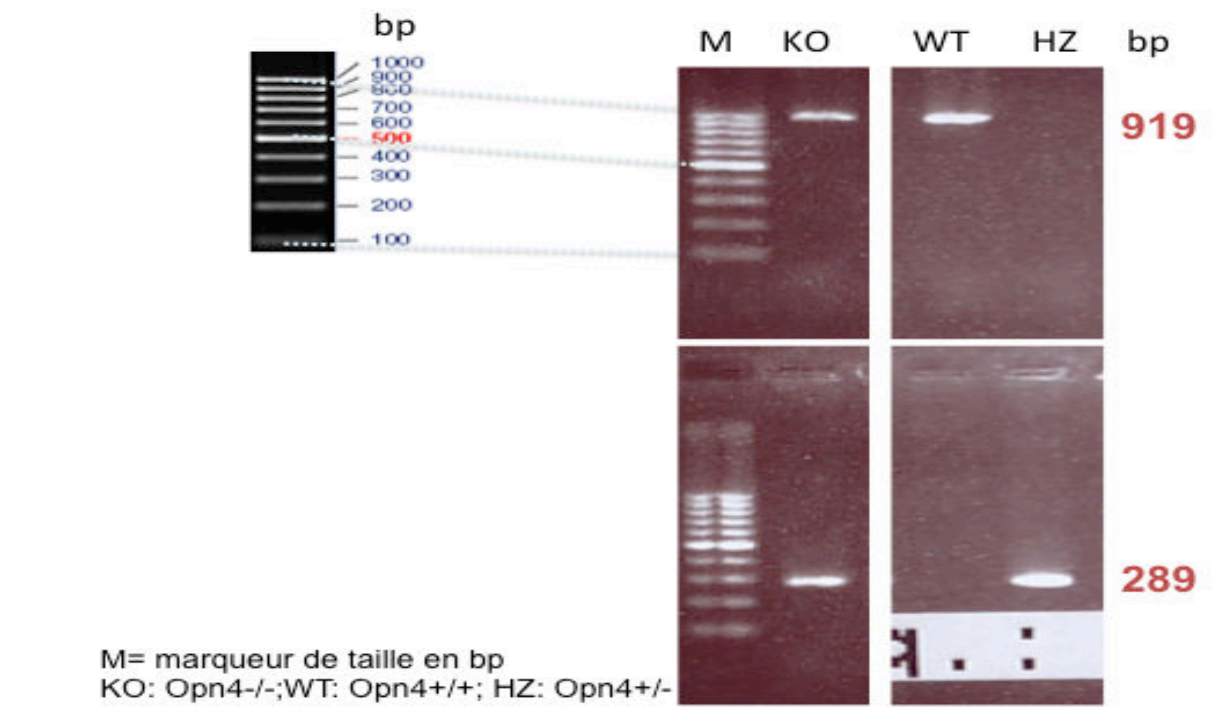
Sens (Mel4E3)                      TCA-TCA-ACC-TCG-CAG-TCA-GC

Anti sens (Mel2E4)                CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG

L'allèle muté est analysé par les amorces suivantes

Sens (Todo Neo)                    CCG-CTT-TTC-TGG-ATT-CAT-CGA-C

Anti sens (Mel2E4)                CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG



*Figure 28. Exmple de bandes d'intérêts après révélation lors du génotypage. M est une DNA Ladder 100bp de Fermentas®:*

## Les tests comportementaux

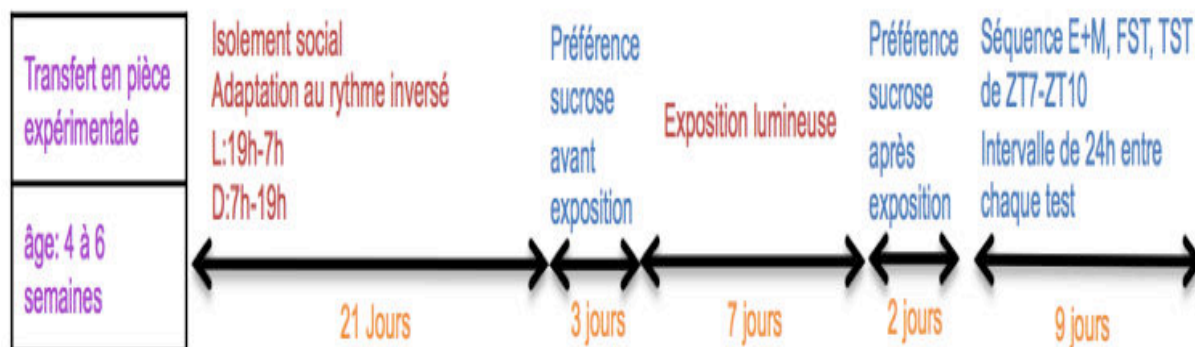


Figure 29. Le déroulement des expériences comportementales

### La préférence sucrose

Lorsque le test s'applique pour la première fois à un animal avant l'exposition lumineuse, il s'étend sur 4 jours et sert de référence initiale :

Le premier jour, un biberon d'eau sucrée (1% de sucrose par volume soit pour un volume moyen de 250ml d'eau par biberon, une dose de 2,5 g de sucrose) est proposé pendant 12h à la place du biberon d'eau pour l'habituation au goût sucré.

Le deuxième jour, le choix est donné à l'animal entre deux bouteilles préalablement pesées, une remplie avec de l'eau et l'autre contenant de l'eau sucrée à 1%.

Au bout de 24h (3<sup>ème</sup> jour) les positions des bouteilles sur la grille au dessus de la cage sont inversées pour neutraliser la préférence de place.

La préférence sucrose de base avant l'exposition lumineuse est calculée au 4<sup>ème</sup> jour en rapportant la quantité en millilitres d'eau sucrée consommée sur la quantité totale de boisson consommée (eau + eau sucrée) moyennée sur 24h et exprimée en %. Un seuil de plus de 65% de préférence sucrose est choisi pour inclure l'animal dans le groupe « testé ». Le but est de discriminer l'installation d'un phénotype provoqué par le stimulus lumineux appliqué pendant 7 jours sans risquer de le confondre avec une indécision voire une aversion pour le sucrose. Un pourcentage proche ou inférieur à 50% en situation basale rendrait le test ininterprétable a posteriori au regard du critère attendu : la mise en évidence au décours d'un stimulus potentiellement dépressiogène d'une diminution de la préférence pour l'eau sucrée reflétant l'installation d'une « anhédonie ».

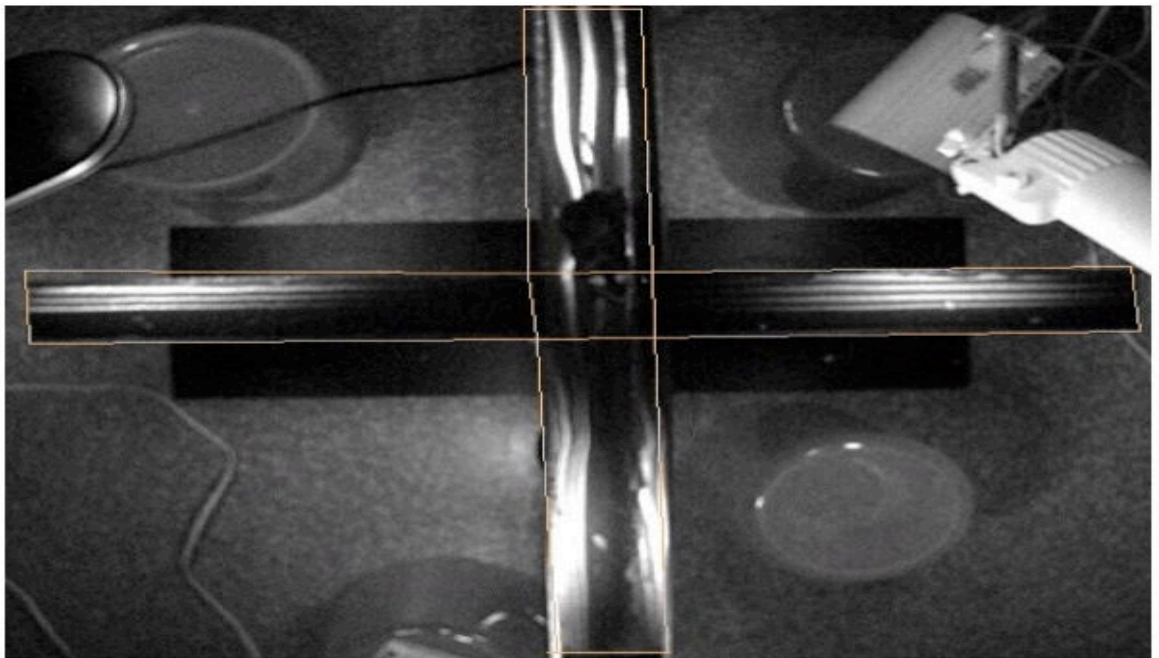
Le test débute 24h après les sept jours d'exposition lumineuse et se déroule de la façon suivant :

Le choix est à nouveau donné à l'animal entre les deux bouteilles préalablement pesées (eau et eau sucrée (1%)). Le 2<sup>ème</sup> jour, les places des bouteilles sont inversées et la préférence sucrose en % est calculée au 3<sup>ème</sup> jour. La diminution du pourcentage par rapport aux données avant exposition est le reflet d'une anhédonie.

Un paramètre complémentaire de la préférence sucrose est recueilli. Il s'agit de la consommation de sucrose par jour qui est définie par le nombre de milligramme de sucrose consommé par jour et par gramme de masse corporelle.

## ***Le labyrinthe en croix suspendu***

*Figure 30. Un schéma de l'E+M d'après Cryan et Holmes 2005.*



*Figure 31. Une photographie d'une souris Opn4 en train d'effectuer le test de l'E+M, d'après nos enregistrements en 2012.*

Il s'agit d'un test qui explore l'anxiété de l'animal. Il est effectué 24 heures après la fin de la préférence sucrose.

Le labyrinthe comprend deux bras ouverts (30x5cm) et deux bras fermés (30x5cm) qui sont unis par une plateforme centrale de 5x5cm. Un petit rebord de 0,5 cm autour du bras ouvert évite à la souris de tomber et les parois des bras fermés ont une hauteur de 15 cm. L'appareil est construit avec du polypropylène (sol noir et mur noir) et se situe à 40 cm au-dessus du sol.

Les souris sont placées en début de test au centre de la croix en face d'un bras ouvert ce qui leur permet d'explorer l'ensemble du dispositif librement pendant les 5 minutes (300 secondes) que dure le test.

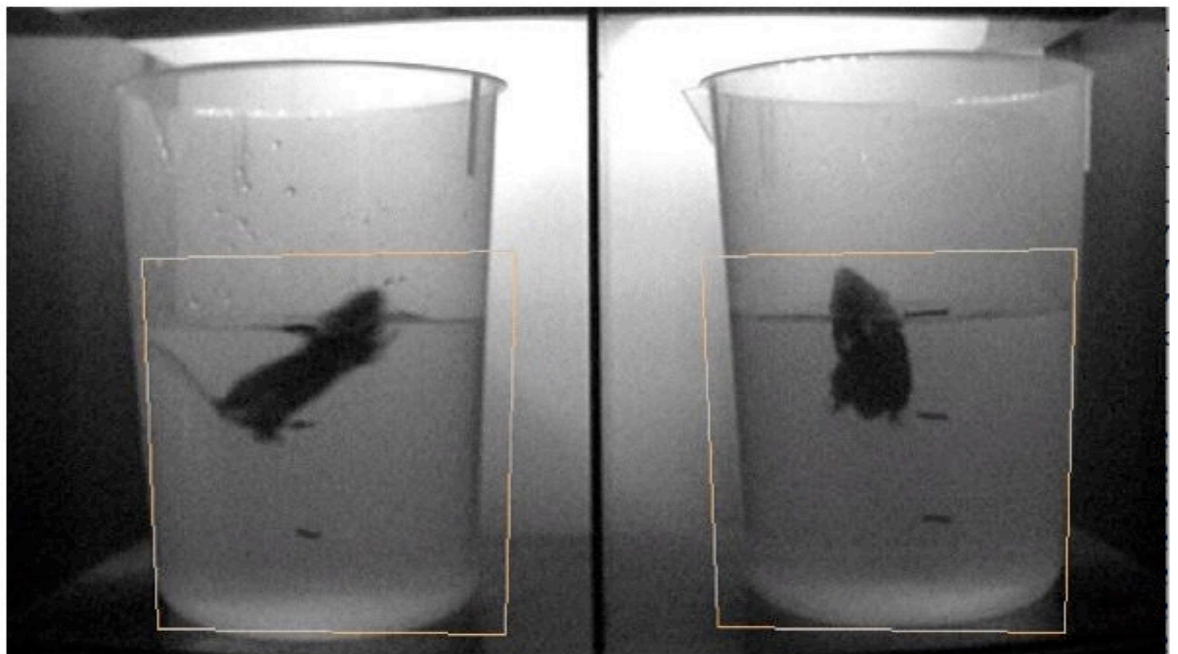
Les comportements standard mesurés sont les suivants:

- Le nombre d'entrées dans les bras ouverts et fermés (entrée = la tête et les 4 pattes dans un bras) et le temps passé dans les bras ouverts et fermés
- Les comportements éthologiques : arrière train dans le bras fermé, tête penchée au bord du bras ouvert, posture d'attente en étirement au centre des bras ou dans les bras fermés (étirement ou rétraction du corps sans avancer), décompte du nombre de matières fécales émises.

Le reflet de l'anxiété est le temps en secondes, passé dans les bras fermés, a contrario un comportement non aversif ou non anxieux de la souris sera révélé par un temps exploratoire des bras ouverts supérieur au temps passé dans les bras fermés.

## ***La nage forcée***

*Figure 32. Un schéma de la FST d'après Cryan et Holmes 2005.*



*Figure 33. Une photographie d'une paire de souris Opn4 en train d'effectuer le test de la nage forcée, d'après nos enregistrements en 2012.*



Il s'agit d'un test qui évalue l'installation d'une dépression.

La souris est introduite dans un Becher (30x20cm) rempli jusqu'à une hauteur de 16 cm avec de l'eau à 30°C. Le test dure 6 minutes (360 secondes), il existe un risque d'épuisement et d'hypothermie (mesure systématique de la température de l'eau du Becher avant et après le test, avec une perte tolérée de moins de 3°C). Néanmoins, nous n'avons pas mesuré la température centrale des animaux avant et après le test, seul reflet d'une hypothermie installée.

La variable à prendre en compte est le temps d'immobilité en secondes, reflet de la résignation. Seule la durée d'immobilité pendant les 4 dernières minutes du test est retenue au terme de l'analyse. L'utilisation d'une caméra infra rouge reliée à un logiciel de vidéo tracking (Anymaze® de Ugo Basile SA) permet l'enregistrement et l'analyse du test.

Une souris normale non dépressive nagera plus de la moitié du temps que dure le test.

Le temps total de flottaison est mesuré pendant les 2 premières minutes, avec la détermination d'un seuil et d'une latence de flottaison à distinguer de l'immobilité.

### ***La queue suspendue***

*Figure 34. Un schéma du TST d'après Cryan et Holmes 2005 :*



Figure 35. Une photographie d'une paire de souris Opn4 en train d'effectuer le test de la queue suspendue, d'après nos enregistrements en 2012 :

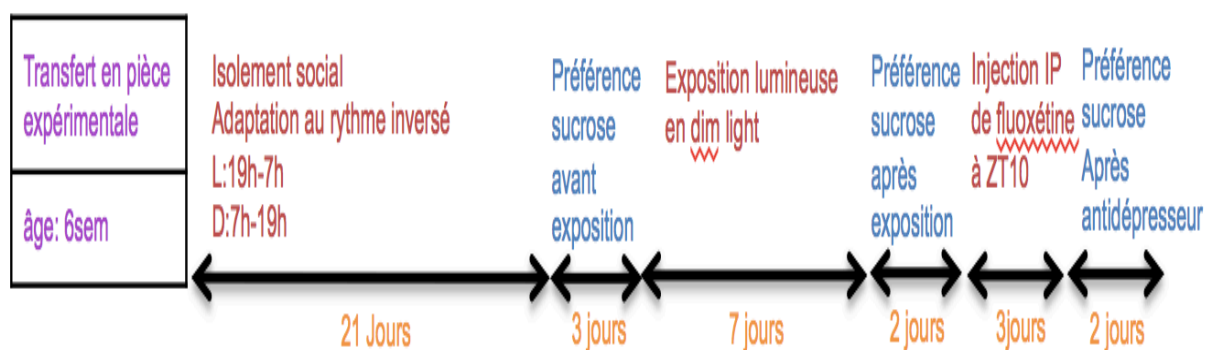
Il s'agit également d'un test qui évalue l'installation d'une dépression, mais qui est pourvoyeur d'un plus grand niveau de stress que la nage forcée et qui a été maintenu dans notre gamme de tests pour vérifier la concordance des données entre ces deux explorations phénotypiques proche en terme de variable mesurée.

Les souris sont suspendues par la base de la queue grâce à de l'adhésif pharmaceutique lui-même enroulé autour d'un crochet vissé à la paroi horizontale et supérieure située à 30 cm du sol. La queue passe au travers d'un trou situé au centre d'une paroi intermédiaire transparente à 20 cm du sol pour éviter l'agrippement et la verticalisation de la souris pendant le test.

L'activité est enregistrée automatiquement pendant 6 minutes par période individualisée de 2 minutes. Des seuils haut et bas de persévérance (active) et d'immobilité (passive) sont respectivement déterminés. Le test dure 6 minutes (360 secondes) et la variable à prendre en compte est le temps d'immobilité en secondes, reflet de la résignation.

Seule la durée d'immobilité pendant les 4 dernières minutes du test est retenue au terme de l'analyse. L'utilisation d'une caméra infra rouge reliée à un logiciel de vidéotracking (Anymaze® de Ugo Basile SA) permet l'enregistrement et l'analyse du test.

### ***L'administration d'un antidépresseur***



*Figure 36. Le déroulement temporel du test pharmacologique à la fluoxétine*

Nous vérifions la réversibilité pharmacologique d'un phénotype dépressif par l'administration subchronique d'un antidépresseur type inhibiteur de la recapture en sérotonine : la fluoxétine (Dulawa 2004, Holmes 2008, Inhe et al., 2012, Cunha et al., 2013).

L'administration de l'antidépresseur s'effectue par voie intra péritonéale à l'aide d'une aiguille de 26 Gauge et a lieu en période d'activité de l'animal (ZT 7-10), pendant 3 jours consécutifs en alternant les sites d'injection chaque jour et en prenant la précaution d'injecter un volume maximal compris entre 100 à 200 µl selon la masse pondérale de l'animal.

La détermination de la dose minimale efficace est déterminée au préalable sur un lot restreint de souris (5 animaux par niveau de dose) en administrant une dose test de 5, 10, 15 ou 20 mg/kg/j et en déterminant la dose minimale efficace qui permet une régression des traits anhédoniques vérifiés par un test de préférence sucrose réalisé avant, après l'exposition lumineuse et enfin après l'administration de l'antidépresseur.

## L'analyse de l'activité de l'axe corticotrope



*Figure 37. Le déroulement temporel des prélèvements de sang pour la mesure des taux de corticostérone circulante :*

La caractérisation des modulations du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) consécutif au paradigme lumineux appliqué est évaluée par le dosage de la corticostérone au nadir (ZT (« zeitgeber ») 2, qui correspond à 2h après le début de la phase lumineuse) et au pic (ZT10 qui correspond à 2h avant le début de la phase d'obscurité) du cycle nyctéméral chez la souris (Dalm *et al.*, 2005, Kalsbeek *et al.*, 2012, Otsuka *et al.*, 2012). Cette procédure est décrite dans la littérature comme provoquant des douleurs modérées qui sont minimisées et contrôlées si elle est réalisée par un expérimentateur confirmé et parfaitement entraîné. Durant la procédure, nous sommes vigilants pour ne pas atteindre des points critiques en écourtant au maximum le temps de contrainte et en réalisant le prélèvement en moins de 30 secondes quitte à renoncer à la procédure en cas de douleurs constatées.

Le prélèvement sanguin est effectué au niveau des veines latérales de la queue selon la procédure consacrée par deux expérimentateurs sur un animal vigile. La souris est maintenue par un expérimentateur moins de trente secondes en conditions restreintes pendant que l'autre opérateur procède à une incision superficielle de la peau et de la paroi de la veine latérale de la queue permettant au sang veineux d'être recueilli dans un capillaire hépariné puis d'être transféré dans un tube Eppendorf de 200 $\mu$ l. En fin de prélèvement, une brève hémostase mécanique par compression est réalisée avant de replacer la souris dans sa cage. Pour chaque point horaire défini, nous préleverons 50  $\mu$ l de sang, à ZT 10 (période d'obscurité et d'activité, pic de corticostérone basal) et à ZT 2 (période de lumière et de repos, nadir de la corticostérone basal) et ce à 2 périodes de l'étude :

- 24h avant la mise en condition lumineuse.
- 24h après l'exposition lumineuse de 7 jours.

Afin de diminuer le stress au moment du prélèvement les animaux sont, au préalable, habitués quotidiennement en période d'obscurité à la manipulation par l'expérimentateur entraîné réalisant le prélèvement.

Les tubes subissent une centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 5000 tours/minute pour séparer le culot du plasma. Le plasma est recueilli, et conservé dans des Eppendorf maintenu à -20°C jusqu'au jour du dosage réalisé par une méthode radioimmunologique.

Les dosage de la corticostérone ont été réalisés en duplicata pour assurer une meilleure validité et un meilleur contrôle des dosages. Nous avons suivi la procédure décrite par MP biomedicals ® qui nous a fourni le KIT « Corticosterone 125I RIA kit » et la lecture de la radioactivité du culot a été faite par un Cobra <sup>TM</sup> Detector Gamma Counting System PAKARD ®

L'effectif nécessaire à cette caractérisation est de 5 souris de chaque génotype (*Opn4+/+*, *Opn4-/-*) dans chaque condition lumineuse (<10lux, 200lux, 600lux) (n=30). Ces souris n'auront subi aucun test comportemental au préalable. Certains aléas de l'armoire de grande capacité, nous ont obligés à décaler certaines expériences et donc à faire vieillir en stabulation les souris exposées en dim et en standard (9,2 mois d'âge moyen). Pour respecter l'enchaînement de l'expérience et pour éviter de différer, le troisième groupe exposé à 600 lux a été constitué de souris plus jeunes (2,5 mois d'âge moyen) incluses au décours immédiat de leur sevrage, période à laquelle s'ajoute l'adaptation à l'isolement social qui dure trois semaines.

## L'enregistrement du sommeil et de l'activité locomotrice



*Figure 38. Le déroulement temporel de la partie « sommeil et actimétrie » en fonction du paradigme lumineux appliqué)*

### L'ECoG (électrocorticogramme)

L'enregistrement continu des états de vigilance et du cycle veille/sommeil chez l'animal est plus invasif et nécessite l'implantation chirurgicale d'électrodes

d'enregistrement à la différence de l'homme chez lequel on recueille une activité thalamocorticale à partir d'électrodes de surface collées sur le scalp.

### ***La mise en place***

Sous anesthésie générale et grâce à un cadre stéréotaxique fournissant précisément, les coordonnées de position des électrodes, le scalp est incisé puis un perçage de 3 points avec une fraise de 1 mm de diamètre est réalisé pour la mise en place des électrodes d'enregistrement et de l'électrode de référence. Les électrodes pour l'électromyogramme (EMG) sont glissées sous le plan sous cutané cervical postérieur :

- 3 électrodes (une en position frontale, une pariétale et une référence) sur la dure-mère
- 2 électrodes d'EMG insérées dans la musculature cervicale

Par la suite, les électrodes sont reliées à un connecteur ou « chip » fixé sur la boîte crânienne grâce à du ciment dentaire. Enfin, la peau est suturée autour du « chip ». La plaie est aspergée d'antiseptique (biseptine spray ®, Bayer) pour une bonne cicatrisation (Franken et al 1998).

L'anesthésie générale est obtenue par injection intra-péritonéale d'un mélange kétamine (80g/kg)/ xylazine (7g/kg) en cas de procédure chirurgicale <90min correspondant au temps nécessaire pour la pose de la chip et des capteurs de température sans effectuer de lésion cérébrale expérimentale. L'incision du scalp est faite après injection sous-cutanée de xylocaïne (100 ul, maximum 2 fois = Lidocaine : 21,33mg ; Parahydroxybenzoate de méthyle sodique (E219) 1,00 mg)



## ***Les précautions et les contrôles***

Pendant toute la durée de la chirurgie, la température corporelle de l'animal est maintenue grâce à une couverture chauffante (heatpad®).

L'analgésie pré et péri-opératoire est réalisée par une injection d'un anti-inflammatoire non stéroïdien le métoxicam (Metacam®) à 1 mg/kg en sous-cutanée au niveau du cou en début de chirurgie. L'analgésie post-opératoire consiste en un traitement au Metacam® (1mg/kg) dans l'eau de boisson pendant 72h post-opératoire. Nous prévoyons l'administration de Metacam® en sous-cutanée en post-opératoire si les souris boivent difficilement.

Les animaux sont finalement remis en cage individuelle, sous lampe infra-rouge chauffante afin d'éviter l'hypothermie post-opératoire de l'animal jusqu'au réveil.

La température corporelle a une variation circadienne, dont le nadir se situe à la fin de la période de sommeil. C'est un indicateur simple des sorties de l'horloge interne qui permet d'observer l'effet des différentes conditions expérimentales sur le rythme circadien. Une laparotomie est réalisée par incision médiane du plan cutané et musculaire (hauteur 1.5cm). Le capteur de température (transpondeur) préalablement stérilisé est ensuite implanté dans la cavité péritonéale à l'aide d'une pince. Le plan musculaire est suturé (fil à peau 4.0) et le plan cutané agrafé (agrafes bruneau® 7.5mm).

Une observation visuelle quotidienne des animaux est renforcée après la chirurgie pendant 7 à 10 jours. Une vérification des paramètres physiologiques et comportementaux est effectuée concernant les prises alimentaires et hydriques, l'état du pelage, le déroulement de cicatrisation (inflammation, abcès) du site opératoire, le

comportement dans la cage, notamment, la détection de prostration ou de mutilations indiquant un mal être, l'aspect et la quantité des fèces pouvant indiquer également un trouble de l'état sanitaire.

### ***L'habitation :***

Quarante huit heures après la chirurgie, les « chips » des animaux sont branchés au système d'acquisition de données. Une période d'habitation aux conditions d'enregistrement (avec câble) débute et dure une semaine au minimum en condition lumineuse normale (en mode inversé, la lumière pendant 12 h à 150 lux de ZT12 à ZT0 versus l'obscurité totale sans néon rouge pendant 12 h de ZT0 à ZT12). Ces sept jours sont nécessaires à une récupération complète post-chirurgicale et à une totale habitation au dispositif d'enregistrement.

Le dispositif d'enregistrement se compose d'un câble électrique, raccordé à la « chip » d'un côté et à une poulie en forme de disque fixé à un support fixe au dessus de la cage permettant à l'animal de rester libre dans ses mouvements tout au long de la période d'enregistrement.

### ***La privation de sommeil***

Pour les privations de sommeil, la méthode utilisée est celle du « gentle handling » c'est-à-dire la moins stressante pour l'animal. La privation de sommeil est réalisée par un expérimentateur qui stimule la souris en lui présentant un objet dans la cage et en l'agitant (enrichissement).

Afin d'analyser l'impact de la modulation de l'homéostat du sommeil en fonction des conditions d'expositions et de la phototransduction mélanopsinergique, nous poursuivrons les enregistrements du sommeil et de l'activité locomotrice pendant et après la privation de sommeil qui se déroule pendant 6 h au décours de la période d'obscurité

Il est nécessaire de vérifier la réversion éventuelle du phénotype dépressif suite à une action sur l'homéostat de sommeil, étant donné que la privation de sommeil est connue pour avoir une action antidépressive lorsqu'un phénotype dépressif est constaté (Lopez-Rodriguez et al., 2004, Boivin 2000). Ainsi la privation de sommeil dans un échantillon de souris *Opn4+/+* et *Opn4-/-* exposées pendant sept jours à la condition lumineuse ayant conduit à un phénotype dépressif sera complétée par le test de préférence au sucrose. C'est le seul test pouvant être reproduit ou mis en œuvre sans attendre la récupération de l'animal après un FST et surtout un TST nécessitant plusieurs semaines.

### ***L'enregistrement de l'activité locomotrice***

L'activité motrice circadienne est mesurée à l'aide d'un dispositif de capteurs infrarouges disposés autour de la cage et permettant de ne pas interférer avec le dispositif et les câbles des enregistrements d'électrocorticogramme. L'acquisition des données s'effectue toutes les cinq minutes grâce à un système interfacé et informatisé (CAMS, Circadian Activity Monitoring System, INSERM, France). L'avantage de ce système réside dans le recueil des mouvements continus et spontanés et n'induit pas un conditionnement comportemental considéré comme un biais lorsque l'activité locomotrice est mesurée par l'intermédiaire de la roue.

L'interface informatique permet le recueil des données puis leurs analyses en fonction de l'heure de la journée et de l'alternance lumière-obscurité grâce à l'ensemble de logiciels Clocklab (Actimetrics, Evanston, IL) et de la lier aux enregistrements du sommeil ou à l'environnement lumineux. Les débuts d'activité locomotrice étaient déterminés en utilisant l'algorithme de correspondance Clocklab. Les animaux sont considérés comme entraînés lorsque la correspondance de la régression des moindres carrés des débuts des activités est stable et alignée sur l'heure d'extinction de la lumière pendant 7 jours. L'angle de phase défini comme la différence de temps entre l'heure de début d'activité et l'extinction de la lumière est calculé pour chaque animal (Drouyer et al., 2008).

### ***Contrôle des biais potentiels***

Les facteurs susceptibles d'influencer le comportement des animaux, c'est à dire le genre, l'âge, les conditions d'hébergement, les manipulations des expérimentateurs ont été étroitement contrôlées et les aléas expérimentaux limités. Le nombre de souris incluses dans chaque groupe et la reproductibilité des variables indépendantes représentées par la condition de lumière et par le génotype ont garanti la fiabilité de la significativité statistique des différences entre les groupes pour les variables dépendantes considérées.

Compte tenu du critère essentiel constitué par l'intensité lumineuse délivrée dans notre expérience, nous avons vérifié la stabilité et la fiabilité de nos réglages, nous avons procédé au préalable à un étalonnage de la correspondance entre l'impulsion envoyée à l'horloge de l'enceinte et l'intensité lumineuse réelle, délivrée

au sein du compartiment. Ensuite à chaque modification de la programmation, nous avons contrôlé l'exactitude des heures d'allumage et d'extinction, leur qualité, leur fiabilité et leur intégralité notamment l'absence de barre de leds allumés en période d'obscurité, l'intensité lumineuse au sein des cages en adéquation avec nos réglages. Ceci nous a permis de repérer des dysfonctionnements inopinés risquant de fausser nos données comme des barres de leds avec un allumage résiduel ou une non extinction ou un non allumage du compartiment à l'heure voulue, Nous avons été contraints de renvoyer l'enceinte pour réparation et d'interrompre les expériences tant que le dysfonctionnement persistait. Nous avons installé des luxmètres au sein de l'armoire pour renforcer les contrôles et nous recommanderons lors d'une prochaine acquisition d'enceinte d'installer a priori un tel dispositif à demeure.

## **Analyse statistique**

Le recueil des données, les tableaux de synthèse et les graphiques ont été réalisés sur tableur Excel (pack office, Microsoft SA). Les tests post hoc selon la méthode de Tukey avec des comparaisons inter groupes et les ANOVAs multivariées en mesures répétées (modèle linéaire général à plusieurs facteurs) ont été effectués à partir du logiciel Statistica 10 (StatSoft, Maisons-Alfort, France). Pour tous les graphiques, les barres d'erreur indiquent l'erreur standard, une signification statistique notée « \* » ou « \*\* » ou « \*\*\* » correspondent respectivement à  $p < 0,05$  ou  $p < 0,01$  ou  $P < 0,001$  et une non significativité est notée « n.s. ».

# **PARTIE 1**

# L'INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LE COMPORTEMENT VIA LA PHOTOTRANSDUCTION MELANOPSINERGIQUE

Nous avons analysé les effets directs, non circadiens de la lumière sur l'humeur et la participation des cellules à mélanopsine de la rétine dans la genèse d'un phénotype dépressif à travers leur rôle phototransducteur (Laurent Calvel, Jeffrey Hubbard, Elisabeth Ruppert, Ludivine Choteau, Abdel-Moultalib Ouagazzal, Dominique Ciocca, Patrice Bourgin , en préparation pour *Biology Psychiatry* sans avoir mis au format de la revue, le texte ci dessous qui lui est destiné).

## Les conditions expérimentales

233 souris C57BL/6J, mâles, adultes, âgées de 4 à 5 mois, en moyenne, homozygotes *Opn4*<sup>+/+</sup> ou *Opn4*<sup>-/-</sup>, à la 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> générations du croisement en retour ont été nécessaires pour cette étude expérimentale.

Nous avons isolé socialement les souris dès leur transfert en zone expérimentale; nous avons intégré avant de choisir cette modalité que l'isolement social pouvait être une source de stress, car les rongeurs apprécient la stabulation collective (3 à 5 animaux par cage). Cependant l'observation antérieure de leurs comportements collectifs, nous avait fait remarqué que les mâles de cette lignée avaient des comportements hétéroagressifs tels que dans un groupe, seul le mâle dominant échappait aux blessures sévères voire à la mort causées par les autres mâles de la cage. Le compromis pour limiter cette incidence et pour maintenir une harmonie au cours des expériences était de les mettre en cage individuelle avec eau et nourriture ad libitum.

Nous avons procédé à une inversion des temps de lumière/obscurité par rapport au rythme habituel : lumière blanche de 19h à 7h et obscurité de 7h à 19h. Nous avons opté pour cette répartition de la lumière au cours du nycthémère, car nous souhaitons réaliser les tests comportementaux en phase d'obscurité qui est la phase d'activité d'une souris ce qui nous paraissait plus approprié, plus pertinent et surtout plus proche de la réalité vis à vis des signes cliniques de dépression mis en évidence chez l'humain qui s'observent et se manifestent plutôt pendant l'éveil que pendant le sommeil. Par ailleurs, les tests comportementaux s'effectuent la plupart du temps entre 9h et 17h, notre choix n'a pas été motivé par un changement de créneau horaire, mais par la modulation et la qualité de l'éclairage. Ainsi, les tests comportementaux ont été réalisés entre 13 et 17h, en lumière rouge non perçue d'un point de vue spectral par les souris. Nous avons respecté une période de vingt et un jours entre l'isolement social, l'inversion de l'éclairage et le début des explorations comportementales et nous avons vérifié que les souris ainsi hébergées étaient photoentraînées avec un rythme repos/activité en 12/12 stable et une période autour de 24h.

Pendant les phases expérimentales d'exposition lumineuse modulée en fonction du paradigme choisi, les souris ont été hébergées dans une armoire contrôlant l'humidité, la température et les modalités d'éclairage et comportant deux compartiments indépendants disposant de dix emplacements chacun répartis sur cinq niveaux pour disposer les cages . Le fond des armoires est équipé de barrettes de LED, dont la luminosité est variable et programmable, ces barrettes de LED permettent de diffuser une lumière blanche homogène grâce à un cône d'éclairage orienté vers les cages en plexiglas et ouvert d'arrière en avant.



Au décours d'une exposition de sept jours à des intensités lumineuses variables, soit moins de 10 Lux ou « dimlight », soit 150 Lux ou « standard », soit 600 Lux ou « highlight » durant la phase lumineuse, nous avons réalisé des tests comportementaux validés chez le rongeur pour l'exploration de la dépression et de l'anxiété. Ces tests ont été effectués selon une séquence du moins au plus anxiogène. Tout d'abord, la consommation/préférence de sucrose (modèle d'anhédonie) (Willner P 1997, Strekalova et Steinbusch 2010, Malatynska E et al., 2012), puis le labyrinthe en croix surélevé (modèle d'anxiété) (Lister 1987, Holmes 2003, Cryan et Slattery 2007, Sidor *et al.*, 2010), et enfin le test de la nage forcée (Porsolt 1998, Lucki *et al.*, 2001, Holmes *et al.*, 2002, Strekalova et Steinbusch 2010.) et le test de la suspension caudale (modèles de dépression) (Cryan *et al.*, 2005, Goeldner C *et al.*, 2011). Ils ont débuté 24h après la fin de la semaine d'exposition lumineuse et 24h ont séparé deux tests successifs.

## Résultats

### L'activité locomotrice en fonction du paradigme lumineux

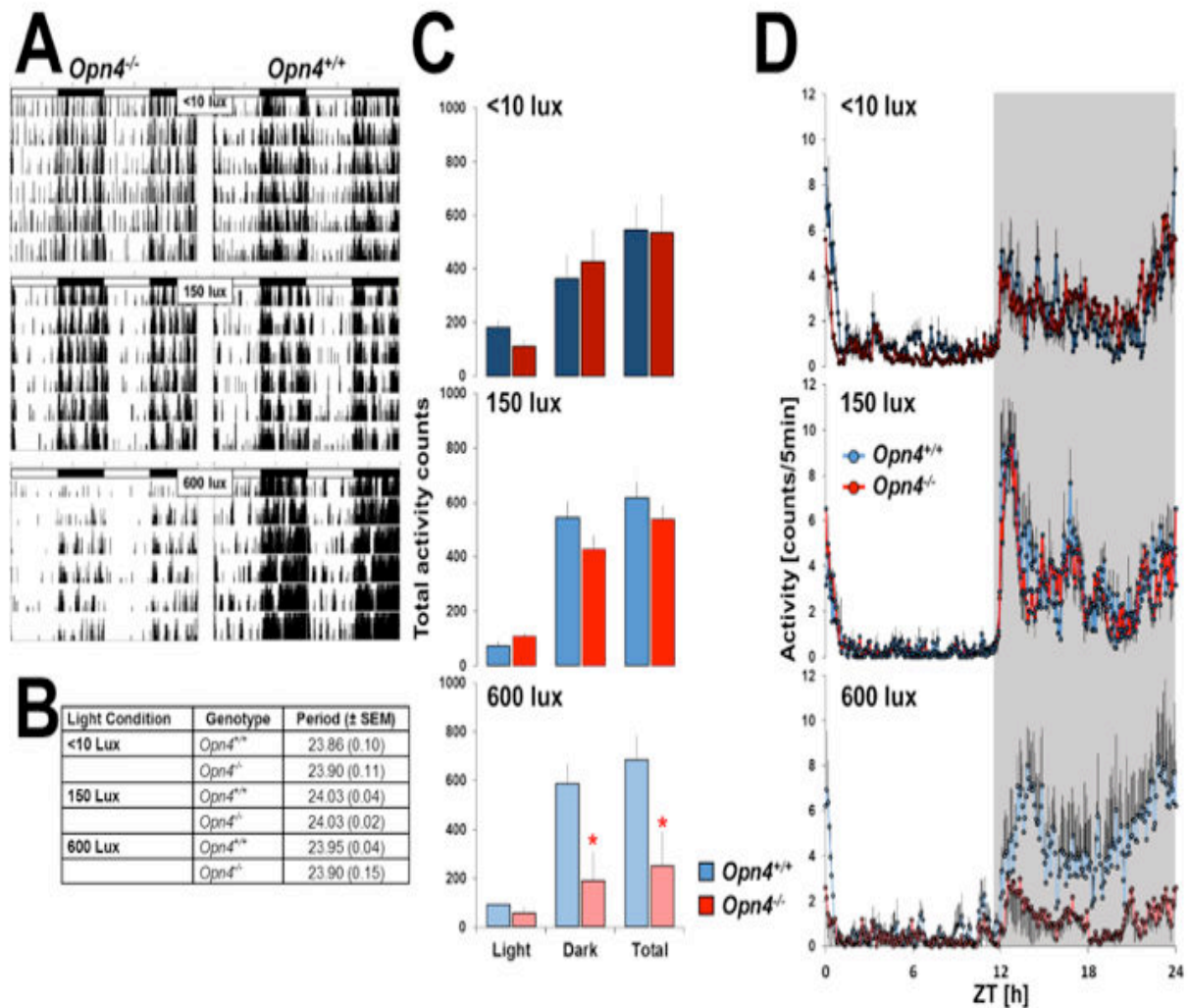


Figure 39. Les résultats d'actimétrie: A) Exemples d'actogrammes B) Tableau des périodes des animaux dans chaque groupe C) Histogrammes des amplitudes et des répartitions de l'activité locomotrice D) Déroulement temporel de l'activité locomotrice globale

Quelle que soit l'intensité lumineuse appliquée pendant la période éclairée, les souris restent photoentraînées et conservent un rythme repos/activité oscillant selon

l'alternance lumière/obscurité avec des périodes comprises entre 23,86 et 24,03 heures, sans différence significative entre les groupes (Figure 30A et tableau 30B)

Les résultats des activités locomotrices poolées montrent (Figure 30C):

Dans la condition d'exposition à <10 lux, les souris *Opn4+/+* (n=5) et les souris *Opn4-/-* (n=5) ont une activité locomotrice pendant la nuit statistiquement supérieure à celle enregistrée pendant le jour avec respectivement des différences significatives à  $p < 0,05$  et à  $p < 0,001$ . L'analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs (génotype, période d'éclairage (lumière, light : L ou obscurité, dark : D ou total sur 24h)) est statistiquement significative pour la période d'éclairage à  $p < 0,001$ . Aucune différence significative n'est notée entre les génotypes pour la période du nyctémère. La répartition de l'activité entre les périodes (L, D, totale) est statistiquement différente chez les souris *Opn4+/+*, notamment l'activité pendant la nuit est inférieure à celle pendant la totalité du nyctémère ( $p < 0,05$ ).

Dans la condition d'exposition à 150 lux, les souris *Opn4+/+* (n=4) et les souris *Opn4-/-* (n=5) ont une activité locomotrice pendant la nuit supérieure à celle pendant le jour avec des différences significatives à  $p < 0,001$ . L'ANOVA à deux facteurs (génotype, période de l'ambiance lumineuse (L, D, 24h)) est statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) pour la période lumineuse. Aucune différence significative entre les génotypes quelle que soit la période du nyctémère n'est mise en évidence. L'activité locomotrice pendant la période d'obscurité est de celle pendant la totalité du nyctémère, car l'activité en période de lumière est faible.

Dans la condition d'exposition à 600 lux, seules les souris *Opn4+/+* (n=4) ont une activité locomotrice pendant la nuit, supérieure à celle pendant le jour avec une différence significative à  $p < 0,001$ . Les activités motrices des souris *Opn4+/+* pendant la nuit et pendant la totalité du nyctémère sont supérieures à celles des souris

*Opn4*<sup>-/-</sup> (n=4) pendant les mêmes périodes ( $p < 0,05$ ). L'activité locomotrice pendant la période d'obscurité ne diffère pas de celle pendant la totalité du nycthémère, compte tenu d'une activité très faible en période de lumière. L'ANOVA à deux facteurs (génotype, période d'éclairage considérée (L, D ou 24h)) est statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) pour la période d'éclairage.

Les résultats de l'activité locomotrice détaillée par intervalle de temps de recueil et par animal montrent (Figure 30D) :

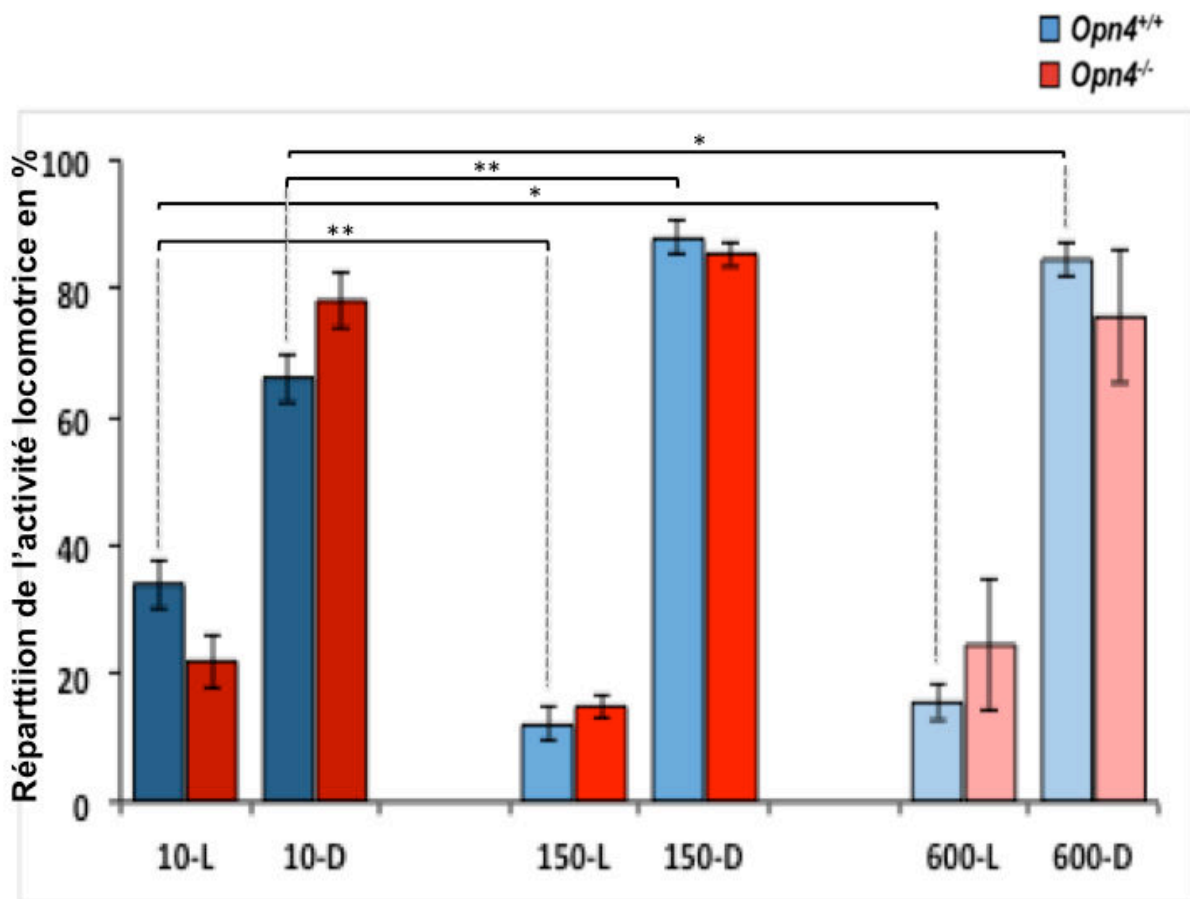
Dans la condition d'exposition faible, l'ANOVA en mesures répétées à trois facteurs (génotype, période d'éclairage (L ou D), le déroulement du temps pendant le nycthémère) met en évidence une significativité statistique pour la période d'éclairage ( $p < 0,01$ ), pour le déroulement du temps ( $p < 0,0001$ ), pour (e déroulement du temps x génotype) ( $p < 0,0001$ ), pour le déroulement du (temps x période d'éclairage) ( $p < 0,0001$ ) et pour le déroulement du (temps x période d'éclairage x génotype) ( $p = 0,02$ ). Le post hoc (génotype x période d'éclairage) met en évidence, chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>, une activité motrice supérieure pendant la nuit à celle pendant le jour ( $p = 0,02$ ), alors qu'il n'y a une tendance chez les *Opn4*<sup>+/+</sup> ( $p = 0,07$ ).

Aucune différence significative entre les génotypes n'est mise en évidence quand on compare les activités locomotrices pendant chaque période d'éclairage (L ou D).

Dans la condition d'exposition à 150 lux, l'ANOVA en mesures répétées à trois facteurs (génotype, période d'éclairage (L ou D), le déroulement du temps ) met en évidence une significativité statistique pour la période d'éclairage ( $p < 0,0001$ ), pour le déroulement du temps ( $p < 0,0001$ ), pour le déroulement du temps x période d'éclairage ( $p < 0,0001$ ). Le post hoc (génotype x période d'éclairage) met en évidence chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> et *Opn4*<sup>-/-</sup>, une activité locomotrice supérieure,

pendant la nuit ,à celle pendant le jour ( $p < 0,0001$ ). Aucune différence significative entre les génotypes n'est mise en évidence quand on compare les activités locomotrices au sein de chaque période d'éclairage (L ou D).

Dans la condition d'exposition à 600 lux, l'ANOVA en mesures répétées à trois facteurs (génotype, période d'éclairage ( L ou D), le déroulement au cours temps ) met en évidence une significativité statistique pour la période d'éclairage ( $p = 0,006$ ), pour le déroulement du temps ( $p < 0,0001$ ), pour le déroulement au cours du temps x génotype ( $p = 0,003$ ), pour le déroulement au cours du temps x période d'éclairage ( $p < 0,0001$ ), pour le déroulement au cours du temps x période d'éclairage x génotype ( $p = 0,002$ ), Le post hoc (génotype x période d'éclairage) met en évidence chez les *Opn4*<sup>+/+</sup> une activité supérieure pendant la nuit à celle pendant le jour ( $p = 0,02$ ), aucune différence significative chez les *Opn4*<sup>-/-</sup> n'est mise en évidence quand on compare les périodes L et D. Pendant la nuit, l'activité locomotrice chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> est significativement supérieure à celle des *Opn4*<sup>-/-</sup>, aucune différence génotypique pendant le jour n'a été mise en évidence.



*Figure 40. La répartition de l'activité locomotrice entre le jour et la nuit en fonction du génotype, de la période d'éclairage et de l'intensité lumineuse d'exposition en phase éclairée.*

Les répartitions jour vs nuit de l'activité locomotrice globale (Figure 40) selon les conditions lumineuses d'exposition sont les suivantes :

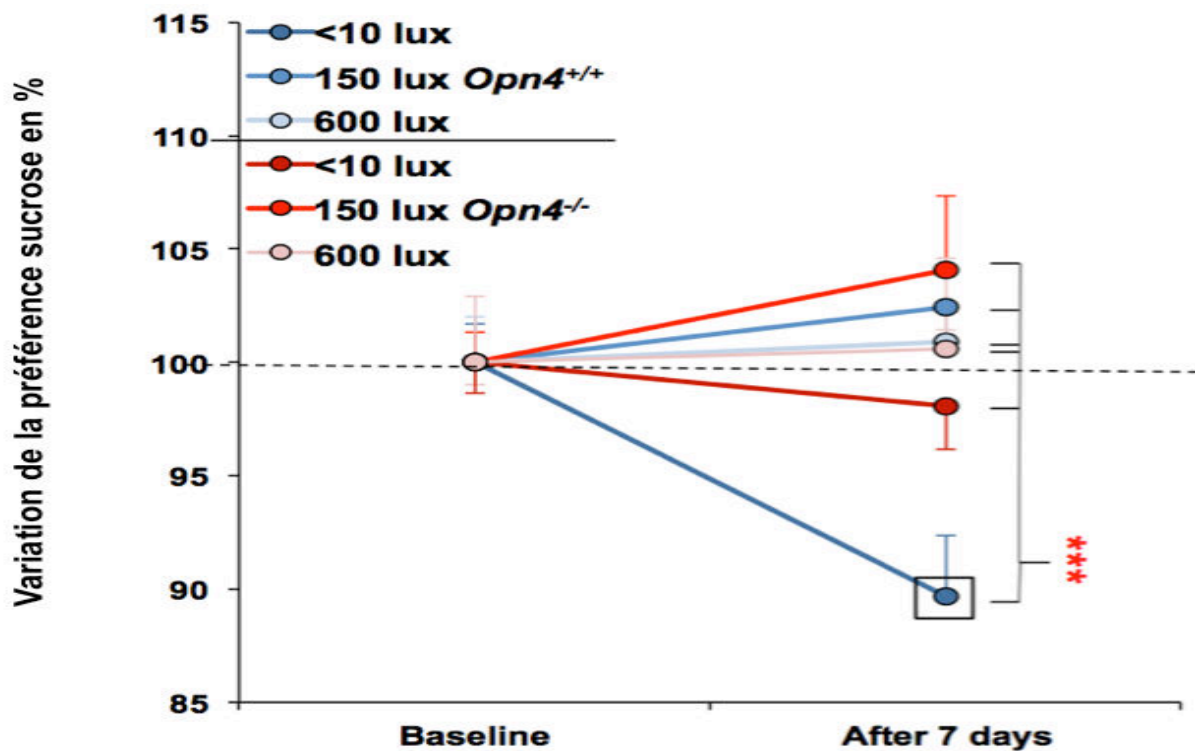
Chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> 34% vs 66% à « <10lux », 12% vs 88% à « 150 lux », 15% vs 85% à « 600lux » et chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> 22% vs 78% à « <10lux », 15% vs 85% à « 150lux » et 24% vs 76% à « 600lux ».

Les résultats (Figure actimétrie2) concernant les répartitions de l'activité locomotrice des souris dans chaque condition d'exposition comparées entre elles selon la période d'éclairage (L ou D) et le génotype montrent que :

Les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> soumises à une faible intensité d'exposition ont une activité locomotrice pendant le jour plus de deux fois supérieure à celle des *Opn4*<sup>+/+</sup> soumises à une intensité à 150 lux ( $p < 0,01$ ) et à une intensité à 600 lux ( $p < 0,05$ ). Le gain d'activité de ces souris se fait au détriment de l'activité locomotrice pendant la nuit puisque les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> soumises à une faible intensité d'exposition ont une activité locomotrice pendant la nuit inférieure à celle des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> soumises à une intensité standard ( $p < 0,01$ ) et à une forte intensité ( $p < 0,05$ ).

Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>, il n'y a pas de différence significative quand on compare les conditions d'exposition lumineuse selon les périodes d'éclairage.

#### ***L'évaluation du phénotype induit par les conditions de lumière***



*Figure 41. L'évolution de la préférence sucrose sur une base 100 entre l'état avant et après l'exposition lumineuse.*

**La préférence sucrose** (Figure 41) des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> (n=64) diminue significativement à la suite d'une exposition de 7 jours à basse intensité (<10lux, p<0,001) alors qu'elle reste stable à 150 lux et à 600 lux. Aucune différence significative ne se dégage entre les groupes exposés aux différentes conditions lumineuses au sein des souris *Opn4*<sup>-/-</sup> (n=49). Une analyse de la variance (modèle général linéaire à deux paramètres, intensité lumineuse et génotype) concernant l'évolution de la préférence sucrose avant et après l'exposition lumineuse (Figure PSa) est calculée et est statistiquement significative en fonction de l'intensité lumineuse (p<0,05) et du génotype x intensité lumineuse (p<0,05).

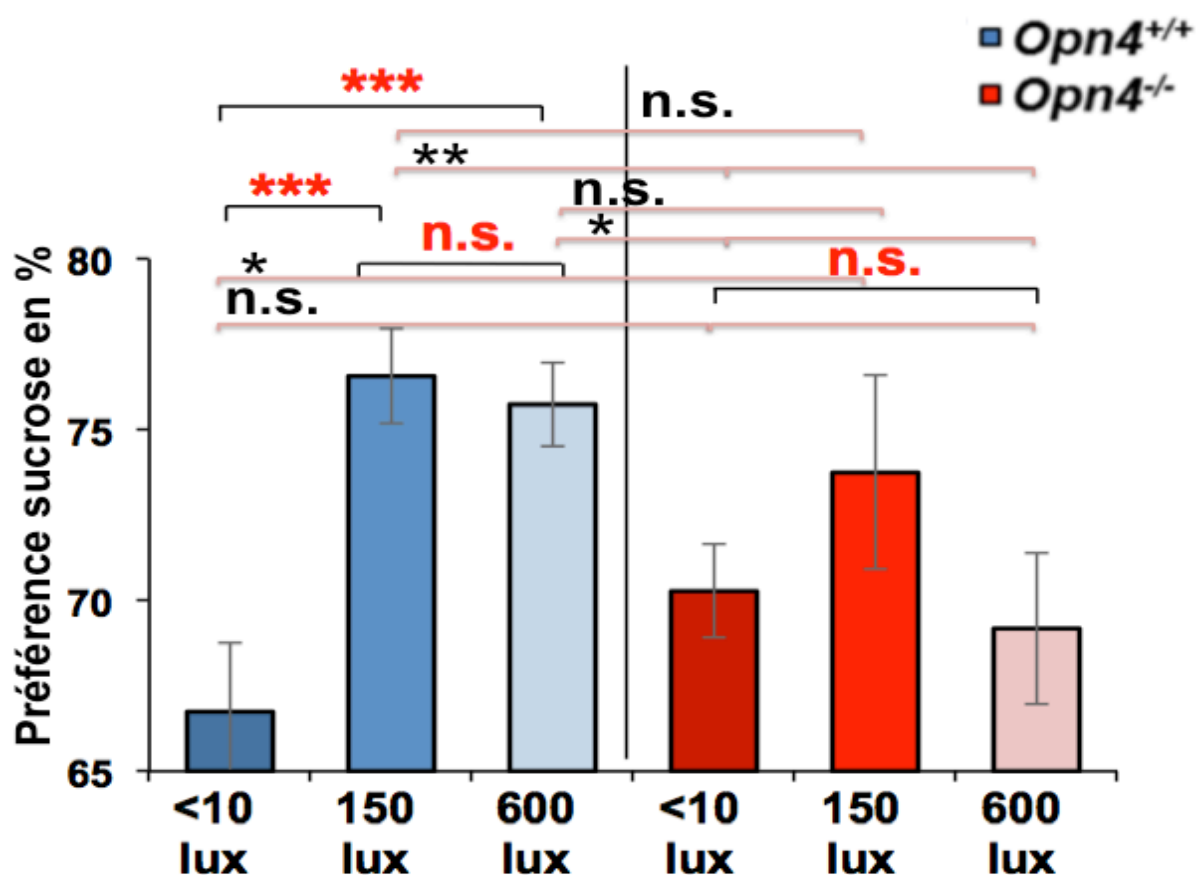


Figure 42. La préférence sucrose après l'exposition en fonction de l'intensité d'exposition et le génotype



La préférence sucrose (Figure 42) est différente chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> selon qu'elles aient été soumises à une exposition lumineuse faible, standard et forte. Cette différence est statistiquement significative entre les groupes « standard » et « faible » ( $p < 0,001$ ) et les groupes « forte » et « faible » ( $p < 0,001$ ), par contre cette différence est non significative dans ce génotype entre les groupes « standard » et « forte ». Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>, il n'y a pas de différence statistiquement significative quelle que soit la condition d'exposition. Il existe une différence génotypique significative entre les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition dim et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition standard ( $p < 0,05$ ), de même entre les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition standard et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition 600 ( $p < 0,01$ ), les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition « forte » et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition dim ( $p < 0,05$ ), les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition « forte » et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition « forte » ( $p < 0,05$ ). Dans la comparaison génotypique des autres groupes, il n'y a pas de différence significative, notamment pas entre les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition dim et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition dim et les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition standard et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition standard.

Une analyse de la variance (modèle général linéaire à deux paramètres : génotype, intensité lumineuse) concernant la préférence sucrose après l'exposition lumineuse (Figure 42) est calculée et est statistiquement significative en fonction du génotype ( $p < 0,05$ ) et de l'intensité lumineuse ( $p < 0,01$ ).

## Le FST

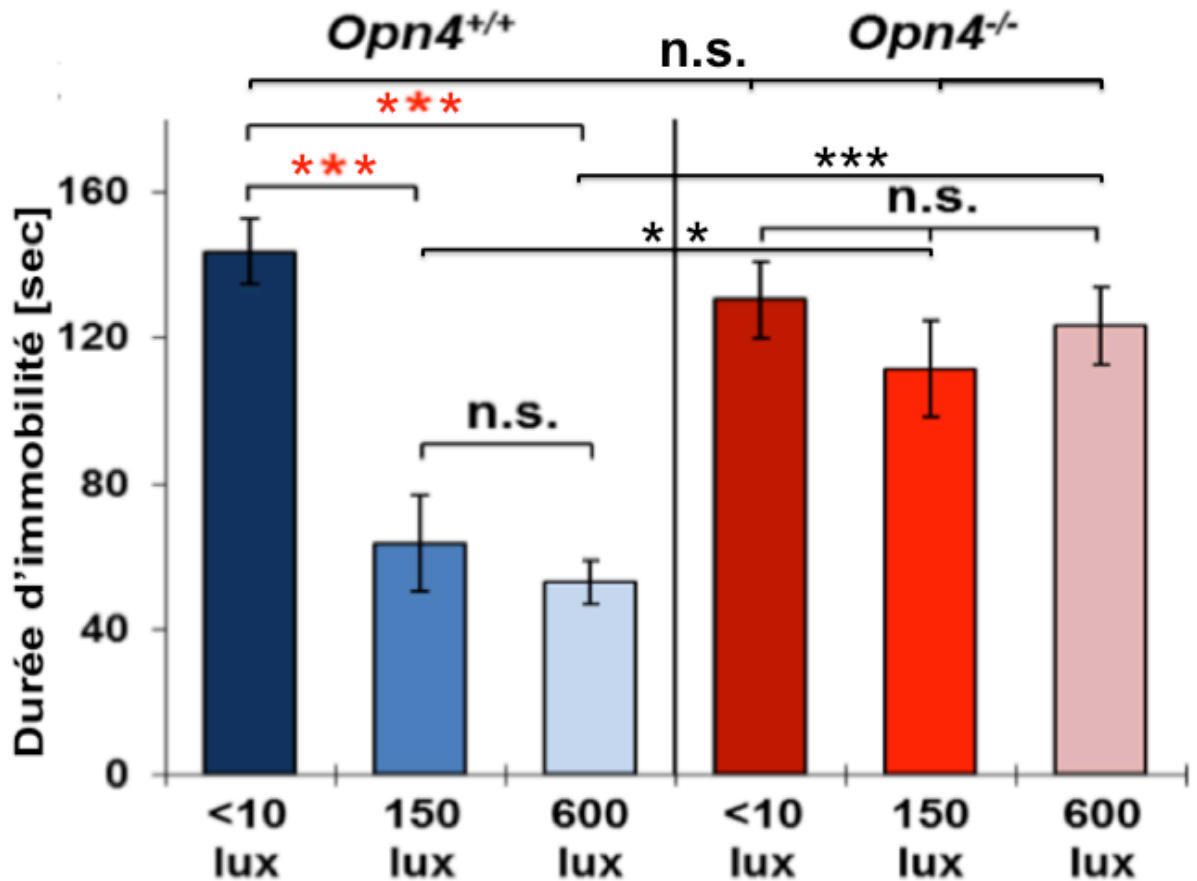


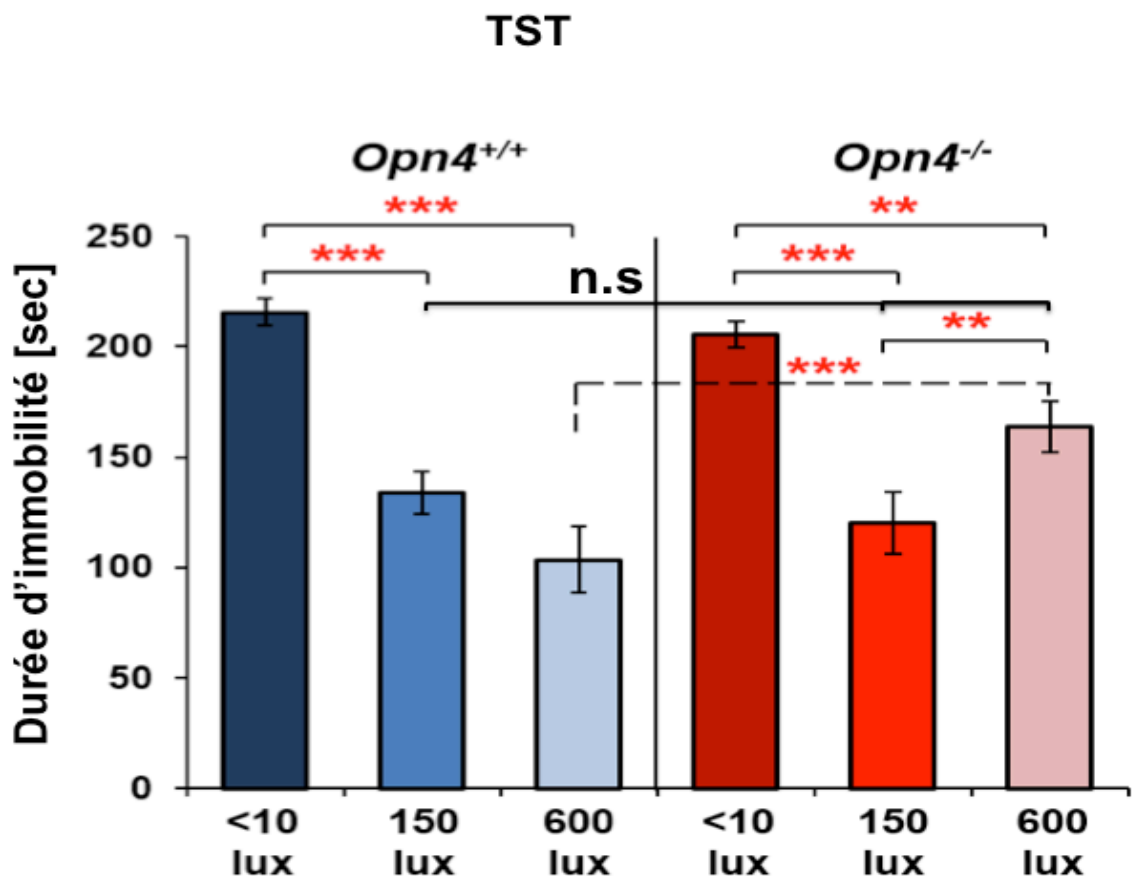
Figure 43. Le test de la nage forcée après exposition lumineuse en fonction de l'intensité et du génotype

Les tests de la nage forcée (n=131) et de la queue suspendue (n=131) (Figures 43 et 44) montrent une diminution de l'immobilité, significative et inverse à l'augmentation de l'intensité lumineuse appliquée lors de l'exposition lumineuse en période d'éclairage chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> (n=62).

Pour le test de la nage forcée chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup>, cette différence est statistiquement significative entre les groupes « forte » et « standard » (p<0,001) et les groupes « forte » et « faible » (p<0,001); aucune différence significative chez les

souris *Opn4*<sup>-/-</sup> (n=69) entre les groupes exposés aux 3 conditions lumineuses n'est constatée. La durée d'immobilité n'est pas statistiquement différente de celle des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> exposées à une faible intensité. Il existe une différence génotypique significative entre les groupes standard (p<0,001) et dans les groupes high (p<0,001). Une analyse de la variance (modèle général linéaire à deux paramètres : intensité lumineuse, génotype) pour le test de la nage forcée est calculée et est statistiquement significative en fonction du génotype (p<0,001), de l'intensité lumineuse (p<0,001) et enfin du génotype x intensité lumineuse (p<0,001).

### Le TST



*Figure 44. Le test de la suspension caudale après exposition lumineuse en fonction de l'intensité et du génotype*

Pour le test de la suspension caudale chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup>, cette différence est statistiquement significative entre les groupes « <10 » et « 150 » ( $p < 0,001$ ) et « <10 » et « 600 » ( $p = 0,001$ ). Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> ( $n = 69$ ), il existe une différence statistiquement significative entre les groupes « <10 » et « 150 » ( $p < 0,001$ ), les groupes « <10 » et « 600 » ( $p < 0,01$ ) et les groupes « 150 » et « 600 » ( $p < 0,01$ ). La durée d'immobilité des groupes « <10 » et « 150 » ne sont respectivement pas différentes entre les génotypes. Par contre les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> exposées à 600 lux sont immobiles plus longtemps que les *Opn4*<sup>+/+</sup> exposées à 600 lux et cette différence est statistiquement significative ( $p < 0,001$ ). Une analyse de la variance (modèle général linéaire à deux paramètres : intensité lumineuse, génotype) est calculée et est statistiquement significative pour l'intensité lumineuse ( $p < 0,001$ ) et pour le génotype x intensité lumineuse ( $p < 0,001$ ).

#### ***L'administration de fluoxétine***

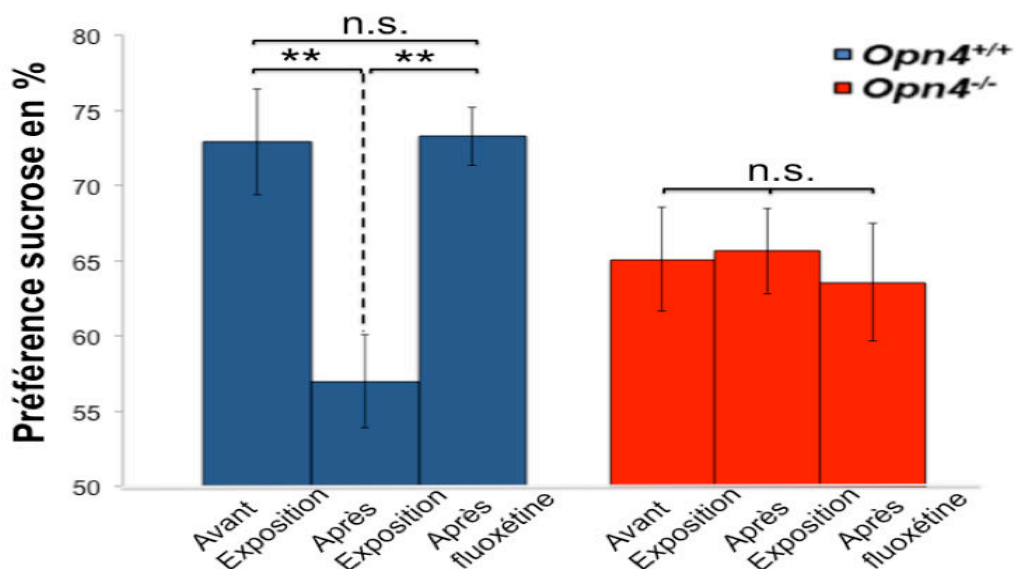


Figure 45. L'évolution de la préférence sucrose avant et après une exposition à faible intensité et après l'administration aiguë de Fluoxétine.

Un échantillon de souris (n=19, 9 *Opn4*<sup>+/+</sup>, 10 *Opn4*<sup>-/-</sup>) ont été exposées pendant 7 jours à moins de 10 lux ( Figure 45). Les résultats du test de préférence sucrose montrent que les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> ont développé un phénotype anhédonique avec une préférence sucrose avant et après l'exposition, respectivement, de 71% $\pm$ 3,97 (SEM) et de 57% $\pm$ 2,93 (p<0,01). L'administration en mode aiguë de fluoxétine a ramené la préférence sucrose à 73% $\pm$ 2 c'est à dire à son niveau initial (p<0,01). Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>, la préférence sucrose de base ne varie pas entre l'avant, l'après exposition et l'après fluoxétine de manière statistiquement significative.

Une analyse de la variance (modèle général linéaire à deux paramètres : période (avant exposition, après exposition et après administration de fluoxétine) du test de préférence sucrose et génotype) est calculée et est statistiquement significative pour les facteurs croisés génotype x période (p<0,01).

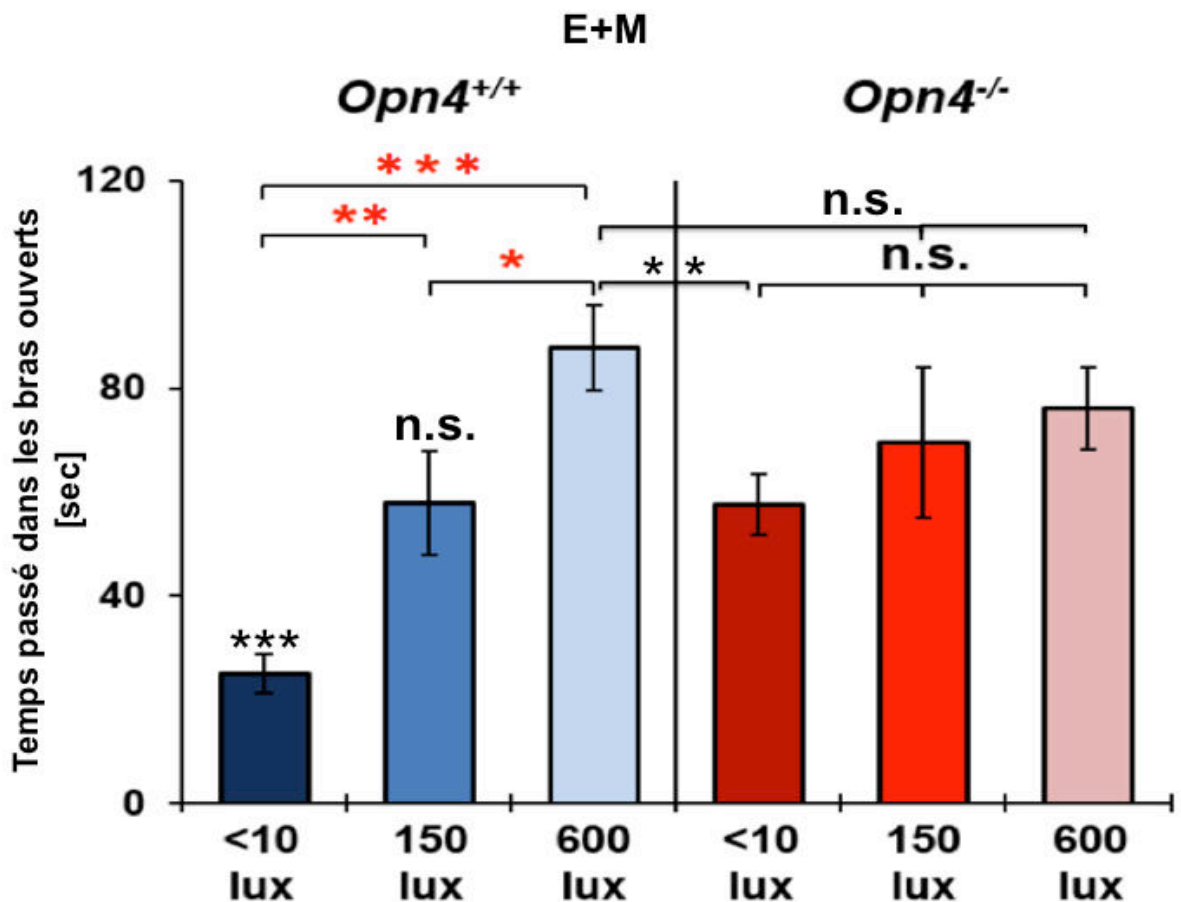


Figure 46. Le test du labyrinthe en croix suspendu en fonction de l'exposition lumineuse

Les résultats du test du labyrinthe en croix suspendu (Figure 46) montrent chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> (n=80), un temps passé dans les bras ouverts, dont l'augmentation est statistiquement proportionnée à l'intensité lumineuse de l'exposition ; cette différence est statistiquement significative entre les groupes « forte » et « standard » (p<0,05 ), entre les groupes « forte » et « faible » (p<0,001 ) et les groupes « faible » et « standard »(p<0,01 ). Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> (n=69), il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les 3 groupes d'exposition lumineuse. Concernant les différences génotypiques, elles sont significatives entre le groupe « faible » des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> et chacune des conditions de lumières chez les

souris *Opn4*<sup>-/-</sup>. Il n'y a pas de différence entre la condition standard des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> quelle que soit la condition d'exposition. Les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> du groupe « forte » passent significativement plus de temps dans les bras ouverts que les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> ( $p < 0,01$ ), cette différence n'est pas significative entre ce groupe et les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> des groupes standard et « forte ». Une analyse de la variance (modèle général linéaire à deux paramètres : génotype, luminosité) est calculée et est statistiquement significative en fonction de l'intensité lumineuse ( $p < 0,0001$ ) et du génotype x intensité lumineuse ( $p < 0,007$ ).

### ***L'âge des souris des expériences sur l'anxiodépression***

L'âge moyen des souris, dont le comportement a été étudié était de 4,5 mois pour les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> et de 4,1 mois pour les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>. Le tableau ci-dessous reprend les âges par génotype dans chaque exposition lumineuse et il n'y a pas de différence significative. Seules les souris ayant été incluses dans le groupe exposé à une faible intensité et ayant été étudiées avant, après l'exposition et après l'administration de fluoxétine à l'aide du test de préférence sucrose étaient plus âgées (âge moyen des 20 souris *Opn4*<sup>+/+</sup> et *Opn4*<sup>-/-</sup>, 7,43 mois)

Tableau des âges

	WT		KO	
	Moyenne d'âge (mois)	SEM (mois)	Moyenne d'âge (mois)	SEM (mois)
Groupe Dim	3,50	1,05	3,58	0,88
Groupe Standard	4,44	0,84	4,24	1,21
Groupe High	5,42	1,42	4,46	1,18
Groupe total	4,50	1,40	4,06	1,18
Groupe fluoxétine	6,98	2,07	7,93	1,29

**L'exploration de l'activité de l'axe corticotrope**

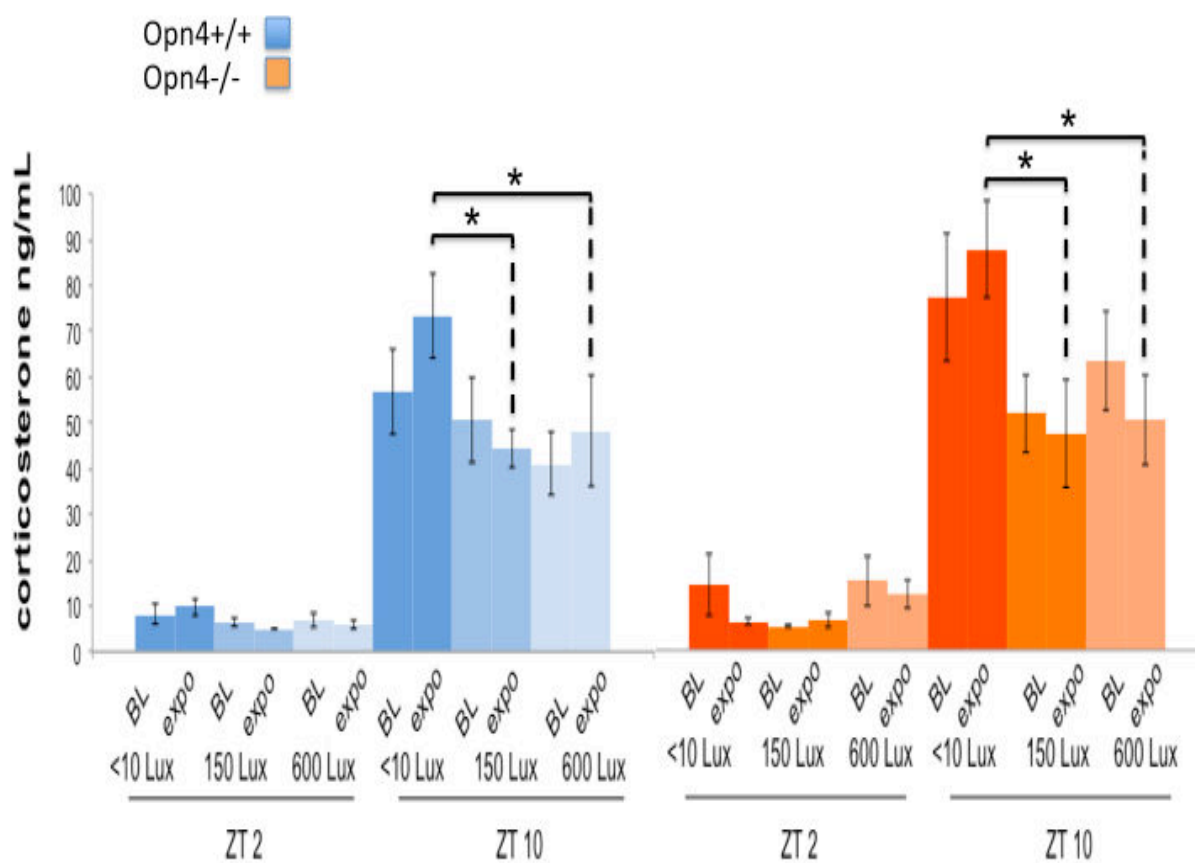


Figure 47. Les taux de corticostérone à ZT2 et à ZT10 avant et après l'exposition en fonction du génotype



Les résultats de l'activité de l'axe corticotrope ( Figure 47) chez les souris *Opn4* soumises au même paradigme lumineux que lors des tests précédents consistant à exposer en période d'éclairage trois groupes respectivement à < 10 lux (5 *Opn4*<sup>+/+</sup> et 5 *Opn4*<sup>-/-</sup>) , 150 lux (5 *Opn4*<sup>+/+</sup> et 3 *Opn4*<sup>-/-</sup>) et 600 lux (5 *Opn4*<sup>+/+</sup> et 5 *Opn4*<sup>-/-</sup>) pendant 7 jours montrent que les heures du nadir (ZT2) et du pic (ZT10) sont respectées dans les trois conditions.

Dans les conditions d'exposition standard, chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup>, les pics avant et après exposition sont en moyenne de 50 ng/ml et de 44 ng/ml et les nadirs avant et après exposition sont en moyenne de 6 ng/ml et de 5 ng/ml sans différence significative entre les situations avant et après exposition aux 2 points horaire. Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>, les pics avant et après exposition sont en moyenne de, 63 ng/ml et de 47 ng/ml et les nadirs avant et après exposition sont en moyenne de, 5 ng/ml et de 7 ng/ml sans différence significative entre les situations avant et après exposition aux 2 points horaire.

Dans les conditions d'exposition à faible intensité, chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> les pics avant et après exposition sont en moyenne de 57 ng/ml et de 73 ng/ml et les nadirs avant et après exposition sont en moyenne de 8 ng/ml et de 10 ng/ml sans différence significative entre les situations avant et après pour chaque point horaire. Chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>, les pics avant et après exposition sont en moyenne de 77 ng/ml et de 87 ng/ml et les nadirs avant et après exposition sont en moyenne de 14 ng/ml et de 6 ng/ml sans différence significative entre les situations avant et après pour chaque point horaire.

Dans les conditions d'exposition à une haute intensité, chez les souris *Opn4+/+*, les pics avant et après exposition sont en moyenne de 41 ng/ml et de 48 ng/ml et les nadirs avant et après exposition sont en moyenne et respectivement, de 7 ng/ml et de 6 ng/ml sans différence significative entre les situations avant et après pour chaque point horaire. Chez les souris *Opn4-/-*, les pics avant et après exposition sont en moyenne de 63 ng/ml et de 50 ng/ml et les nadirs avant et après exposition sont en moyenne, respectivement, de 15 ng/ml et de 12 ng/ml sans différence significative entre les situations avant et après pour chaque point horaire.

Chez les souris *Opn4+/+*, le taux de corticostérone après exposition à faible intensité est significativement plus élevé que ceux mesurés après exposition dans les conditions 150 et 600 lux ( $p < 0,05$ ). Chez les souris *Opn4 -/-*, le taux de corticostérone après exposition à faible intensité est significativement plus élevé que ceux mesurés après exposition dans les conditions 150 et 600 lux ( $p < 0,05$ ).

Une analyse de la variance (modèle général linéaire à trois paramètres : génotype, condition lumineuse, point horaire) concernant l'activité de l'axe corticotrope est calculée et est statistiquement significative pour la condition lumineuse ( $p < 0,01$ ), le point horaire ( $p < 0,001$ ) et la condition lumineuse x le point horaire ( $p < 0,05$ )

Les souris exposées à des intensités faible et standard sont en moyenne âgées de 9,3 +/-3 mois, les souris exposées à une haute intensité sont âgées de 2,5 +/-0,5 mois. Les âges moyens des souris *Opn4+/+* et *Opn4-/-*, quelle que soit la

condition d'exposition, ne sont pas différents statistiquement et sont respectivement de 6,9+/- 3,8 mois et 6,8+/- 4,6 mois.

### ***L'évolution pondérale des souris incluses dans l'étude comportementale***

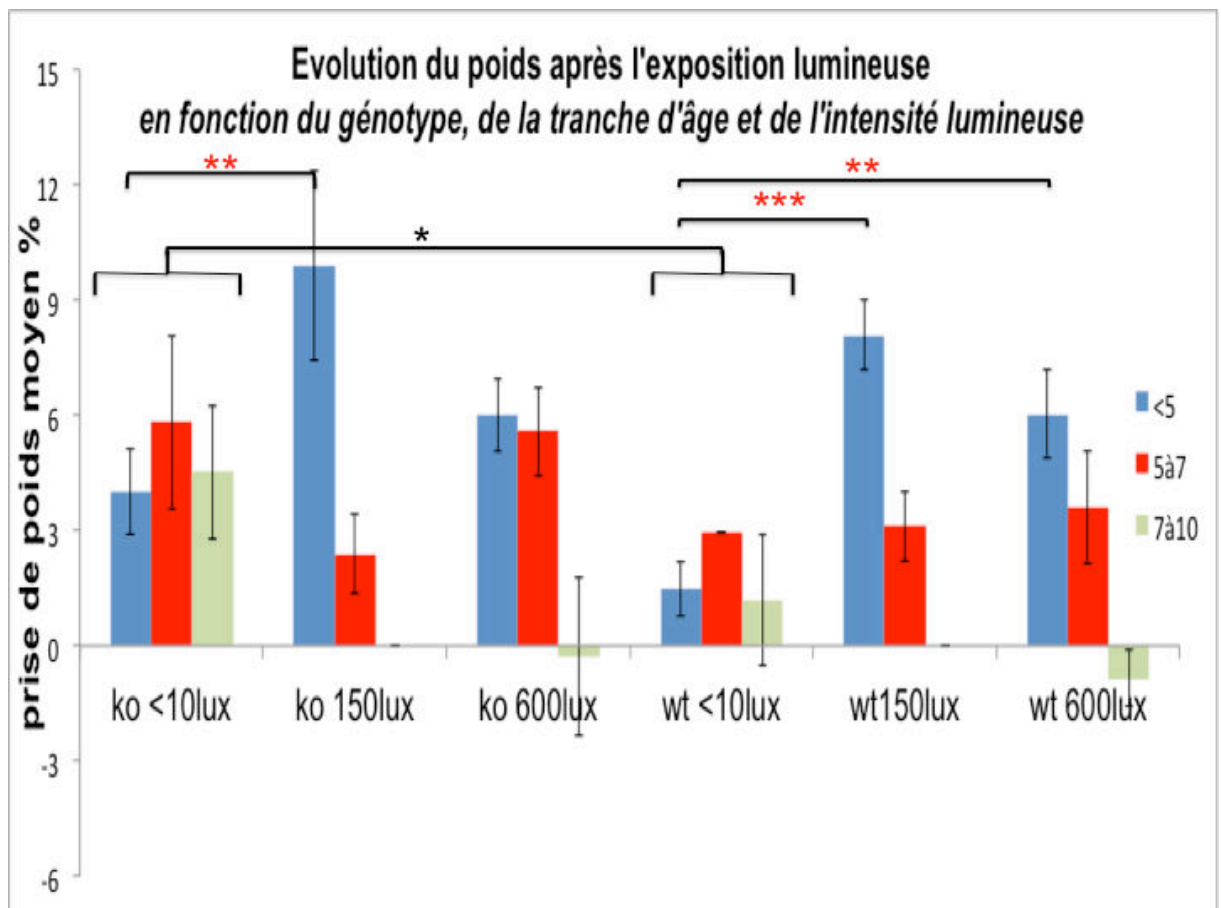


Figure 48. L'évolution du poids des souris en fonction du génotype, de l'intensité lumineuse appliquée et de la tranche d'âge

Les souris *Opn4+/+* exposées à une faible intensité quelle que soit leur tranche d'âge prennent moins de poids (Figure 48) que les souris *Opn4-/-* ( $p < 0,05$ ). Dans la tranche d'âge des moins de 5 mois ( $n=76$ ), la prise de poids des souris *Opn4-/-* exposées à une intensité standard ( $n=5$ ) est plus importante que celle des souris *Opn4-/-* exposées à une faible intensité ( $n= 17$ ), la différence est significative

avec un  $p < 0,01$  et il n'y a pas de différence significative avec celles exposées à une haute intensité ( $n=12$ ).

Dans la tranche d'âges des moins de 5 mois ( $n=76$ ), la prise de poids des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> exposées à une intensité standard ( $n=12$ ) est plus importante que celle des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> exposées à une faible intensité ( $n= 20$ ,  $p < 0,001$ ) et que celle des souris *Opn4*<sup>+/+</sup>, exposées à une haute intensité ( $n=12$ ,  $p < 0,01$ ).

L'analyse de la variance ainsi que les autres tests de student réalisés tenant compte des facteurs âge, génotype, intensité lumineuse ne mettent pas en évidence de différence significative d'autant moins que les effectifs dans certaines strates sont très faibles (<3 animaux).

## **Discussion**

Chez l'homme qui est diurne, la lumière joue un rôle primordial à la fois par son spectre et son intensité qu'en fonction de l'heure et de la durée d'application. Les mécanismes neurobiologiques sous tendant la dépression saisonnière ne sont pas entièrement compris. La dépression saisonnière associée, essentiellement, à un décalage de phase dans le sens d'un retard sont souvent constatés, l'explication circadienne a été la plus souvent avancée, mais elle n'explique pas tout (Wirz Justice 2006, Cajoren *et al.*, 2000, Frey *et al.*, 2012, Roecklein *et al.*, 2013).

### ***L'activité locomotrice sous l'effet de la lumière est mélanopsine dépendante***

L'étude de l'activité locomotrice chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> et *Opn4*<sup>-/-</sup>, dont on sait qu'elle est sous l'influence directe, non circadienne de la lumière (Hubbard *et al.*,

2013) nous a permis de vérifier que les souris restaient photoentrainées avec ou sans cellules à mélanopsine fonctionnelles (Ruby *et al.*, 2002) et surtout quelle que soit la condition lumineuse considérée, y compris la plus faible. D'autres effets directs de la lumière dépendent des cellules à mélanopsine fonctionnelles comme la perte de la capacité par la lumière à bloquer l'activité locomotrice chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>. (Mrosovsky et Hattar, 2003, Hubbard *et al.*, 2013). Toutefois dans ces études, le stimulus lumineux est appliqué pendant la période d'obscurité qui est la phase active chez un animal nocturne. Notre approche vis à vis de la lumière est différente puisqu'on module la lumière pendant la phase éclairée et qu'on recueille les informations comportementales pendant le nyctémère ou pendant la période d'activité. Notre paradigme lumineux voulait reproduire les variations et les conditions d'éclairage rencontrées dans la nature, liées à la course de la terre autour du soleil et rencontrées au fil des saisons. Seule l'intensité du niveau d'éclairage en phase lumineuse a été contrôlée dans notre étude sans agir, notamment, sur la durée des photopériodes pour ne pas entraîner de décalages de phase. L'effet produit par la condition lumineuse variable de notre étude n'est pas un effet direct comparable puisqu'il ne perturbe pas la phase d'obscurité mais renforce ou altère la qualité de la phase d'éclairage. Ainsi nos résultats ne s'opposent pas, ils sont complémentaires. . Les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> exposées à une dim light répartissent leur activité locomotrice (AL) différemment entre la nuit (2/3) et le jour (1/3) par rapport aux deux autres conditions (AL nuit : 4/5, AL jour : 1/5). Dans la condition scotopique, Il n'existe pas de différence génotypique, cela évoque un rôle important joué par les bâtonnets dans l'effet direct de lumière sur l'activité locomotrice pendant le jour. Dans la condition « 600 lux », l'activité locomotrice est altérée chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> .pendant la nuit, ceci n'est pas constaté chez les *Opn4*<sup>+/+</sup>. Ainsi, le niveau de

l'activité locomotrice en l'absence de mélanopsine fonctionnelle n'est pas différent entre le jour et la nuit dans la condition 600 lux. Cela semble traduire un effet direct, mélanopsinergique qui ne s'exprime qu'à 600 lux et qui peut s'expliquer par la mise en jeu, dans cette condition, d'une collaboration indissociable entre les cônes et les cellules, dont la manifestation comportementale s'exprime pendant la nuit (Barnard *et al.*, 2006). Certes, ces hypothèses impliquant les photorécepteurs classiques et les cellules à mélanopsine en fonction de la condition lumineuse considérée, ne pourraient être confirmées qu'en comparant les données obtenues chez les souris *Opn4* à des expériences menées dans des conditions similaires de lumière chez des modèles avec une invalidation fonctionnelle des bâtonnets *Gnat1*<sup>-/-</sup> et des cônes *Cnga3*<sup>-/-</sup>. Cette approche permettrait de distinguer la part de chacun des photorécepteurs dans cet effet direct de la lumière sur le comportement locomoteur.

### ***Le profil anhédonique sous l'effet de la lumière est mélanopsine-dépendant***

Dans chaque génotype, nous avons appliqué un seuil de départ de fiabilité de la préférence sucrose fixé à 65% pour discriminer a priori la participation comportementale liée à l'indécision de la perte d'envie induite par un stimulus dépressiogène.

Chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup>, lors du test de la préférence sucrose qui explore le développement ou non d'une anhédonie, nous constatons une nette diminution de la préférence pour la boisson sucrée dans le groupe dim light (<10 lux) alors que la préférence initiale avant l'exposition est comparable dans chaque groupe et conforme aux données de la littérature aux environs de 75 à 80% dans des conditions physiologiques et dénuées de stress (Strekalova *et al.*, 2011).

Comme nous l'avons décrit dans la partie « résultats », les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> ne se comportent pas de la même façon. En effet, leur préférence initiale au sucrose est plus basse dans tous les groupes avec une différence de plus de 5% par rapport aux souris *Opn4*<sup>+/+</sup>. Le profil anhédonique qu'elles développent n'est pas significativement différent entre les groupes quelque soit la condition de lumière considérée. Les taux de préférence au sucrose des souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans les conditions dim et high ne diffèrent pas de ceux des souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition dim. A travers ces résultats comportementaux, nous pouvons dire que le profil anhédonique développé chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> dans la condition « faible », et chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> dans les conditions « faible » et « forte » ne semble pas entièrement liée à la phototransduction mélanopsinergique. Il est probable qu'un effet collaboratif y participe dans la condition scotopique, vraisemblablement entre cellules à mélanospine et bâtonnets et dans la condition « forte » entre cellules à mélanospine et cônes. Malgré tout dans la condition « faible », le développement du profil anhédonique semble plus reposer sur les bâtonnets alors qu'en condition « forte », le non développement semble impliquer la phototransduction mélanospinergique.

Dans les conditions lumineuses standard et « forte », tandis que les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> corrige le profil anhédonique observé en « faible » light, les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> le développent, notamment dans le condition lumineuse « forte » . La mélanopsine semble avoir un rôle protecteur qui s'exprime en condition « forte » alors que la protection en condition standard ne dépendrait pas uniquement de la mélanospine. Nous avons constaté lors des enregistrements de l'activité locomotrice que dans la condition « forte », l'activité nocturne est renforcée chez les souris *Opn4*<sup>+/+</sup> alors qu'elle semble inhibée chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup>.

### ***La pharmacosensibilité du phénotype anhédonique induit par la dim light***

La mise en évidence d'une action potentiellement négative sur l'humeur par une faible intensité de lumière chez un animal nocturne *via* les cellules à mélanopsine est renforcée par le fait qu'un phénotype dépressif induit par une exposition à faible intensité chez les souris *Opn4+/+* a pu être réversé par l'administration d'un antidépresseur, ceci n'a pas été retrouvé chez les souris *Opn4-/-*. En effet, le groupe de souris de cette dernière cohorte a un âge moyen plus élevé (*Opn4+/+* = 6,98 ans ; *Opn4-/-* = 7,93 ans) que celles ayant été utilisées pour les expériences comportementales précédentes (*Opn4+/+* = 4,5 ans ; *Opn4-/-* = 4,06 ans). La prévalence de la dépression a tendance à augmenter avec l'âge ( Couillard-Despres et al., 2009) ce qui pourrait en partie expliquer le niveau de base des taux de préférence sucrose plus bas dans ce groupe (pour les *Opn4+/+* : 71% et pour les *Opn4-/-* : 65%) que dans les groupes plus jeunes utilisés pour les autres tests comportementaux (pour les *Opn4+/+* : 75%, pour les *Opn4-/-* : 72%) en dehors de tout stimulus dépressiogène. Cependant, ces données et le faible effectif du groupe « Fluoxétine » ne permettent pas d'envisager la participation d'un facteur mélanopinergique à ce constat, car les différences basales des préférences sucrose ne sont pas statistiquement significatives pour le facteur génotypique.



## ***La résignation sous l'effet de la lumière est mélanopsine dépendante***

### ***La résignation explorée par le FST***

L'analyse du comportement de l'animal pendant le test n'a tenu compte que des 4 dernières minutes, car l'immobilité, reflet de la résignation, dans ce cadre et avec ce fond génétique ne s'installe réellement qu'à partir de la troisième minute (Cryan *et al* 2005),

Les résultats obtenus lors de l'analyse du test de la nage forcée reflètent un comportement de résignation induit par la dim light sans pour autant que cet état soit sous l'influence exclusive de la mélanopsine. Ces données vont dans le même sens que ceux discuter à partir du test de la préférence sucrose. Le comportement adopté par les souris *Opn4<sup>-/-</sup>* quel que soit l'intensité lumineuse, à laquelle, elles ont été exposées pendant sept jours, n'est pas différent de celui des souris *Opn4<sup>+/+</sup>* exposées à une faible intensité lumineuse. Le phénotype adopté par les souris *Opn4<sup>-/-</sup>* et les souris *Opn4<sup>+/+</sup>* soumis à une faible intensité lumineuse évoque une fois encore la participation d'un photorécepteur autre que la mélanopsine dans la gestion de l'information lumineuse. La cellule photoréceptrice impliquée est vraisemblablement le bâtonnet, car à faible intensité lumineuse, ces cellules sont au maximum de leur sensibilité. De plus, il s'agit du photorécepteur le plus exprimé dans la rétine des rongeurs nocturnes. Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'appliquer le même paradigme lumineux à un modèle de souris *Gnat1<sup>-/-</sup>* dépourvues de bâtonnets fonctionnels (Altimus *et al.*, 2010) et d'étudier leurs comportements avec une séquence identique de tests.

La FST met en évidence l'installation d'un profil résigné chez les souris *Opn4+/+* sous dim light à la différence des souris *Opn4+/+* dans les conditions standard et high. Cette correction ne se constate pas chez les souris *Opn4-/-*, puisqu'elles adoptent toutes un profil résigné quelle que soit la condition d'exposition lumineuse.

### ***La résignation explorée par le TST***

Tout en étant réputé explorer la résignation ou le désarroi de l'animal, à l'instar du test de la nage forcé, les résultats du test de la queue suspendue dans notre étude sont à nuancer. En effet, tout comme les deux précédents tests, un phénotype dépressif est constaté autant chez les souris *Opn4+/+* que chez les souris *Opn4-/-*, exposées à une faible intensité lumineuse. Néanmoins, les souris *Opn4-/-* lors des autres tests (PS et FST) présentent un profil dépressif, quel que soit le niveau d'intensité lumineuse appliqué, à la différence de ce que montrent les résultats du TST. En effet, les souris *Opn4-/-* ont des durées d'immobilité au décours des expositions standard ou forte, proches de celles mesurés chez les souris *Opn4+/+* au décours de l'exposition standard.

Chez les *Opn4+/+*, plus l'intensité lumineuse d'exposition augmente moins les souris sont immobiles ce qui peut apparaître contraire au concept de l'effet direct de la lumière sur la locomotion chez les animaux nocturnes, dont le rôle principal est attribué à la mélanopsine (Mrosovsky et Hattar 2003). Comme nous le rappelions dans un précédent paragraphe, ces études explorant l'impact de la lumière sur l'activité locomotrice consistent, habituellement, à exposer la souris à une source lumineuse de durée et d'intensité variables pendant la phase nocturne (Lupi et al.,

2008, Altimus et al., 2008, Le Gates et al., 2012). Les résultats de ces modulations du stimulus lumineux et de leurs effets et les nôtres ne s'opposent pas, ils ne répondent pas à la même question concernant les effets directs de la lumière tout en considérant la mélanopsine comme un acteur principal.

### ***L'interprétation du TST et du FST en tenant compte des biais ou en les prévenant***

Nos données tendent à penser que plus une souris est exposée à une forte intensité en période d'éclairage, moins elle adopte un comportement d'attente ou de résignation en période d'obscurité et que ce phénomène est mélanopsinergique. En fait, le TST réalisé en phase d'activité ( et don en obscurité) explore le comportement d'une souris qui est soumise à une intensité lumineuse variable pendant sa phase de repos. La question reste ouverte au regard de nos résultats du TST, est ce que nous évaluons simplement un comportement thymique ou un impact de la lumière en phase d'éclairage sur l'activité motrice en phase d'obscurité. Dans les deux cas, la mélanopsine semble avoir un rôle central quand l'intensité lumineuse d'exposition est forte, comme nous le discutons à propos des enregistrements actimétriques effectués dans chaque condition de lumière. Par ailleurs, nos tests comportementaux ont été réalisés en période d'obscurité pour nous placer dans une situation comparable aux signes cliniques que l'on observe chez un homme déprimé. Leurs manifestations se constatent essentiellement pendant la période d'activité qui est la phase éclairée chez l'homme. L'intérêt de réaliser les tests à ce moment du nyctémère a été privilégié. Pour éventuellement minimiser le facteur locomoteur au profit du facteur thymique, il aurait fallu appliquer ce paradigme lumineux, réaliser et effectuer les tests, notamment le TST, en période éclairée

La vSPZ pourrait être la structure-clé, impliquée dans ce mécanisme à travers les projections directes et indirectes qu'elle reçoit en provenance des ipRGCs (Hattar *et al.*, 2006, Kramer *et al.*, 2001).

Le FST et le TST recueillent une variable identique, le temps d'immobilité (reflet de la résignation). Toutefois, le TST devrait plutôt être considéré comme un test complémentaire du FST.

Le TST introduit un stress hémodynamique (posture tête en bas, contrainte de suspension par la queue) et le FST, un stress thermique (risque d'hypothermie) et ces deux tests semblent impliquer des voies neurochimiques différentes (Ripoll *et al.*, 2003). Lors des deux tests, la souris va tenter d'échapper à la contrainte, mais va renoncer et devenir plus rapidement immobile lors du test du TST que du FST. La lignée C57BL6/J est sthénique et a tendance à s'accrocher à son train arrière ou à sa queue, ce qui peut prêter à confusion et faire interpréter une immobilité comme étant un comportement résigné alors qu'il pourrait s'agir d'un comportement d'attente. Cette lignée ne serait pas toujours la lignée la plus adaptée au TST, tout dépend de la question posée. Le TST serait plus robuste pour tester l'action des antidépresseurs que pour révéler un trait dépressif (Vaugeois *et al.*, 1997, Cryan *et al.*, 2005, Crawley 2007). Malgré tout, nous avons choisi de maintenir le TST dans notre batterie de tests pour renforcer l'exploration du phénotype dépressif, tout en essayant de contrôler le plus possible les restrictions ou les précautions énoncées dans la littérature, dont certaines ont été rappelées ci dessus. Lors du TST, la souris ne pouvait pas s'accrocher à son train arrière et au crochet. Lors du FST, le contrôle de la température de l'eau des béccher a limité la survenue d'une hypothermie, même si nous n'avons pas suivi la température centrale des souris pendant le test. Nous avons placé le TST, réputé avec un plus haut niveau de stress induit, en fin de

procédure. Nous avons testé un nombre important d'animaux pour améliorer la puissance et mieux contrôler la variabilité entre les animaux.

### ***L'anxiété, sous l'effet de la lumière, est mélanospine dépendante***

L'exploration de l'anxiété réalisée à l'aide du labyrinthe en croix suspendu peut donner lieu à l'analyse de plusieurs variables notamment les temps de fréquentation des bras ouverts ou fermés, le nombre de tentatives d'entrée dans les uns ou les autres. Nous avons choisi de nous focaliser sur le temps passé dans les bras ouverts, révélateurs du phénotype exploratoire et actif, assimilé à une absence d'anxiété. Force est de constater que plus l'ambiance lumineuse est faible plus l'anxiété est forte chez les souris *Opn4+/+*, ce qui est concordant avec les données des tests explorant la dépression. Quelle que soit l'intensité lumineuse à laquelle elles sont exposées, les souris *Opn4-/-* se comportent comme les souris *Opn4+/+*, exposées à une lumière standard, révélant ainsi une composante anxieuse. A l'instar des constats précédents, il semble y avoir une vulnérabilité qui s'exprime dans la condition dim et qui est mélanospine-dépendante. La mélanopsine semble être un acteur clé dans le développement d'un phénotype anxieux induit par une ambiance lumineuse de faible intensité et dans une moindre mesure dans l'amélioration de l'anxiété par une ambiance lumineuse forte. Nous pouvons avancer, une fois encore, la possibilité d'une collaboration impliquant en ambiance scotopique, les bâtonnets et les cellules à mélanopsine notamment le sous type M1 et leurs projections centrales à travers l'activation de la voie « off » et dans une moindre mesure mélanopsinergique pour l'anxiété, en ambiance forte, les cônes et les sous types M2, M4, M5 à travers l'activation de la voie « on » (Do et Yau 2010, Schmidt *et al* 2011)

Ces explorations montrent le développement d'un phénotype anxiodépressif chez les souris *Opn4+/+*, exposées pendant sept jours à une faible intensité lumineuse pendant la période d'éclairage qui s'étend de 19h et 7h. Le profil comportemental développé n'est pas exclusivement mélanospine-dépendant et est cohérent autant dans les tests explorant la dépression (PS, FST, TST) que dans celui explorant l'anxiété (E+M).

### ***La condition dim light n'est pas une condition plus stressante***

Nous souhaitons vérifier l'influence du paradigme lumineux et du génotype sur l'activité de l'axe corticotrope. En effet, il existe un lien étroit entre l'activation et la rythmicité de la sécrétion des hormones corticotropes et le stress (Sage *et al.*, 2001, 2004, Touma *et al.*, 2011 ; Willner *et al.*, 2013). Certains des tests utilisés lors du phénotypage comportemental peuvent induire un état de stress, c'est le cas respectivement de l'E+M ou du TST. Il est important de vérifier si les animaux présentent des perturbations du fonctionnement de l'axe corticotrope. Les dosages de corticostérone à ZT2 et à ZT10 avant et après exposition lumineuse, permettent de vérifier le profil corticotrope journalier des souris en fonction des génotypes et des conditions lumineuses. Nos résultats montrent un profil rythmique de la sécrétion de la corticostérone circulante chez tous nos animaux avec un nadir à ZT2 et un pic à ZT10 dans toutes les conditions lumineuses, y compris chez les souris exposées à une faible intensité lumineuse. Ces résultats permettent de confirmer ceux de l'activité locomotrice montrant que les animaux sont bien synchronisés par la lumière (Kalsbeek *et al.*, 2012, Otsuka *et al.*, 2012). Plusieurs facteurs peuvent participer aux taux de corticostérone plus élevés à ZT10 après l'exposition chez les souris *Opn4+/+* et *Opn4-/-*, dans la condition dim light par rapport aux taux dans la condition 150 ou

600 lux. Le premier serait une activation de l'axe corticotrope significativement plus marquée en période de transition lumière-obscurité avec des phénomènes d'anticipation par rapport à la période d'activité (Sage *et al.*, 2004). Certes, l'augmentation des taux de corticostérone en dim light (+52% pour les *Opn4+/+*, +74% pour les *Opn4-/-*) existe. Toutefois, en analysant les statistiques sans s'écarter des valeurs absolues des taux de corticostérone, il apparaît que cette différence est mineure et que les taux reflètent malgré tout un profil de base de l'activité de l'axe corticotrope et sont inférieurs aux taux rencontrés dans des situations de stress chronique qui sont de l'ordre de 150 ng/ml (Miyazaki *et al.*, 2013). Il est possible également que ce résultat illustre le fait que les souris soient *a priori* plus vulnérables en terme d'adaptation et de réactivité aux facteurs environnementaux, dans la condition à faible intensité. Nous pouvons ainsi nous demander, dans quelle mesure l'augmentation du taux de corticostérone constatée à ce Zeitgeber et dans cette condition pourrait également être en lien avec des perturbations du cycle veille-sommeil ou de l'activité locomotrice (Lupi *et al.*, 2008, Morin et Studholm 2011, Hubbard *et al.*, 2013) ? Les projections des ipRGCs vers les structures cérébrales sont nombreuses. Certaines, comme l'amygdale et l'habenula latérale (Hattar *et al.*, 2006, Ecker *et al.*, 2010, Mac Carthy et Welsch 2012, Aizawa *et al.*, 2013), jouent un rôle dans les modulations de l'activité de l'axe corticotrope (Willner *et al.*, 2013). Il faudrait confronter ce résultat préliminaire à des données anatomofonctionnelles de ces structures d'intérêt réalisées dans des conditions expérimentales similaires aux nôtres notamment en ce qui concerne le contrôle des conditions lumineuses.

Par ailleurs, l'âge des souris incluses dans l'étude du profil de sécrétion de l'axe corticotrope n'est pas homogène entre les trois conditions (âge moyen d'ensemble 6,9 mois, les *Opn4+/+*, n = 15 âgées de 6,9 mois et les *Opn4-/-*, n=13 de

6,8 mois); les souris dans la condition high sont plus jeunes que celles des conditions dim et standard. Si l'on se réfère à une étude qui a exploré le rythme et l'amplitude de l'axe corticotrope en fonction de l'âge, nos données basales du nadir et du pic coïncident avec celles de Dalm et collaborateurs en 2005 pour les souris de moins de trois mois (le taux de corticostérone à ZT 2 = $16,1 \pm 2,2$  ng/ml et celui à ZT10 = $52,1 \pm 4,6$  ng/ml , d'après Dalm). Les souris des groupes « dim » et « standard » qui sont plus âgées que les précédentes ont des taux plus élevés que le groupe « high » plus jeune, mais correspondent également à ceux rapportés par Dalm et collaborateurs en 2005 pour les souris âgées de 9 mois en situation basale (le taux de corticostérone à ZT2= $20,5 \pm 1$  ng/ml et celui à ZT10= $84,7 \pm 8,6$  ng/ml,, d'après Dalm ).

### ***Le contrôle de l'âge des souris testés***

Comme nous en avons discuté à l'occasion de la pharmacosensibilité et de la vulnérabilité vis à la vis de la dépression, l'âge est essentiel à contrôler pour pouvoir comparer et interpréter des données lors d'études abordant les troubles de l'humeur ou du sommeil (Angorge *et al.*, 2007, Wimmer *et al.*, 2013, Franck *et al.*, 2013, Tanti et Belzung 2013). Nous n'avons pas constaté d'influence de l'âge chez les animaux exposés à notre paradigme lumineux et ayant subi la batterie de tests comportementaux au décours de l'exposition. En effet, les tranches d'âges des groupes testés ne varient pas significativement entre les types d'intensité lumineuse appliqués et sont assez homogènes en dehors du groupe inclus dans le test pharmacologique à la fluoxétine plus âgé en moyenne de trois mois. Il est donc difficile de se prononcer sur l'influence du vieillissement même s'il est bien connu que la vulnérabilité face à la dépression s'accroît avec l'âge autant chez l'homme que



chez l'animal (Willner *et al* 2013, Krishnan et Nester, 2010, Lam et Levitan 2000, Ellenbogen *et al.*, 2011, Schneider et Prvulovic 2013,). Ces données sont un argument supplémentaire à celles concernant l'activité locomotrice que nos conditions lumineuses n'ont pas modifié le processus circadien, notamment sa phase.

### ***La perte de poids en dim light est mélanospine-dépendante***

Le suivi du poids des animaux de laboratoire est un critère fort et prédictif d'un état sanitaire satisfaisant, de même que l'état du pelage, l'éclat du regard, le comportement dans la cage. Ainsi, nous avons réalisé un suivi hebdomadaire du poids ce qui permettait en dehors des changements de litière ou de l'approvisionnement en eau et en nourriture ou de vérifier le bon état de santé des animaux et de respecter nos engagements en matière d'éthique. A l'instar des résultats des tests comportementaux, la contribution mélanopsinergique est mise en évidence dans le groupe soumis à une exposition à une faible intensité, dont la prise de poids est inférieure à 5 % quelle que soit la tranche d'âge. Ce caractère est plus marqué dans la tranche d'âge des moins de 5 mois qui est la plus représentée. Compte tenu des résultats des tests comportementaux qui vont dans le sens d'un phénotype dépressif induit par la dim light, la prise de poids moins importante de ce groupe pourrait être également le reflet d'un effet direct de la lumière *via* les ipRGCs sur l'une de leurs cibles constituée par l'hypothalamus latéral, connu pour son implication dans le contrôle du métabolisme et de la prise alimentaire (Challet 2010, Hattar *et al.*, 2006).

La confrontation des données du suivi pondéral à celles résultant des enregistrements de l'activité locomotrice, montrent, dans la condition dim light, une

activité locomotrice globale plus importante chez les souris *Opn4+/+*, pendant la phase éclairée, que dans les conditions standard ou forte, vraisemblablement au détriment du temps de sommeil. La prise de poids minorée chez ces souris semble être plus associée à un un ratio jour/nuit de l'activité motrice plus important dans la condition dim que dans les autres conditions, et donc à une dépense énergétique plus importante pendant la phase de repos qu'à une diminution des prises alimentaires. Toutefois, seule la répartition de l'activité locomotrice entre le jour et la nuit change entre les conditions, l'activité globale sur le nycthémère est identique. De plus, afin d'affiner l'analyse de ce paramètre, des études complémentaires avec l'utilisation de cages métaboliques pourraient être envisagées. D'autant que, chez l'homme, les troubles du comportement alimentaire et leurs conséquences sont souvent associés aux troubles de l'humeur (perturbation des prises et des goûts alimentaires et dépression) ( Krishnan et Nestler 2008, Bartolomucci et Leopardi 2009, Lewy et al., 2009) ou du sommeil (dette de sommeil chronique favorise l'obésité) (Morselli et al., 2010, Rolls et al., 2010, Leproult et al., 2009).

### **Corollaire et perspectives**

L'application d'une source lumineuse aberrante ou non physiologiques peut se révéler délétères ou perturber certaines fonctions biologiques comme la locomotion, la cognition, l'humeur, le sommeil (Altimus *et al.*, 2008, Lupi *et al.*, 2008, Tsai *et al.*, 2009, Le Gates *et al.*, 2012,). Le profil dépressif des souris *Opn4-/-*, révélé notamment par le FST et dans une moindre mesure par la PS pourrait être le reflet d'une vulnérabilité constitutionnelle *via* les cellules à mélanopsine sous l'influence de l'intensité lumineuse appliqué. Il pourrait également illustrer une atténuation de la perception des contrastes lumineux « non visuels » dépendante de la

phototransduction mélanospinergique. Ces deux hypothèses nécessiteraient d'être abordées et approfondies par la réalisation d'études spécifiques.

L'utilisation, d'une part de techniques d'immunomarquage (AVP, cfos par exemple), notamment, dans des structures d'intérêt de l'hypothalamus, cibles de projection des SCN que sont le noyau paraventriculaire (PVN), la zone sous paraventriculaire (SPZ), et le noyau dorsomédial (DMH) et d'autre part, d'enregistrements du sommeil et de l'activité locomotrice de ces souris, dont l'analyse se focaliserait sur les périodes de transition entre lumière et obscurité serait un complément intéressant.

Il serait également intéressant de compléter nos études en réalisant une étude anatomofonctionnelle pour préciser les structures impliquées dans le développement d'un profil phénotypique propre à telle ou telle condition lumineuse appliquée en période d'éclairage vis à vis du comportement alimentaire, de l'activité motrice, de l'humeur, de l'activité corticotrope et du sommeil . Par ailleurs, comparer les souris *Opn4+/+* et les souris *Opn4-/-* à des modèles *Gnat1<sup>-/-</sup>*, *Cnga3<sup>-/-</sup>* et *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>* aiderait à discriminer les implications respectives des photorécepteurs, de l'horloge centrale, des effets directs non circadiens sur ces comportements. Au terme de nos expériences, nous pouvons, également, avancer qu'une lumière de faible intensité pendant le jour affecte l'humeur et l'activité locomotrice alors qu'une lumière intense pendant le jour est bénéfique.

La souris est un animal nocturne, pourtant nos résultats mettent en évidence qu'une condition lumineuse de faible intensité pendant la période éclairée fait apparaître un phénotype anxiodépressif, à l'instar de ce que l'on constate chez l'homme souffrant de dépression hivernale.

Depuis plusieurs décennies, la luminothérapie est utilisée comme traitement de première intention (Lam *et al.*, 2006) ou associé aux antidépresseurs des dépressions saisonnières. Elle a l'avantage d'avoir un rapport bénéfice risque très favorable, notamment une innocuité ophtalmologique à condition d'être utilisée sur un œil sain (Gallin *et al.*, 1995). La luminothérapie est, dans une moindre mesure, proposée dans le traitement des dépressions non saisonnières, car les études ont montré une moindre efficacité dans ce cadre (Wirz Justice *et al.*, 2003, Terman et Terman 2005, Even *et al.*, 2008). Ceci est essentiellement expliqué par l'hétérogénéité clinique et chronotypique (Lam *et al.*, 1996) de ces patients, même si la première étude à avoir démontré l'efficacité de la luminothérapie a été conduite chez des patients présentant une dépression unipolaire, non saisonnière (Kripke *et al.*, 1981). Compte tenu, des interactions fonctionnelles entre le sommeil et la dépression, il est nécessaire pour explorer l'intérêt, l'efficacité de ce traitement non pharmacologique, de comparer des groupes de patients plus homogènes en terme de profils de régulation des processus circadiens et homéostatiques. Il est vraisemblable que le mécanisme non circadien sous tendant nos résultats est l'illustration du besoin de créer une ambiance lumineuse avec une intensité seuil minimale pendant la journée pour favoriser le bien-être chez l'animal comme chez l'homme. L'application d'une source lumineuse, à une heure précise, quelque soit sa durée ou son intensité intervient sur le processus circadien, ne répond pas aux mêmes objectifs. En effet, l'effet circadien de la luminothérapie domine quand on applique un protocole selon ces modalités. Cela peut masquer les effets directs surtout lorsqu'ils n'interviennent pas de manière majeure dans la physiopathologie du tableau de dépression saisonnière ou non. Cette nuance explique peut être les conclusions contradictoires d'études antérieures chez l'animal et chez l'homme. Les

plus nombreuses expliquent l'efficacité de la luminothérapie en évoquant une altération du processus circadien à l'origine des troubles du sommeil et de l'humeur (Brunner *et al.*, 1996, Koorengevel *et al.*, 2003, Lewy *et al.*, 2009). D'autres rapportent que l'altération du processus homéostatique participe de ces troubles et pourraient sous tendre les effets bénéfiques de la lumière (Cajochen *et al.*, 2000, Popa *et al.*, 2005, Armitage *et al.*, 2007, Savelyev *et al.*, 2012, Stephenson *et al.*, 2012). En fait, il est vraisemblable que ces études soient plus complémentaires que contradictoires, les conceptions méthodologiques utilisées ne permettent pas de répondre à l'ensemble des questions d'autant moins que les processus C et S impliqués sont intriqués et que la manière d'appliquer la source lumineuse favorise plus l'un que l'autre.

Pour l'heure, nous souhaitons compléter l'étude du comportement par l'étude du sommeil dans les mêmes conditions d'exposition lumineuse et pouvoir comparer nos données expérimentales à celles déjà recueillies et publiées chez ces souris dans le cadre de la caractérisation du sommeil et des effets directs de la lumière *via* les cellules à mélanopsine (Lupi *et al.*, 2008, Tsai *et al.*, 2009, Hubbard *et al.*, 2013). Cette approche constitue le deuxième volet de notre travail.

## **PARTIE 2**

# L'INFLUENCE DE LA VARIATION DE L'INTENSITE LUMINEUSE PENDANT LA PERIODE D'ECLAIRAGE SUR L'ARCHITECTURE ET L'HOMEOSTASIE DU SOMMEIL.

## Introduction

### ***Contexte général, hypothèse de travail et objectifs***

Nous avons appliqué le même paradigme lumineux utilisé dans le cadre des expériences comportementales consistant à faire varier l'intensité lumineuse de la phase éclairée. Nous avons analysé les effets directs non circadiens de la lumière sur la qualité et la quantité de sommeil sur des souris déficientes ou non pour le gène codant la mélanopsine (souris *Opn4+/+* et *Opn4-/-*)

*(Laurent Calvel, Jeffrey Hubbard, Elisabeth Ruppert, Ludivine Choteau, Mio Frisk, Dominique Ciocca, Patrice Bourgin* ***soumission prévue dans Sleep en septembre 2014***)

Chez l'animal, la plupart des études s'intéressant aux effets de la lumière sur le sommeil ont appliqué les procédures suivantes (Lupi et al., 2008, Altimus et al 2008, Tsai et al., 2009):

Une source lumineuse brève ou prolongée, d'intensité forte ou standard, à spectre large ou étroit est administrée une fois (« pulse de lumière ») ou de manière répétée pendant la période d'obscurité

Dans notre étude, nous avons choisi de ne pas moduler le moment ou la durée d'application d'une source lumineuse, mais de comparer des intensités lumineuses d'exposition pendant la phase éclairée du nyctémère et d'analyser leurs

impacts sur le sommeil. Nous souhaitons ainsi reproduire les variations journalières de luminosité rencontrées au fil des saisons, sous nos latitudes et qui participent, par exemple, au déclenchement des dépressions saisonnières. Compte tenu du rôle majeur de la phototransduction mélanopsinergique dans la régulation des états de veille sommeil (Tsai et al., 2009, Muindi et al., 2013) et de l'interaction fonctionnelle entre sommeil et dépression (Armitage et al., 2000, Adrien et al., 2002, Steiger et Kimura 2010), il nous paraît pertinent d'étudier chez les souris *Opn4*, les effets directs de la lumière sur le sommeil en reproduisant des conditions environnementales proches de celles qui font le lit des troubles de l'humeur saisonniers.

### ***Les conditions expérimentales***

Nous avons analysé le sommeil de trente quatre souris transgéniques C57BL/6, mâles, croisées en retour (F10), homozygotes par rapport au gène de la mélanopsine. Trois groupes de souris ont été soumis pendant sept jours, à trois intensités lumineuses au cours de la période d'éclairage, respectivement (n=12 à <10 lux, n=10 à 150 lux, n=12 à 600 lux).

Nous avons effectué des privations de sommeil de 6h et mesuré la puissance delta du NREM qui reflète l'état du processus homéostatique dans chacune des conditions. Si l'homéostat du sommeil a un bon fonctionnement, cette puissance Delta sera plus élevée au décours de la privation qu'elle ne l'est lors du recueil de base des deux jours s précédentes effectué après l'allumage de la lumière De plus, la puissance delta diminue de manière exponentielle au cours de la période de récupération qui comprend les heures du jour suivant la privation.



## Article

Title :

Light irradiance positively influences sleep homeostasis through melanopsin-based phototransduction

Laurent Calvel<sup>1,2</sup> MD, Jeffrey Hubbard<sup>1,2</sup> PhD<sup>\*</sup>, Elisabeth Ruppert<sup>1,2\*</sup> MD, Ludivine Choteau<sup>1,2</sup> MS, Heidi Ikonen,<sup>1,2</sup> Dominique Sage-Ciocca<sup>3</sup> PhD, Patrice Bourgin<sup>1,2,†</sup> MD, PhD

<sup>1</sup> CNRS-UPR 3212, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Sleep Disorders Center, CHU and FMTS, University of Strasbourg, France

<sup>3</sup> CNRS-UMS 3415, Chronobiotron, Strasbourg, France

<sup>\*</sup> These authors contributed equally to the manuscript

<sup>†</sup> Corresponding author: Patrice Bourgin

CNRS UPR 3212, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, 5 rue Blaise Pascal; and Sleep Disorders Center, 1 place de l'hôpital, CHU and FMTS, 67000 Strasbourg, France.

Tel: +33 3 88116430, Fax: + 33 3 88 11 51 53

[pbourgin@unistra.fr](mailto:pbourgin@unistra.fr)

Formatted for submission to Journal SLEEP

Title count (110 characters max with spaces):

Summary paragraph (250 max): words

Main Word count:

Main Figure count:

Reference count (no more than 30):

## **ABSTRACT**

**Study Objectives:** Light influences sleep and waking through circadian and direct effects, yet its putative influence on sleep homeostasis remains unclear. We previously reported that melanopsin (*Opn4*), a retinal photopigment, affects sleep homeostasis. Here we sought to determine whether light irradiance influences the sleep homeostatic process in melanopsin KO mice.

**Design:** Backcross male *Opn4*<sup>-/-</sup> mice and their littermate controls were exposed to three different light intensities (< 10, 150, or 600lux, n=6-8/group) for 7 days (exposure duration based on a previous preliminary study). Sleep was recorded under baseline conditions and during a 6-hour sleep deprivation by gentle handling and starting at ZT12. EEG power spectrum was performed, specifically to quantify EEG delta power, a reliable marker of sleep need.

**Setting:** Rodent sleep laboratory

**Participants:** 36 male mice (18 *Opn4*<sup>-/-</sup>, 18 controls) aged 3 months, 25-30g

**Interventions:** Sleep deprivation and variable light intensities

**Measurements and Results:** In wild-type the level ( $p < 0.05$ ) delta power reached after sleep deprivation increased as a function of light intensity, with the highest under 600 lux (240% of baseline), vs. 150 lux (170%) and < 10 lux (141%). Comparatively, mice lacking melanopsin displayed lower level of EEG delta activity following sleep deprivation. Moreover, in the absence of melanopsin, especially at <10 et 150 lux. However, the delta power peak observed after sleep deprivation increased with light, but only at higher irradiance (600 lux), suggesting for these light intensities the existence of a compensatory mechanism mediated by cones-based photoreception.

**Conclusions:** These preliminary results indicate a positive relationship between light intensity and the increase in sleep-need with time-spent-awake, an effect mediated primarily through melanopsin-based phototransduction, yet the rods and cones might also play a role at higher irradiance.

**Keywords:** Melanopsin, sleep homeostasis, non-visual light, phototransduction, rod-cone, EEG delta power, sleep need, knockout mice, NREM sleep, sleep deprivation.

## Introduction

Light plays an essential role in the homeostasis of biological functions and survival of species living on earth. Light exerts pervasive effects on physiology and behavior, including phase shifting of circadian rhythms, sleep, alertness, learning and memory but also heart rate. The retina is a crucial part of the eye involved in the translation and transmission of both visual and non-visual light information to different brain structures. Non-visual light is transmitted through a subset of ganglion cells located in the retina which are inherently photosensitive, in contrast to the two traditional photoreceptors, rods and cones. These phototransductive cells contain a transmembrane protein called melanopsin, which has been highlighted and studied for a little over a decade (Provencio et al 2000, Lucas et al. 2003 Hattar et al., 2003, Panda et al., 2002, Ruby et al. 2002). The primary circadian clock, the suprachiasmatic nucleus (SCN) serves as the main target of this non-visual light. As information passes from the retina, through the retinohypothalamic tract, light entrains this clock. Additionally, other non-visual information is relayed to further brain structures. In human beings and other mammals, these cells are involved in a variety of non-visual functions such as photoentrainment, phase shifting, suppression of melatonin secretion, the pupillary reflex, and the activation of locomotion, some of which are termed the direct, non-circadian effects of light (Lockley et al. 2006 Cajochen et al., 2007). Several teams working in mice models, including ours, have demonstrated the essential role of the non-circadian melanopsin-mediated direct effects of light on the sleep-wake cycle, motor activity, the pupillary reflex, alertness, and mood (Tsai et al., 2009 Lupi et al. 2008 Altimus et al. 2008, Hubbard et al., 2013, and Legates. al 2012).

In the current study we characterized the sleep-wake cycle in a mouse model lacking melanopsin (*Opn4*), in order to highlight the direct, non-circadian effects of light, especially when applied during the first part of the night. Furthermore, we aimed to study the impact of these effects on the sleep-wake cycle and motor activity, as light intensity was varied during the illuminated period. The finding of a negative consequence of light when presented at non-standard hours, is indeed alters certain biological functions such as sleep, memory, alertness, mood, driven by shift-work or jetlag with a sleep debt accumulated in transmeridian travelers (Boivin 2000, Boivin and James, 2005, Chang et al., 2013, Bedrosian et al. 2013). Insofar as there is evidence that a neurobiological mechanism exists, depressive conditions as seasonal affective disorder (SAD), cannot be explained purely by circadian alterations, as sleep and depression have a strong functional interaction (Wirz Justice et al. 1993, Cajoren et al. 2000, Savelyev et al. 2012). Thus, it is useful to construct experimental protocols where the quality of light (intensity or wavelength) is varied, without interfering with the time or duration of application. Here we propose a study on a mouse model lacking melanopsin (*Opn4*<sup>-/-</sup>), previously characterized for sleep and the non-circadian direct effects of light via melanopsinergic phototransduction. (Tsai et al. 2009)

## **Materials and Methods**

### **Animals**

The animal cohort consisted of 36 males, C57BL/6 backcrossed (>F10), *Opn4*<sup>-/-</sup> mice and their wild-type (*Opn4*<sup>+/+</sup>) controls, maintained in our animal facility the Chronobiotron (UMS 3415) housed at the Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg, France. All mice were separated at 4 weeks and placed in individual cages for social isolation for a minimum of three weeks. Animals were raised under

environmentally stable conditions [12-hour: 12-hour light-dark (12hL:12hD); 150 lux; 25 ± 0.5° C; food and water ad libitum] and managed according to the European Union guidelines for laboratory animal experimentation. All experimental sleep protocols were supervised by a veterinarian and approved by the appropriate ethic committees at the University of Strasbourg, and CNRS.

#### Light-controlled experimental cabinet:

During the variable light exposure phase of our paradigm, where sleep and locomotor activity recordings were made, mice were placed in a ventilated two-compartment cabinet controlling moisture, temperature and lighting conditions. Programming of the light and dark cycle was controlled by a clock, and operated on a pulse method wherein the hour of illumination and extinction is defined, as well as the number of pulses (from 1 to 6 corresponding to the respective intensities of 600, 50, 150, 300, 450, 600) for the desired phase of lighting for each day. Each compartment of the cabinet has the capacity to accommodate up to 10 cages of type 2 and 4 cages of type 2L.

#### Genotyping:

Genotyping to verify the genetic background was performed using a standard PCR described previously in (Ruby, et al. 2002). Primers used were:

Forward (Mel4E3)	TCA-TCA-ACC-TCG-CAG-TCA-GC
Forward (Todo Neo)	CCG-CTT-TTC-TGG-ATT-CAT-CGA-C
Reverse (Mel2E4)	CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG

The fragment corresponding to the allele for *Opn4*<sup>+/+</sup> is 289 bp and the mutant allele at 919 bp.

#### EEG implantation

Mice were anesthetized using a combination of Ketamine/xylazine (80g/kg, 7g/kg; protocol-approved). Following anesthesia, mice were

implanted with two EEG, one reference EEG, and two EMG electrodes placed subcutaneously in the cervico-auricularis muscles of the neck, in order to record vigilance states (Wake, NREM sleep, and REM sleep). Mice were given at least 14 days to recover from surgery and habituate to the baseline control conditions before any further experiments were carried out. Following surgery, visual inspections were made daily to ensure adequate recovery. Verification of physiologic and behavioral parameters was realized by weighing each animal, observing changes in water level, the healing of the tissue surrounding surgery site, and the movement of the animal in the cage. Mice were recorded continuously throughout several light conditions: (1) <10, (2) 150 lux, (3) 600 lux, all carried out using the controlled light cabinet (described previously). Different mice were used for each condition in order to eliminate any mood or behavior effects consecutive to light changes. 72 hours following surgery animals were connected to their recording systems for data acquisition. Sleep was recorded using using commercially available hardware and software (Micromed France, SystemPLUS Evolution version 1092).

### Sleep deprivation

After 7 days of exposition to a specific light condition, each mouse underwent a standard NREM sleep deprivation protocol through means of “gentle handling” in order to remove as much bias as possible. This method was previously described in Franken, et al. 1998. Sleep deprivations began at ZT0, the time at which the light is switched on in the cabinet, corresponding to the habitual rest period for the mouse. Following each sleep deprivation mice underwent a sucrose preference test for anhedonia behavior.

### Actimetry recording and analysis

In addition to EEG/EMG recordings of brain activity, movement was measured using an infrared camera system throughout the course of the experiment. Each camera was mounted facing downwards into the cage and was interrupted so as not to record movement from surrounding animals. Actimetry was recorded using the CAMS system, creating files of 5 minute activity bouts. Analysis was performed using commercially available software, ClockLab. Results were categorized in terms of 5-min, 12-hour, and 24-hour bouts.

#### EEG scoring and power spectrum analysis:

EEG and EMG signals were amplified, filtered, and analog-to-digital converted to 256Hz. The EEG signal was then modified using a Discrete-Fourier Transform (DFT) to yield a power spectra between 0 and 90 Hz (0.25Hz resolution) using a 4-s window. Any epochs containing EEG artifacts identified and excluded during further analyses. Differences between genotypes in sleep amounts were calculated by averaging time spent in each state over 5-min, and 1-, 12-, and 24-h intervals.

For each vigilance state of the ECoG, an average spectral profile was constructed using all 4-s epochs scored with the same state. The frequency range 49-51 Hz was omitted due to power-line artifacts in some of the recordings. In NREM sleep, time-dependent changes in ECoG power for specific frequency bands, was performed for delta (0.75-4Hz). During wakefulness, theta (6-10Hz) and gamma (40-70Hz) were measured instead. ECoG delta power during NREM sleep was normalized by expressing all values relative to the mean value obtained in the last 4-h of the (subjective) light period, the lowest period of homeostatic sleep pressure. Profiles were calculated using overlapping 10 min windows of waking at 5-min increments (13/hour).



## **Results**

Opn4<sup>-/-</sup> behaved differently under various vigilance states depending on the lighting condition they were exposed to. Under a standard 150 lux condition, mice lacking melanopsin slept approximately one-hour less during the light period as compared to their wild-type counterparts, a NREM loss which was not recovered during the dark period (table 1). This finding was consistent with previous experiments using these mice (Tsai et al. 2009). Interestingly this observation was not seen to the same degree in either the low-light (14-minute difference) or high-light (30-minute difference), conditions. Differences during the dark period under low and standard light conditions were negligible, though KO mice slept one hour more under high intensity light. The time-course of NREM under standard lighting confirmed that differences seen between genotypes were relatively confined to the light period (Figure 1-middle). Under low-light no genotype differences were noticeable (Figure 1-top), which was also the case under high-intensity light (Figure 1-bottom). Interestingly, the overall amount of NREM sleep was lower under this condition.

After exposure to 7 consecutive days of 12hL:12hD, all mice were subjected to a 6-hour sleep deprivation beginning at ZT0 (light onset). Mice of both genotypes under 10 and 150 lux conditions showed similar time-course during the SD recovery period, as during the dark periods of the days preceding it. However, following sleep deprivation under high intensity light, mice continued to sleep levels higher than typical sleep under dark periods. In order to determine the quality of sleep following the sleep deprivation, the EEG was analyzed for power spectrum and specifically delta power, a marker for sleep need. Delta power during baseline days under 10 lux was relatively similar between genotypes, with only a few time-points showing significant differences (Figure 2-

top). Following sleep deprivation, WT mice showed a significantly higher peak as compared to KO (Figure 3). During recovery animals displayed similar patterns, however, whereas WT mice built-up sleep pressure again during the dark period following the sleep deprivation, KO mice failed to do so. Under 150 lux, mice behaved nearly identically to previously published data under standard laboratory conditions (Figure 2- middle, Tsai et al). Interestingly, while WT mice continued to increase in delta power following deprivation, KO mice were unable to rise much above those in low-light conditions (Figure 3). Finally, in high-intensity conditions WT mice reached an even higher peak than under standard light, though unexpectedly, KO mice did as well (Figure 2- bottom, figure 3).

To examine the alertness level of these mice under baseline and to determine the existence of a genotype effect, theta and gamma, markers of rodent cognition and exploratory behavior, were analyzed during waking. In dim light, mice lacking melanopsin seemed to show higher levels of alertness during the dark period as compared to their WT controls, though followed similar time-courses (Figure 4- top). Under standard lighting no genotype differences were seen (Figure 4- middle). This was true as well for the high-intensity condition, however animals showed a significantly higher level of alertness during the dark phase, followed by a sharp decline during the light phase (Figure 4- bottom).

Finally, REM sleep was analyzed during the 12hL:12hD period for all animals, under all conditions. Under dim and standard light conditions, a time of day significance was seen (light vs dark period; Table 1), yet not a genotype difference. This was not the case under 600 lux though, as WT mice showed almost identical amounts of REM under light and dark periods. KO mice behaved similar under all conditions. The length of the first REM bout during the light period was calculated though no

significant genotype or light condition changes were observed (Figure 5-bottom). However, when the start of the first REM bout was calculated a genotype significance was seen in dim and high light, as well as light condition differences for KO mice (Figure 5-top).

## **Discussion**

The genotype differences observed under 150 lux in this study were similar to our previous studies with these animals (Tsai, et al. 2009 Hubbard et al. 2013). OPN4<sup>-/-</sup> mice slept one hour less during the light period as compared to OPN4<sup>+ / +</sup>. Conversely, during exposure to the high intensity condition (600 lux) our results highlight two important elements. The first concerns wild-type animals which unlike their OPN4<sup>-/-</sup> counterparts remain awake for an extra hour during the dark period at the expense of NREM. Secondly the duration of REM during the subjective day is nearly twice as long as compared to both the “dim” and “standard” light conditions, regardless of genotype, and remains the same in Opn4<sup>-/-</sup> mice. Specifically, Opn4<sup>+/+</sup> mice show an even distribution across day and night, with a reduction of 50% as compared to wild-type mice exposed to the “standard” condition. This seems to suggest that the impact of the light and genotype is negligible under dim and standard conditions, yet highly involved in REM sleep distribution under elevated irradiance, implying a direct, melanopsin-dependent, non-circadian regulation. In rodents, alternating cycles of NREM-REM are known to be ultradian, and lasting for several minutes at a time. According to the theory put forth by Benington and Heller, the regulation of REM sleep is homeostatic in nature, not unlike NREM, wherein the pressure for REM operates as a function of NREM duration, and not the length of time spent awake (Benington and Heller 1994). More precisely, the intervals between a given REM bout is a function of the time spent in

NREM. However, this NREM does not need to be consolidated. Thus, the homeostatic regulation of REM, represents an independently controlled mechanism, external to sleep-wake circadian, or NREM homeostatic regulations (Datta and MacLean 2007, Shea et al. 2008). These results are also similar to other studies we have performed in these mice (data not yet published), where a loss of total REM sleep was seen during the light phase in OPN4 + / + SCN-lesioned as compared to sham controls, displaying a distribution akin to their arrhythmic sleep across the light/dark cycle. In summary, under the 600 lux condition, if we consider the time-course and total amount of time in each vigilance state, we find that Opn4+/+ mice are awake 4 hours more, sleep almost 4.5 hours less, and lose 28 minutes of REM during the light period, when viewed against baseline values under the “standard” condition. Given these results, we must consider that the principle regulatory mechanism for REM may be non-circadian melanosin-dependent phototransduction. In contrast to depressed human beings, which show increased latency and shortened duration for their first REM episode, in mice this ultradian NREM-REM repartition across the sleep/wake cycle is reinforced by the presence of bimodal increases in activity during light-to-dark and dark-to-light transitions. Thus these REM sleep markers of depression are not applicable in a nocturnal mouse model.

As previously stated, sleep deprivations and delta power analysis of NREM sleep homeostasis, were performed in both genotypes under each light condition. We observed that the increase in light intensity in relation to delta power following sleep deprivation, constitutes a dose-response curve. Under 600 lux, delta power is higher, reflecting an increased need to sleep, likely due to increased activity bouts, or at least greater ranges of movement which fatigue the animal more quickly. Previously we found a direct relationship between melanopsin and the

homeostatic regulation of sleep, under baseline conditions as well as following sleep deprivation (Tsai et al. 2009). However, our current data suggest that this direct non-circadian effect functions outside of the presence of melanopsin at higher light intensities. This is evident given that although differences in delta power levels exist between wild-type and knock-out animals, *Opn4*<sup>-/-</sup> mice still show higher delta power values as compared to the other light conditions. This may be due to an effect observed in a behavioral study using these same mice and light conditions (Calvel et al. 2014 under review), in which cooperation between cones and melanopsinergic cells in the retina, interact at higher light intensities (Lall et al., 2010, Morin and Sudholme 2011 Gooley et al., 2012).

The impact of total sleep deprivation on delta power and the duration of NREM during the recovery period varies depending on the light conditions and genotype. One of the key elements is the absence of a homeostatic modulation in dim light after sleep deprivation, where delta power is approximately 160% (versus 250% in the "high" condition). Furthermore, the following sleep deprivation in the "high" condition, delta power does not exponentially decrease as in other conditions, but maintains itself beyond the light phase. This seems to confirm that the quality of the sleep homeostat in this condition is related to the increase in NREM sleep during the subsequent dark phase. This data is particularly interesting in that these non-circadian direct effects of light via melanopsinergic phototransduction, directly alter the sleep homeostat.

Consecutive to this study, our team conducted experiments using the same mouse model, applied the same light paradigm, and studied the locomotor activity as a means to examine what conditions might lead to the development of a depressive phenotype. By comparing these results

from those described above in the context of sleep, we can identify that higher irradiance lighting given during the day, is beneficial to the quality of sleep, mood, and promotes the behavioral drive for activity during the night, at least in nocturnal mice, and that these direct effects of light involve melanopsinergic phototransduction. Currently, lighting systems in animal research facilities are maintained at a standard lower than gave during the “high intensity” condition, a requirement due to the fact that mice are considered photophobic. However, given these findings on sleep homeostasis, mood, and locomotor activity, laboratory mice may actually benefit from an increase in light intensity during the day period, at least in rooms where mice are kept prior to experimentation. From this point of view, the mouse, a nocturnal mammal, and humans which are diurnal, the differences seem much slighter than previously thought, with respect to light. There is still an inverse relationship between light and dark in regards to the direct effects on sleep and wake in nocturnal vs. diurnal animals (Borbely 1976, Benca et al. 1998, Miller et al. 1998, Hubbard et al. 2013). Although, these aberrant and harmful effects on sleep homeostasis during either night or day are the result of light applications outside the appropriate times (e.g. 1-hour light pulse during the dark period) (Campbell et al. 1995, Lupi et al. 2008, Tsai et al. 2009, Legates et al. 2012). In contrast to protocols used by other teams, our bright light paradigm modulates only the intensity of the light period without changing habitual timing of light and dark onset. The strength of this protocol is that it allows us to highlight a direct effect of light on mood and cognition in terms of the functionality of these melanopsin cells, through modulation of the photic intensity without alteration of the application of light (Legates et al., 2012). Conversely, it likely imperative that attention be paid to the physical parameters of the light source in terms of duration, intensity or wavelength, as this seems essential for a

healthy maintenance of sleep homeostasis, irrespective of whether the animal is diurnal or nocturnal. The current study underline an important need for understanding more completely the hypotheses related to both circadian rhythm and mood disorders, and need to take into account the important role that the non-circadian, melanopsinergic phototransduction, plays.

## **References**

1. Altimus CM, Güler AD, Villa KL, McNeill DS, LeGates TA, Hattar S. Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *PNAS*. 2008 Dec 16;105(50):19998–20003.
2. Bedrosian TA, Nelson RJ. Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry*. 2013 Jul;18(7):751–7.
3. Benca RM, Gilliland MA, Obermeyer WH. Effects of lighting conditions on sleep and wakefulness in albino Lewis and pigmented Brown Norway rats. *Sleep*. 1998 Aug 1;21(5):451–60.
4. Benington JH, Heller HC. REM-sleep timing is controlled homeostatically by accumulation of REM-sleep propensity in non-REM sleep. *Am J Physiol*. 1994 Jun;266(6 Pt 2):R1992–2000.
5. Boivin DB. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2000 Nov;25(5):446.
6. Boivin DB, James FO. Light Treatment and Circadian Adaptation to Shift Work. *Industrial Health*. 2005;43(1):34–48.
7. Borbély AA. Sleep and motor activity of the rat during ultra-short light-dark cycles. *Brain Research*. 1976 Sep 17;114(2):305–17.
8. Cajochen C. Alerting effects of light. *Sleep Medicine Reviews*. 2007 Dec;11(6):453–64.

9. Cajochen C, Brunner DP, Kräuchi K, Graw P, Wirz-Justice A. EEG and subjective sleepiness during extended wakefulness in seasonal affective disorder: circadian and homeostatic influences. *Biological Psychiatry*. 2000 Apr 1;47(7):610–7.
10. Campbell SS, Dijk D-J, Boulos Z, Eastman CI, Lewy AJ, Terman M. Light Treatment for Sleep Disorders: Consensus Report III. Alerting and Activating Effects. *J Biol Rhythms*. 1995 Jun 1;10(2):129–32.
11. Chang A-M, Scheer FAJL, Czeisler CA, Aeschbach D. Direct Effects of Light on Alertness, Vigilance, and the Waking Electroencephalogram in Humans Depend on Prior Light History. *SLEEP [Internet]*. 2013 Aug 1 [cited 2014 Apr 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/scd-rproxy.u-strasbg.fr/pmc/articles/PMC3700721/>
12. Datta S, MacLean RR. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2007;31(5):775–824.
13. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1998 Oct 1;275(4):R1127–R1137.
14. Freedman MS. Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science*. 1999 Apr 16;284(5413):502–4.
15. Gooley JJ, Mien IH, Hilaire MAS, Yeo S-C, Chua EC-P, Reen E van, et al. Melanopsin and Rod–Cone Photoreceptors Play Different Roles in Mediating Pupillary Light Responses during Exposure to Continuous Light in Humans. *J Neurosci*. 2012 Oct 10;32(41):14242–53.
16. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod–cone photoreceptive systems



account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. 2003 Jul 3;424(6944):75–81.

17. Hubbard J, Ruppert E, Gropp C-M, Bourgin P. Non-circadian direct effects of light on sleep and alertness: Lessons from transgenic mouse models. *Sleep Medicine Reviews*. 2013 décembre;17(6):445–52.

18. Lall GS, Revell VL, Momiji H, Al Enezi J, Altimus CM, Güler AD, et al. Distinct Contributions of Rod, Cone, and Melanopsin Photoreceptors to Encoding Irradiance. *Neuron*. 2010 May 13;66(3):417–28.

19. LeGates TA, Altimus CM, Wang H, Lee H-K, Yang S, Zhao H, et al. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*. 2012 Nov 22;491(7425):594–8.

20. Lockley SW, Evans EE, Scheer FAJL, Brainard GC, Czeisler CA, Aeschbach D. Short-wavelength sensitivity for the direct effects of light on alertness, vigilance, and the waking electroencephalogram in humans. *Sleep*. 2006 Feb;29(2):161–8.

21. Lucas RJ. Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice. *Science*. 2003 Jan 10;299(5604):245–7.

22. Lupi D, Oster H, Thompson S, Foster RG. The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. *Nat Neurosci*. 2008 Sep;11(9):1068–73.

23. Miller AM, Obermeyer WH, Behan M, Benca RM. The superior colliculus–pretectum mediates the direct effects of light on sleep. *PNAS*. 1998 Jul 21;95(15):8957–62.

24. Mistlberger RE. Circadian regulation of sleep in mammals: Role of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research Reviews*. 2005 Nov;49(3):429–54.

25. Morin LP, Studholme KM. Separation of function for classical and ganglion cell photoreceptors with respect to circadian rhythm

entrainment and induction of photosomnolence. *Neuroscience*. 2011 Dec 29;199:213–24.

26. Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, et al. Melanopsin (Opn4) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2213–6.

27. Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *J Neurosci*. 2000 Jan 15;20(2):600–5.

28. Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, et al. Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2211–3.

29. Savelyev SA, Rantamäki T, Rytkönen K-M, Castren E, Porkka-Heiskanen T. Sleep homeostasis and depression: Studies with the rat clomipramine model of depression. *Neuroscience*. 2012 Jun 14;212:149–58.

30. Shea JL, Mochizuki T, Sagvaag V, Aspevik T, Bjorkum AA, Datta S. Rapid eye movement (REM) sleep homeostatic regulatory processes in the rat: Changes in the sleep–wake stages and electroencephalographic power spectra. *Brain Research*. 2008 Jun 5;1213:48–56.

31. Tsai JW, Hannibal J, Hagiwara G, Colas D, Ruppert E, Ruby NF, et al. Melanopsin as a Sleep Modulator: Circadian Gating of the Direct Effects of Light on Sleep and Altered Sleep Homeostasis in Opn4<sup>-/-</sup> Mice. *PLoS Biol*. 2009 Jun 9;7(6):e1000125.

32. Wirz-Justice A, Graw P, Kräuchi K, et al. Light therapy in seasonal affective disorder is independent of time of day or circadian phase. *Arch Gen Psychiatry*. 1993 Dec 1;50(12):929–37.

## Figures

Condition	Period	Genotype	W (h)	N (h)	R (min)	Total Sleep (h)
<10 lux	12-hours L	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	5.70±0.2 <sup>b,c</sup>	5.38±0.2 <sup>b,c</sup>	54.6±3.4	6.30±0.2 <sup>b,c</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	5.68±0.4 <sup>b,c</sup>	5.15±0.3 <sup>b,c</sup>	69.5±7.2	6.31±0.2 <sup>b,c</sup>
	12-hours D	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	8.26±0.3	3.39±0.3	20.8±1.6 <sup>a,b</sup>	3.74±0.3
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	8.23±0.4	3.33±0.3	26.0±3.2	3.77±0.4
	24-hours	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	14.0±0.4	8.78±0.4	75.4±3.8 <sup>a</sup>	10.0±0.4 <sup>c</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	13.9±0.1	8.50±0.1	95.5±1.2	10.1±0.4 <sup>c</sup>
	L-D Difference	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	-2.55±0.4 <sup>b,c</sup>	1.99±0.4 <sup>b</sup>	33.7±3.5 <sup>a,c</sup>	2.55±0.3 <sup>b</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	-2.54±0.5	1.82±0.5	43.6±6.6 <sup>b,c</sup>	2.54±0.1 <sup>b</sup>
150 lux	12-hours L	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	4.73±0.1 <sup>a,d</sup>	5.97±0.6 <sup>a,d</sup>	78.0±7.7 <sup>d</sup>	7.27±0.7 <sup>a</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	5.77±0.3	4.84±0.2	83.1±6.9	6.23±0.3
	12-hours D	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	7.46±0.1 <sup>d</sup>	3.86±0.2 <sup>d</sup>	40.8±3.6 <sup>d</sup>	4.54±0.1 <sup>d</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	7.80±0.1	3.44±0.1	46.0±0.3	4.20±0.1 <sup>d</sup>
	24-hours	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	12.2±0.9	9.83±0.8 <sup>a</sup>	118.8±4.0	11.8±0.8 <sup>a,d</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	13.6±0.3	8.28±0.2	129.2±7.2	10.4±0.3 <sup>d</sup>
	L-D Difference	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	-2.72±0.1 <sup>d</sup>	2.10±0.4 <sup>a,d</sup>	37.2±11.3 <sup>d</sup>	2.72±0.6 <sup>a,d</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	-2.02±0.3	1.41±0.2	37.1±6.7	2.02±0.3
600 lux	12-hours L	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	6.74±0.2	4.23±0.2 <sup>a</sup>	50.8±7.7	5.08±0.2 <sup>a</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	6.80±0.1	4.73±0.1	58.5±9.5	5.71±0.1
	12-hours D	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	9.86±0.1 <sup>a</sup>	1.89±0.6 <sup>a</sup>	47.8±11 <sup>a</sup>	2.68±0.4 <sup>a</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	8.82±0.1	2.96±0.1	29.9±5.8	3.45±0.1
	24-hours	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	16.6±0.3 <sup>a</sup>	6.12±0.3 <sup>a</sup>	98.6±12	7.76±0.3 <sup>a</sup>
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	15.6±0.1	7.70±0.2	88.4±2.1	8.56±0.1
	L-D Difference	<i>Opn4<sup>+/+</sup></i>	-3.11±0.2 <sup>a</sup>	2.34±0.1 <sup>a</sup>	2.95±5.1 <sup>a</sup>	2.39±0.1
		<i>Opn4<sup>-/-</sup></i>	-2.01±0.1	1.78±0.1	28.6±0.8	2.26±0.2

**Table 1: Time-spent under each vigilance state during baseline 12hL:12hD in various luminance conditions**

### Two-way ANOVA Genotype x Light condition:

SubL: W-  $P_{\text{Light condition}}=0.003$ ; N-  $P_{\text{Light condition}}=0.001$ ; TS-  $P_{\text{Light condition}}=0.004$

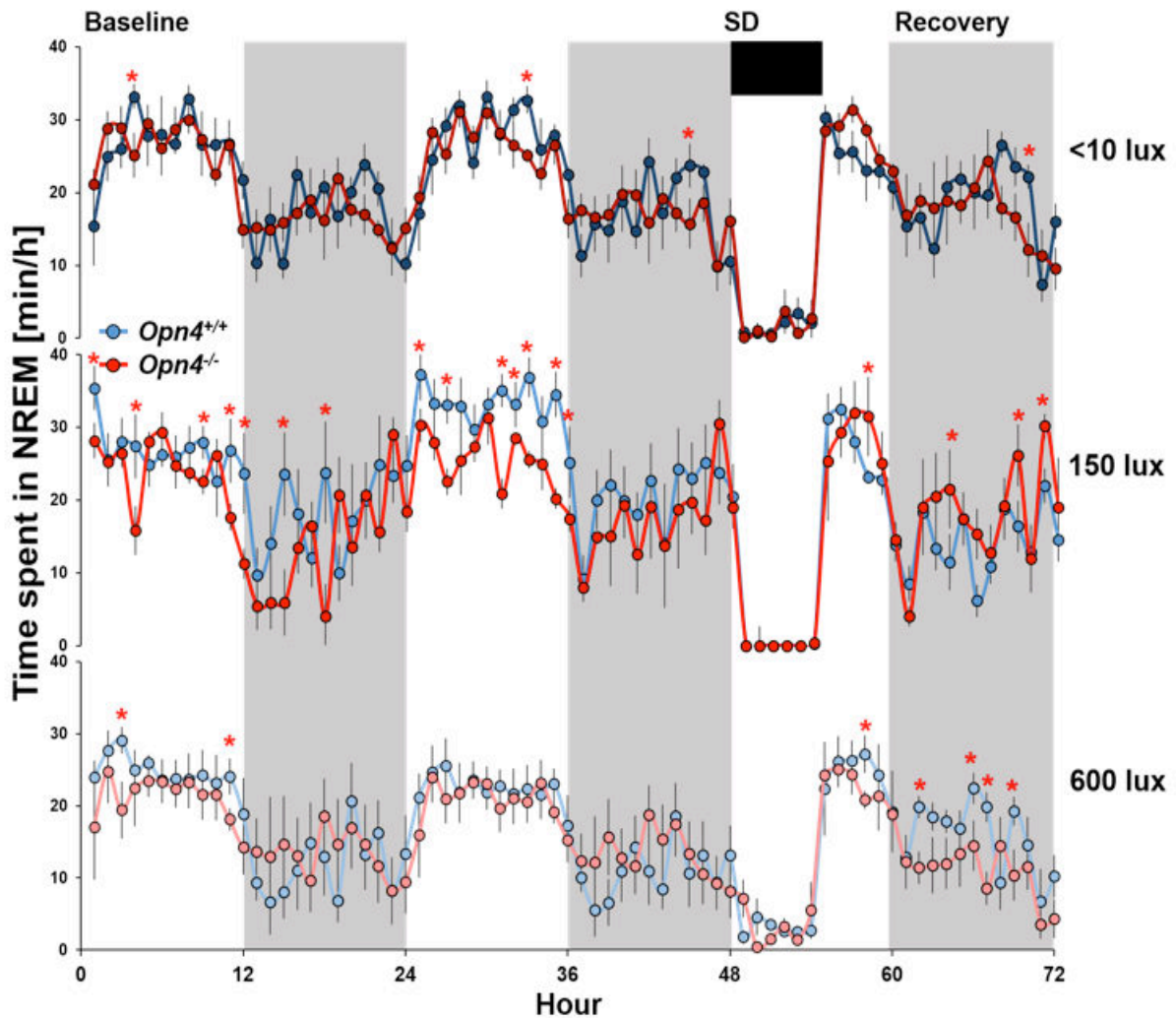
SubD: R-  $P_{\text{Light condition}}=0.004$

24-hr: N-  $P_{\text{Light condition}}=0.04$

LD-Diff: W-  $P_{\text{Light condition}}=0.008$ ; N-  $P_{\text{Light condition}}=0.02$ ; R-  $P_{\text{Light condition}}=0.008$ ; TS-  $P_{\text{Light condition}}=0.007$

### Post-hoc significance:

- <sup>a</sup> Significant genotype differences
- <sup>b</sup> Significant differences between 10 and 150 lux
- <sup>c</sup> Significant differences between 10 and 600 lux
- <sup>d</sup> Significant differences between 150 and 600 lux



**Figure 1: Time-course of NREM sleep during 48 hours of Baseline (12hL:12hD) followed by a 6-hour sleep deprivation (ZT0-6).**

All values represent average  $\pm$  SEM. Red asterisks represent genotype differences observed following post-hoc testing. [ $<10$  lux:  $Opn4^{+/+}$  n=5,  $Opn4^{-/-}$  n=6; 150 lux:  $Opn4^{+/+}$  n=6,  $Opn4^{-/-}$  n=6; 600 lux:  $Opn4^{+/+}$  n=5,  $Opn4^{-/-}$  n=5]

**Baseline time-course [0-48]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{light-condition}=0.04$ ;  $P_{time-course}<0.00001$ ;  $P_{time-course \times light-condition}<0.00001$ ;  $P_{time-course \times genotype}=0.02$ ;  $P_{time-course \times light-condition \times genotype}=0.001$ ;

Post-hoc ( $p<0.05$ ):  $<10$  vs.  $600$   $Opn4^{-/-}$ ;  $<10$  vs.  $600$   $Opn4^{+/+}$ ;  $150$  vs.  $600$   $Opn4^{+/+}$ ;  $Opn4^{+/+}$   $<10$  vs.  $Opn4^{-/-}$   $600$ ;  $Opn4^{+/+}$   $150$  vs.  $Opn4^{-/-}$   $600$

**Following Sleep Deprivation [49-72]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{light-condition}=0.07$ ;  $P_{time-course}<0.00001$ ;  $P_{time-course \times light-condition}<0.00001$

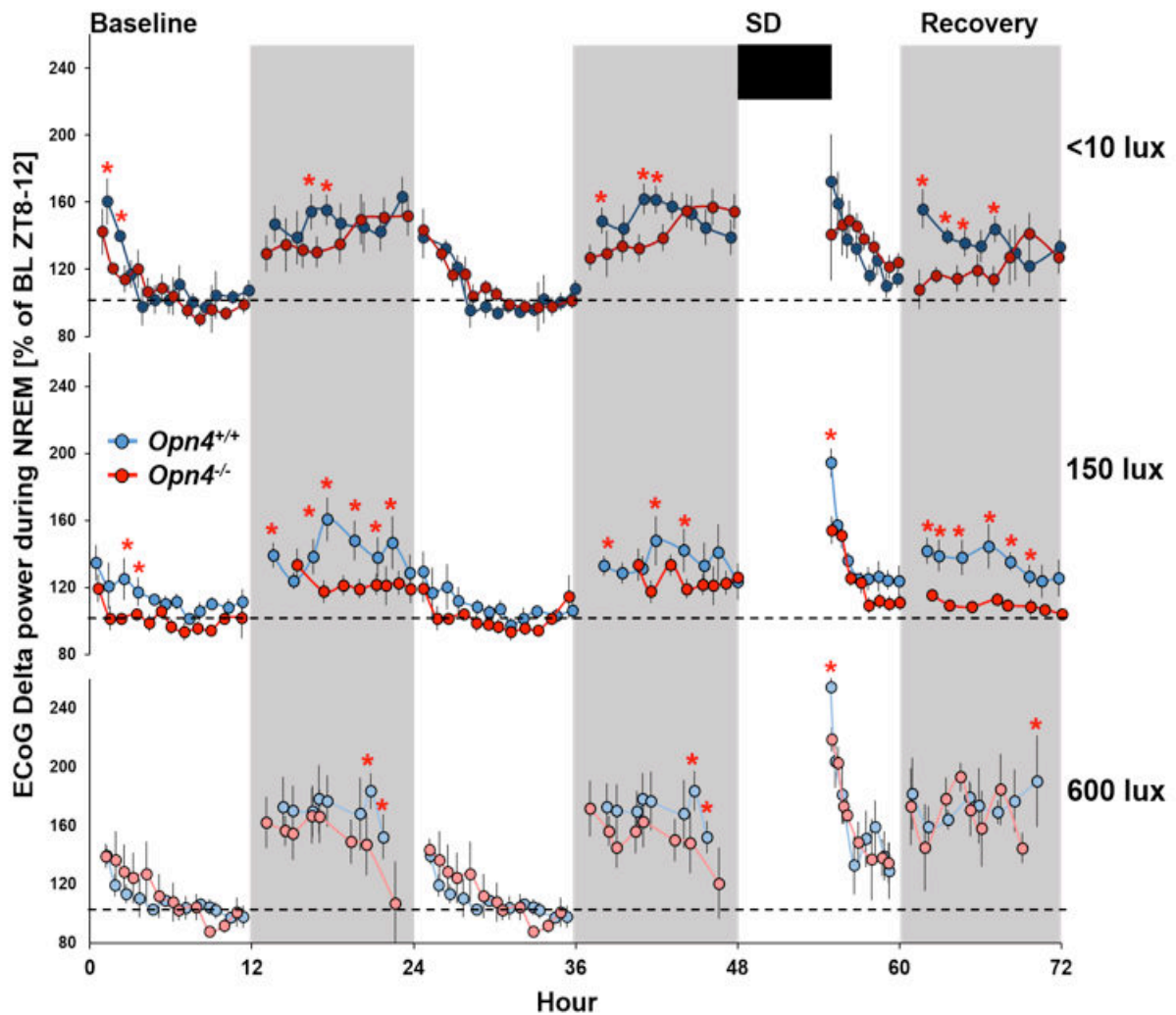
Post-hoc ( $p<0.05$ ):  $<10$  vs.  $600$   $Opn4^{-/-}$ ;  $<10$  vs.  $600$   $Opn4^{+/+}$ ;  $150$  vs.  $600$   $Opn4^{-/-}$ ;  $Opn4^{+/+}$   $<10$  vs.  $Opn4^{-/-}$   $600$ ;

**Overall time-course [0-72]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{light-condition}=0.02$ ;  $P_{time-course}<0.00001$ ;  $P_{time-course \times light-condition}<0.00001$ ;  $P_{time-course \times light-condition \times genotype}=0.001$ ;

Post-hoc ( $p<0.05$ ):  $<10$  vs.  $600$   $Opn4^{-/-}$ ;  $<10$  vs.  $600$   $Opn4^{+/+}$ ;  $150$  vs.  $600$   $Opn4^{+/+}$ ;  $Opn4^{+/+}$   $150$  vs.  $Opn4^{-/-}$   $600$



**Figure 2: ECoG delta power time-course under 2 days of baseline (12hL:12hD), followed by a 6-hour sleep deprivation at light onset (ZT0-6).**

All values represent mean delta power normalized to baseline  $\pm$  SEM. Red asterisks represent genotype differences observed following post-hoc testing. [ $<10$  lux:  $Opn4^{+/+}$  n=5,  $Opn4^{-/-}$  n=6; 150 lux:  $Opn4^{+/+}$  n=6,  $Opn4^{-/-}$  n=6; 600 lux:  $Opn4^{+/+}$  n=5,  $Opn4^{-/-}$  n=5]

**Baseline time-course [0-48]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{time-course} < 0.00001$ ;  $P_{time-course \times genotype} = 0.003$ ;

**Following sleep deprivation [55-72]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{time-course} < 0.00001$

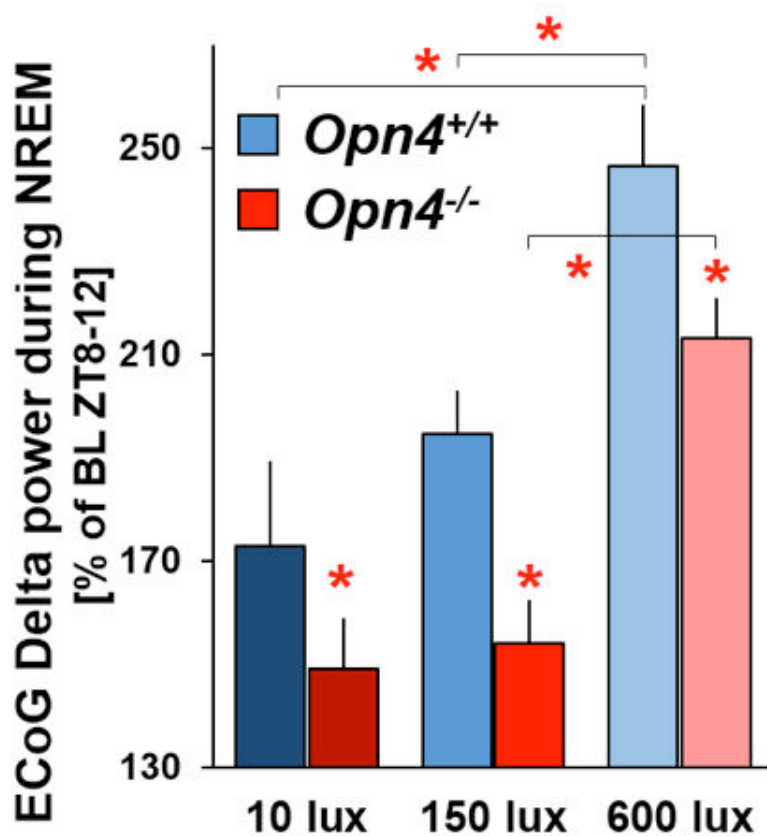


Figure 3: ECoG delta power peak of NREM following a 6-hour sleep deprivation.

Values represent mean delta power (0.5-4 Hz) during NREM sleep expressed as a percentage of the lowest mean delta power during baseline (ZT8-12). Error bars represent SEM. Red asterisks represent genotype and/or light condition differences observed following post-hoc testing. [ $<10$  lux: *Opn4*<sup>+/+</sup> n=5, *Opn4*<sup>-/-</sup> n=4; 150 lux: *Opn4*<sup>+/+</sup> n=5, *Opn4*<sup>-/-</sup> n=6; 600 lux: *Opn4*<sup>+/+</sup> n=4, *Opn4*<sup>-/-</sup> n=4]

2-way ANOVA for factors light condition x genotype:  $P_{light-condition} < 0.0001$ ;  $P_{genotype} = 0.0008$

**Figure 4: Time-course of relative theta and gamma power during wake across the baseline period under different light intensities**

**Theta baseline time-course [0-24]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{\text{Light Condition}}=0.01$ ;  $P_{\text{time-course}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition} \times \text{Genotype}}=0.01$

Post-hoc Light Condition x Genotype-

WT: 150 lux vs 600 p=0.04

KO: 150 lux vs 600 p=0.01

**Theta baseline L vs D [ZT0-12 vs 13-24]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Light/Dark x Time-course-



$P_{\text{Light condition}}=0.001$ ;  $P_{\text{Light vs Dark}}=0.01$ ;  $P_{\text{time-course}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light vs. Dark}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition} \times \text{Light vs Dark}}<0.00001$

### **Gamma baseline time-course [0-24]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Time-course-

$P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition}}<0.00001$

Post-hoc Light Condition x Genotype-

10 lux: WT vs KO  $p=0.07$

### **Gamma baseline L vs D [ZT0-12 vs 13-24]:**

Repeated-Measures ANOVA Light Condition x Genotype x Light/Dark x Time-course-

$P_{\text{Genotype}}=0.03$ ;  $P_{\text{Light vs Dark}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition}}=0.002$ ;

$P_{\text{time-course} \times \text{Light vs. Dark}}<0.00001$ ;  $P_{\text{time-course} \times \text{Light Condition} \times \text{Light vs Dark}}<0.00001$

# **PARTIE 3**

# ROLES RESPECTIFS DES PHOTORECEPTEURS, DES SCN ET DE LA NOCTURNALITE/DIURNALITE DANS LES EFFETS DIRECTS DE LA LUMIERE SUR LE SOMMEIL ET L'ACTIVITE LOCOMOTRICE.

« Les effets directs de la lumière mélanopsinergiques permettent de conserver l'alternance veille/ sommeil d'une souris sans horloge centrale fonctionnelle»

## *Introduction*

Différentes équipes, dont la nôtre ont montré l'importance des effets directs de la lumière sur le sommeil via la phototransduction mélanopsinergique en utilisant un modèle de souris transgéniques *Opn4*. Dans le prolongement de l'étude de ces effets non circadiens, une question restait à approfondir, la part respective des effets circadiens, homéostatiques et mélanospinergique de la lumière dans la régulation et la synchronisation du cycle veille/sommeil. Ainsi, nous avons étudié les effets de la lumière sur le sommeil en utilisant d'une part des souris dotées d'une phototransduction mélanopsinergique invalidée ou non (modèle *Opn4*) et d'autre part des souris, dont la structure (souris avec une lésion du NSC dénommée *SCNx*) ou la fonction ( modèle *Syn10<sup>Cre/Cre</sup> Bmal1<sup>fl/-</sup>* ) des noyaux suprachiasmatiques, sièges de l'horloge centrale, est altérée.(Jeffrey Hubbard, Elisabeth Ruppert, Laurent Calvel, Jessica Tsai, Ludivine Choteau, Mio Frisk, Jana Husse, Gregor Eichele' Paul Franken, Patrice Bourgin. Melanopsin-based direct effects of light maintain a sleep-wake cycle in clock-disabled mice, *en préparation* pour Nature).

## *Article*

**1. TITLE PAGE. Original paper**

**Title: A model to predict how (melanopsin-dependent) lighting shapes the sleep-wake cycle**

**Short title: Light shapes the sleep-wake cycle**

Authors and affiliations: Jeffrey Hubbard<sup>1,2</sup>, Elisabeth Ruppert<sup>1,2</sup>, Mio Frisk<sup>1,2</sup>, Jessica Tsai<sup>3</sup>, Ludivine Robin-Choteau<sup>1,2</sup>, Jana Husse<sup>4</sup>, Laurent Calvel<sup>1,2</sup>, Gregor Eichele<sup>4</sup>, Paul Franken<sup>5</sup>, Patrice Bourgin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CNRS-UPR 3212, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Sleep Disorders Center, CHU and FMTS, University of Strasbourg, France

<sup>3</sup> Department of Biology, Stanford University, Stanford, California, USA

<sup>4</sup> Max Planck Institute for Genetics, Gottingen, Germany

<sup>5</sup> Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, 1015 Lausanne-Dorigny, Switzerland

\* Corresponding address: Patrice Bourgin, MD, PhD

CNRS UPR 3212, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, 5 rue Blaise Pascal; and Sleep Disorders Center, 1 place de l'hôpital, CHU and FMTS, 67000 Strasbourg, France.

Tel: +33 3 88116430, Fax: + 33 3 88 11 51 53 email: pbourgin@unistra.fr

This work was performed at the Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg, France

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial support: This study received financial support from ADIRAL.

Tables and Figures: 3 Figures, 2 supplemental tables, 4 supplemental figures, extended material and methods section

Keywords: direct effects of light, sleep regulation, direct photic light, melanopsin, mice, Synaptotagmin10-Cre

Word count: Main text = 2443; Introductory paragraph = 292; References =22

## **2. MAIN MANUSCRIPT:**

### ***Introductory Paragraph:***

Evolutionary conservation suggests that timing physiology and behavior to Earth's light/dark cycle is critical to the survival of most species. This rhythmic expression is driven by the circadian process (C) generated by the primary clock located in the suprachiasmatic nucleus (SCN)<sup>1</sup>. Light entrains the circadian pacemaker, synchronizing the sleep-wake cycle to the time of day (CL: circadian effect of light). Light also exerts a direct clock-independent effect (DL: direct effect of light), which has been the subject of growing interest since the discovery of melanopsin (Opn4), a photopigment crucial for conveying non-image forming light to the brain<sup>2,3</sup>.

As CL and DL, are difficult to disentangle, it remains unknown whether and to which degree DL shapes the sleep-wake cycle<sup>4-8</sup>. Here we quantified for the first time, the contribution of each component by studying EEG in SCN- and melanopsin-disabled mice. Sleep reactivity to an ultradian hourly light/dark cycle (LD1:1) and to a standard 12-hour light/12-hour dark regimen (LD12:12) was diminished in clock- or melanopsin-disabled mice, and abolished in animals lacking both. Our results suggest that CL shapes about half of the 24-hour sleep-wake cycle, with DL being responsible for the other half, mediated mostly by Opn4-based phototransduction. Furthermore, our findings show that the SCN is not only a clock but also mediates close to 50% of DL, and is critical for the alerting effects of darkness in nocturnal mice. We portray our results in a model integrating the respective contributions of the main phototransduction pathways regulating the natural sleep-wake cycle, which, contrary to previous belief, attributes a critical role to DL. The model was successfully applied to the LD1:1, suggesting that this rationale could be used to predict the

shape of the sleep-wake cycle in the perturbing lighting conditions commonly experienced in modern society.

**Main text:**

In modern society, we have come to rely less and less on Earth's natural light/dark cycle. As a result, we increasingly see alterations in sleep-wake architecture leading to circadian disorders, insomnia, daytime somnolence, mood alteration, and poorer cognitive performance<sup>9,10</sup>. This points to the need for a better understanding of the photic regulation of physiology and behavior. Non-visual rod/cone- and Opn4-based photic information is signaled to the brain through a subset of retinal ganglion cells rendered intrinsically photosensitive through Opn4 expression<sup>11,12</sup>. These cells project to the SCN, entraining the clock, but also to other structures directly controlling vigilance states such as the sleep-promoting neurons of the ventrolateral preoptic area (VLPO)<sup>11,12</sup>.

Here we have dissected the photic regulation of sleep by studying EEG in SCN- and melanopsin-disabled mice under various light/dark regimens in order to determine the respective contribution of each component (CL vs. DL, melanopsin vs. rods/cone based photoreception, SCN vs. non-SCN brain relays). SCN and clock disablement was achieved through: 1) lesioning of the SCN (SCNx), and 2) a novel transgenic mouse model ( $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{-/-}$ ) characterized by a functional invalidation of the clock with a structurally intact SCN<sup>13</sup>. The use of both models controls for lesion-induced structural damages as well as for the limitations associated with transgenesis. Additionally, the contribution from melanopsin and rods/cones was distinguished using SCNx mice lacking Opn4 ( $Opn4^{-/-}$ )<sup>14</sup>.

Both models were arrhythmic regarding sleep and locomotor activity under constant darkness (DD), confirming the efficacy of clock disablement. In addition, as lesioning

of the SCN generates structural damages, we verified the complete conservation of retinal projections to non-SCN structures using the anterograde fiber tracer, cholera toxin subunitB (CtB) (Fig. 1a). Moreover, immunostaining with arginine vasopressin (AVP), a marker of SCN output<sup>15</sup>, and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a marker of cell nuclei, confirmed the complete destruction of the SCN while sparing surrounding areas (Fig. 1a).

To assess SCN functioning in  $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{fl/-}$  mice, we quantified c-Fos, a marker of neuronal activation, in response to a 1-hour light pulse administered during the dark period (ZT15-16) when light-induced c-Fos immunoreactivity and phase delay of circadian rhythms in locomotor activity are maximal.  $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{fl/-}$  mice showed a severely diminished light-induced c-Fos expression compared to their controls ( $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{fl/-}$  and WT), indicating the lack of reactivity of SCN neurons to light (Fig. 1b). Moreover, immunoreactivity of AVP was absent in the DAPI-stained SCN cells of the  $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{fl/-}$  mice, despite a normal distribution in surrounding areas, further confirming SCN-disablement (Fig.1b)<sup>15</sup>.

Acute administration of light is known to promote sleep in mice and other nocturnal species whereas dark pulses promote wake<sup>6</sup>. To examine the acute influence of DL and its interaction across the day with C, we subjected all experimental groups to an ultradian 1-hour light : 1-hour dark (LD1:1) cycle applied continuously over 24 hours (Fig. 2a). All control groups (wild-type;  $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{+/-}$ , Sham-lesioned  $Opn4^{+/+}$ ), showed a response correlating with previous literature (Fig 2; Supplementary Fig. 1, Supplementary Table 1, 2)<sup>8</sup>. A comparison of the reactivity to LD1:1 among the experimental groups allowed us to extrapolate the influence of each of the above named components. The greater reactivity to photic stimulus in controls compared to SCNx and  $Syn10^{Cre/Cre}Bmal1^{fl/-}$  demonstrates that the SCN plays a critical role in



mediating DL, especially during the subjective dark period (ZT12-24, i.e. the 12-hour dark phase of the preceding days) (Fig. 2b). Furthermore, the time-course analysis of EEG theta and gamma, correlates of exploratory behavior and alertness<sup>16-18</sup>, indicate that the SCN is a crucial mediator of the alerting effects of darkness in a nocturnal mouse (Fig. 2c). The comparison of results obtained from *Opn4* transgenic mice and controls indicate that both rods/cones and *Opn4* relay DL, with an *Opn4* dominance during the subjective dark and rod/cone dominance during the subjective light, a likely explanation for the greater effect of DL during the subjective light period. This is further supported by the 24-hour cyclic expression of melanopsin, suggesting that the circadian process modulates D throughout the day<sup>19,20</sup>.

In humans, light is known to acutely promote alertness, waking EEG, and cognition, with the highest efficiency being blue light centered around 460-480nm, within the spectral response peak of melanopsin<sup>10</sup>. Here, in mice under LD1:1, the wake promoting effect of darkness was associated with a rapid and prolonged induction of EEG theta (7–10 Hz) and gamma (40–70 Hz) activity (Fig. 2c, Supplementary Fig. 3) over the course of all 1h-dark pulses. This alerting effect of darkness, which was observed at all times of the day, was attenuated though not abolished in melanopsin-disabled mice, suggesting that it is mostly mediated by *Opn4* but also to some extent by rod-cone-based photodetection. In addition, we studied the dark-associated theta and gamma activities in SCNx and *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal<sup>fl/-</sup>* mice, which produced some remarkable observations. These EEG markers of alertness were dramatically decreased in both SCN-abolished models, both during the dark pulses of LD1:1 (Fig. 2c, Supplementary Fig. 3) as well as in the 12h-dark period of LD12:12 (Supplementary Fig. 4). This finding indicates that the alerting effect of darkness in nocturnal animals is mostly signaled by the SCN, a structure known to influence,

albeit indirectly, activity in the hippocampus, a center for cognition and theta/gamma rhythm generation<sup>21</sup>. Thus, we can speculate that Opn4-signaling and the SCN signifies an essential neuronal substrate of the alerting effect of light in humans, with this pathway representing a framework for the further understanding of the powerful influence of light on arousal systems and cognition.

Under a standard 12-hour light/12-hour dark condition (LD12:12), mice express a cyclic sleep-wake pattern with a 24-hour period and an amplitude representing the difference in sleep/wake amounts between the light and dark phases. It has generally been assumed that a primary clock is necessary for maintaining this cycle, with light cues playing a role in adjusting the clock to match Earth's light/dark cycle. The homeostatic process in this condition does not affect the overall period or amplitude of the sleep-wake cycle as the mice are not sleep deprived, housed in single cages, with food and water provided ad libitum. Thus the animals are allowed to follow their natural napping pattern throughout the protocol, and therefore do not build up a homeostatic sleep need over a longer period. As a mouse naps frequently, this parallels, in humans, the multiple nap protocol in which the homeostatic process averages to zero<sup>22</sup>. Given the significance of the aforementioned acute photic regulation of sleep observed at all times of the day, we examined whether DL is sustained over each 12-hour lighting period to uphold a 24-hour organization of the sleep-wake cycle. To do this, we analyzed the amplitude of the cycle under LD12:12 to determine whether DL, even in the absence of a circadian system, is capable of maintaining a significant sleep/wake amplitude (Fig. 3c).

The amplitude of the sleep-wake cycle in the Sham-lesioned Opn4<sup>+/+</sup> mice was about 2.5 hours (Fig. 3c). Amplitudes of the experimental groups were decreased, with

degree of reduction determined by the removal of phototransductive components. Comparison of the amplitudes among the experimental groups allowed us to isolate and quantify the contribution of all but two of the components to the sleep-wake cycle, as this method does not give us the respective contributions of DL mediated by rod/cone phototransduction via the SCN and CL. Therefore, we calculated the amplitude of the sleep-wake cycle of WT and *Opn4*<sup>-/-</sup> mice obtained under DD, i.e. a condition lacking DL (Fig. 3b). This isolates CL, the circadian drive entrained by the LD12:12 condition of the preceding days. CL was similar in both genotypes, indicating that it is not significantly affected by the loss of *Opn4*. This is coherent with previous observations based on actimetry that in the absence of *Opn4*-based phototransduction, entrainment of CL is largely compensated by rods and cones<sup>14</sup>. Thus, we conclude that the curtailed magnitude of the sleep-wake cycle in *Opn4*<sup>-/-</sup> mice under LD12:12 results from a loss of DL and is not due to altered circadian output.

Our results can be summarized in a model illustrating the contribution of each component in the determination of the sleep-wake cycle, compiling to CL and DL (Fig. 3d). According to our model, DL is responsible for about 45% of the amplitude of the sleep-wake cycle, meaning that rather than just a “masker” of CL, DL plays a significant, and likely even equivalent role to CL in the shaping of the daily sleep-wake pattern. The calculations shown here are based on values of NREM, but the same distribution between CL and DL is observed in wake and REM (Supplementary Table 1, 2). Furthermore, we have also broken down the roles which *Opn4* and rods/cones play in transmitting the direct effects of light, and found that *Opn4*-based phototransduction is responsible for the majority of DL, with rods/cones playing a minor role. These results corresponded with the distribution obtained with a second

mode of calculation based on the isolation of CL from DL in melanopsin-disabled animals and their controls, reinforcing the accuracy of our data (Supplementary Table 1, 2). In addition to the finding that DL is responsible for about half of the shaping of the sleep-wake pattern, we find, through experiments with SCN-invalidated animals and controls, that the SCN is responsible for mediating about half of DL. This means that the SCN, in addition to modulating CL, has an auxiliary function in the formation of the sleep-wake pattern. This finding was also confirmed with nearly identical results obtained through two independent approaches: the use of both SCNx and  $\text{Syn10}^{\text{Cre/Cre}}\text{Bmal}^{\text{fl/-}}$ , which control for each other.

If the sleep-wake cycle is represented as in our model (Fig. 3d), two wave-like curves resulting from DL and CL added together, one can imagine that a lack of temporal coordination between the two would result in a decreased overall amplitude of the sleep-wake cycle. This possibly corresponds to disturbances observed in jet-lag or seasonal changes in photoperiod and suggests that our model can predict the amplitude of the sleep-wake cycle in these and other altered lighting conditions. Here we test the predictive power of our model by anticipating and verifying the amplitude of the sleep-wake cycle in the LD1:1 condition. In this condition, the 1-hour light/dark pulses result in acute changes in vigilance state, but as there are 24 pulses, these acute changes based on lighting condition should average to about zero. Thus, by taking the difference between the average sleep amounts in the subjective light and dark, we get the amplitude of a sleep-wake cycle lacking DL (Supplementary Table 1, 2). According to our model, this amplitude of CL should be about 55% of the amplitude of the sleep-wake cycle under standard conditions in wild-type animals. Our calculations indicate that the amplitude of the sleep-wake cycle in the LD1:1 condition, and thus the amplitude resulting solely from CL, is 50% and 52% of the

amplitude observed in the LD12:12 condition of the two wild-type control groups. Remarkably, this is within 3-5 percentage points of the expected value, even though the LD1:1 is an extreme lighting condition far from anything observed in a natural scenario.

There are, however, certain limitations to the model as the shaping of the sleep-wake cycle cannot be as simple as adding two components together. Our model does not take into account the kinetics of the sleep-wake cycle, as DL interacts with the circadian system and varies across the 24-hour day as seen in the LD1:1 condition described above. Moreover, in the LD12:12, we consider DL as the compilation of an acute effect, coming with the change in lighting (acute DL) and a 12-hour sustained effect (sustained DL). This is highlighted in the LD1:1 condition, where there are 12 light/dark pulses, and thus acute DL is overrepresented. Thus, changes in vigilance state observed with each 1-hour light/dark pulse is greater than the 45% of the sleep-wake cycle expected from our model.

Our findings challenge the current understanding of the photic regulation of the natural sleep-wake cycle. Here we reveal that CL determines only about half of this regulation, with DL, half of which actually is relayed by the SCN, being as critical a mechanism. In fact, DL is even capable of compensating for the absence of a clock-driven influence to help maintain a sleep-wake cycle timed with the external light/dark cycle. This is a natural temporal coordination essential for proper behavior and body function, but can also be used to generate a pseudo-clock to treat circadian sleep rhythm disorders. Our model integrating the respective contributions of the main phototransduction pathways regulating the natural sleep-wake cycle and could provide an explanation for the physiological and behavioral disturbances induced by exposure to the aberrant light observed in our modern society as well as predict the

shape of the sleep-wake cycle under varying lighting conditions. Concretely, it could be useful for improving our management of circadian sleep rhythm disorders including jet-lag, night work associated disturbances, and seasonal perturbations commonly observed at extreme latitudes and should also be considered in the development of optimal societal lighting.

### **Methods Summary:**

Animals: All experiments were performed on young adult male mice using 1) *Opn4*<sup>-/-</sup> and wild-type littermate controls<sup>8</sup> and 2) *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup>, animals rendered arrhythmic through a conditional deletion of the clock gene *Bmal1* in the SCN using a *Syn10*Cre driver<sup>13</sup>. The *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> animals were compared to *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>+/-</sup> to control for the “floxed” *Bmal1* allele as well as to WT mice. To control for both the Cre driver and the heterozygosity of *Bmal1*, we verified that *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>+/-</sup> and WT mice displayed similar EEG and sleep-wake patterns. The experiments were supervised by a veterinarian and approved by the ethical committees for animal research at the University of Strasbourg and CNRS.

Surgery: All mice were implanted with a classical set of electrodes for EEG/EMG recordings. Electrolytic lesions of the SCN (SCNx) under stereotactic conditions were also performed in *Opn4*<sup>(-/-)</sup> and their controls (the electrode was lowered into brain without the application of electrical current in Sham-lesioned animals).

Recordings: General activity was monitored under DD to confirm the loss of circadian rhythmicity in SCNx and *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> animals. Sleep and the EEG were analyzed under 3 different lighting schedules LD12:12 cycle, LD1:1 cycle applied for 24-hours and under DD for a subgroup of animals.

Anatomy: To control for SCN lesion size and conservation of retino-cerebral projections, immunohistochemistry was used in SCNx and Sham-lesioned animals to stain AVP, DAPI and CtB which was previously injected into the posterior chamber of the eyes. To evaluate SCN reactivity to light in *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> and their controls, c-Fos expression was quantified in the SCN with AVP and DAPI co-staining following a 1-hour light pulse administered at ZT15 (no light pulse for controls).

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

### 3. FIGURES

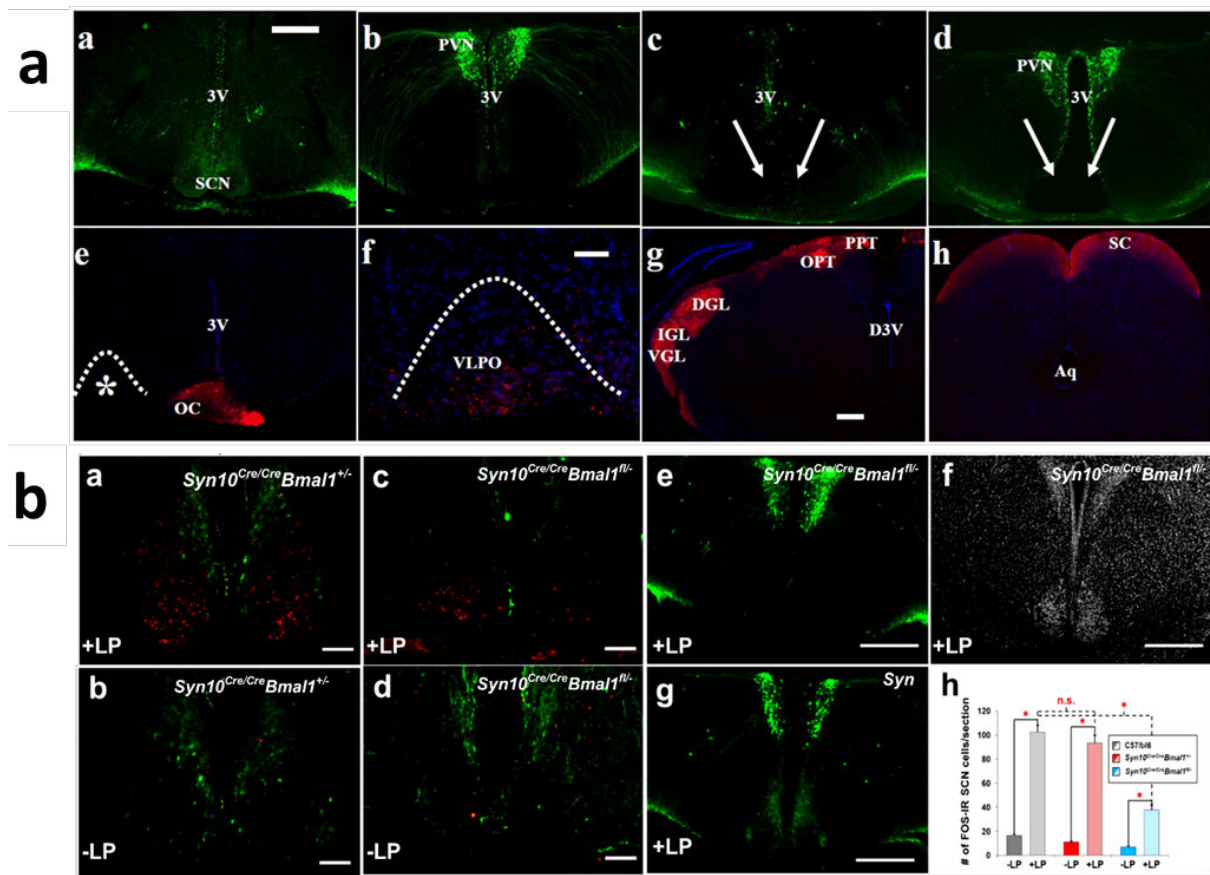


Figure 1:

(a) Anatomic control of SCN lesion and preservation of retinal projections to the brain  
 Top: Coronal sections at the mid (a, c) and caudal (b, d) level of the SCN in a Sham-lesioned mouse (a-b) and SCN-lesioned mouse (c-d) stained for AVP (green), a marker expressed in the SCN (shell). Note the complete removal of both SCNs, yet small lesion size. Bottom: Distribution of retinal projections to the brain: Staining of cholera toxin subunit b (CtB-red) and DAPI (blue) in an SCN-lesioned mouse at the level of the (e) Optic chiasm; (f) VLPO (Enlargement of VLPO fibers from \* in e); (g) geniculate leaflets (DGL, IGL, VGL), and pretectal nuclei (OPT, PPT) and (h) superior colliculus (SC). Retinal fiber tracing via CtB shows an intact system following SCN-lesion with fibers through the optic chiasm reaching areas of lower innervation but critical for sleep regulation such as the VLPO as well as the brain targets known to



be densely innervated (DGL, IGL, VGL, OPT, PPT, SC). Scale bars in (a-e) indicate 500 $\mu$ m, in (f) 20 $\mu$ m and in (g-h) 400 $\mu$ m.

(b) Lack of SCN-mediated photic signaling in Syn10Cre/CreBmal1<sup>fl/-</sup> mice

(a-d): Effects of a 1-hour light pulse (LP) administered during the dark period (ZT15-16) (a,c) on c-Fos immunoreactivity in the SCN. Similar light-induced c-Fos immunoreactivity (red) in the retino-recipient zone of the SCN in Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>+/-</sup> (a) and WT (data not shown). The number of Fos-positive SCN neurons is dramatically reduced in Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup> mice (c) and in control condition (no light-pulse, b,d). AVP immunoreactivity (a-e, g, green) in the SCN is preserved in Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>+/-</sup> (a,b,g, comparable to WT, data not shown), but not in Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup> mice in which AVP staining remains unaltered in adjacent regions (c-e) and whereas the SCN remains structurally intact as shown by DAPI-staining (grey) (f). Scale bars: 100 $\mu$ m in a-d; 500 $\mu$ m in e-g. (h) Number of c-Fos immunoreactive SCN neurons after a 1-hour LP. (Two-way ANOVA;  $P_{\text{light pulse}} \leq 0.001$ ;  $P_{\text{genotype}} \leq 0.001$ , post hoc t-test: \* $P < 0.05$ ). No differences between both controls (Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>, WT). Sham Opn4<sup>+/+</sup> n=5; Sham Opn4<sup>-/-</sup> n=5; SCNx Opn4<sup>+/+</sup> n=5; SCNx Opn4<sup>-/-</sup> n=5; Wild-type n=6; Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>+/-</sup> n=8; Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup> n=6.

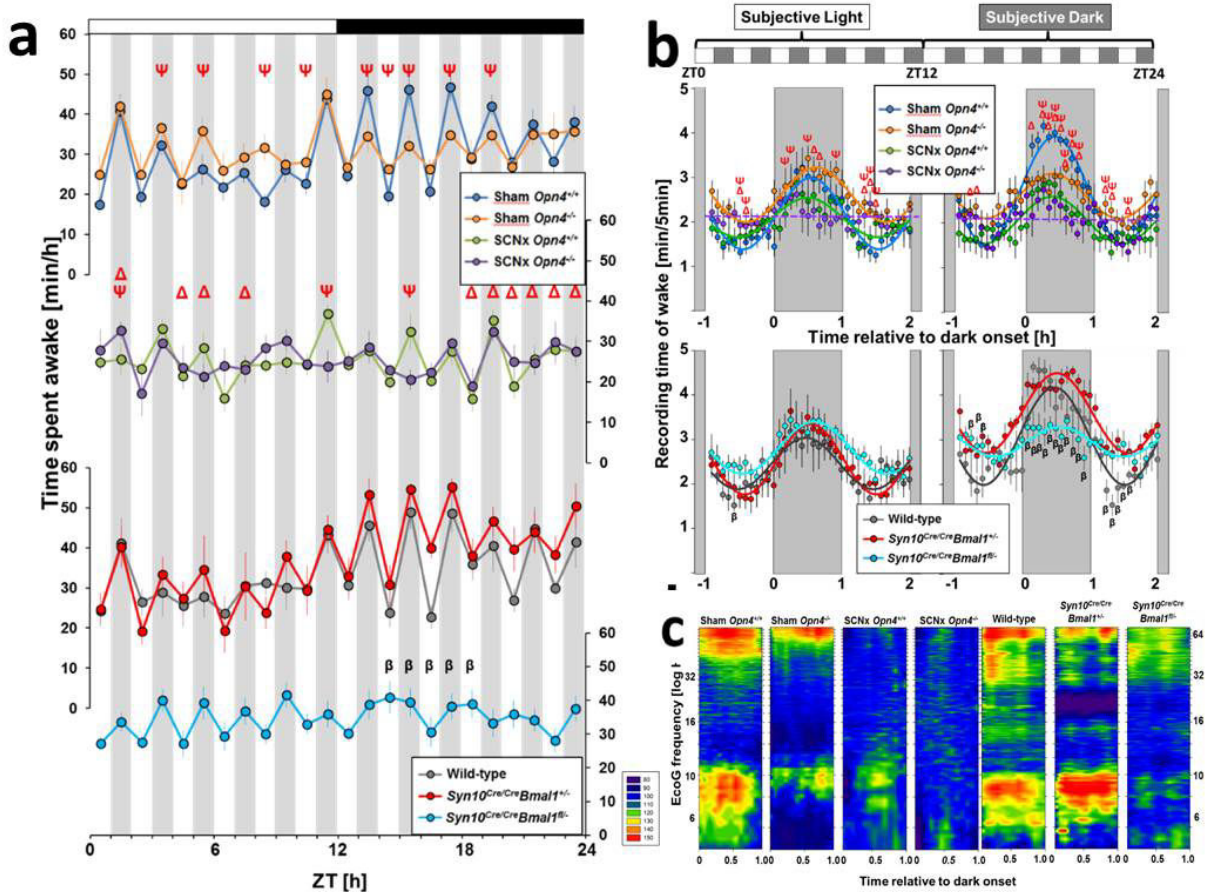


Figure 2: The SCN contributes to the direct photic regulation of sleep and waking signaled by melanopsin- and rod/cone-based photodetection

(a) Experimental protocol: LD1:1 pulses repeated over 24-hours. Average time-course of changes in wake (W) during the 12-h subjective light (left) and subjective dark (right) period. Values represent means ( $\pm$ SEM) over 5-min intervals in the hour preceding, during, and following the six 1-h dark pulses. In controls (Sham-lesioned *Opn4*<sup>+/+</sup>, *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>+/-</sup> and Wild-type) light pulses promoted N (Supplementary Table 1, 2) whereas dark pulses increased W; an effect that was greater during the subjective dark period (top: four-way ANOVA,  $P_{\text{time-course}} < 0.0001$ , bottom: three-way ANOVA,  $P_{\text{time-course}} = 0.003$ ). Reactivity was significantly attenuated in the absence of melanopsin ( $P_{\text{genotype}} = 0.003$ ) or of a functional SCN (SCNx *Opn4*<sup>+/+</sup>:  $P_{\text{SCN-condition}} = 0.004$ ; *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup>:  $P_{\text{genotype}} = 0.004$ ) and abolished in mice lacking

both (SCNx Opn4<sup>-/-</sup>,  $P_{\text{genotype} \times \text{SCN-condition}}=0.04$ ). Red Psi (top) and beta (bottom) symbols indicate significant genotype differences and delta (top) SCN-condition differences ( $P < 0.05$ ; post hoc t-tests). Corresponding sine waves represent best fits to the data points. For representation of the hourly time course, see Supplemental Fig. 1. (b) NREM differences between the two surrounding light pulses and inclusive dark pulse were quantified and averaged for all 1-hour pulses across the 24-hour period, representing the amplitude of reactivity. The photic regulation of sleep is attenuated by about half in animals lacking melanopsin (two-way ANOVA,  $P_{\text{genotype}}=0.004$ ) or a functional SCN (SCNx Opn4<sup>+/+</sup>,  $P_{\text{SCN-condition}}=0.009$ ; Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>, ANOVA,  $P < 0.019$ ) and flattened in the absence of both (not significantly different from zero, one-sample signed rank test,  $P=0.48$ ). (post-hoc t-tests, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ). Sham Opn4<sup>+/+</sup> n=9; Sham Opn4<sup>-/-</sup> n=7; SCNx Opn4<sup>+/+</sup> n=10; SCNx Opn4<sup>-/-</sup> n=8; Wild-type n=7; Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>+/-</sup> n=6; Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup> n=8.



24-hours of DD, expressed as the L-D difference in NREM between subjective light and subjective dark periods, is abolished in  $\text{Syn10}^{\text{Cre/Cre}}\text{Bmal1}^{\text{fl/-}}$  but not in either control groups ( $P_{\text{genotype}} = 0.005$ ). (d) Magnitude of the sleep-wake cycle (expressed as in Fig. 1a) is decreased in absence of melanopsin (two-way ANOVA,  $P_{\text{genotype}} < 0.001$ ), reduced in the same proportions in both SCN-disabled models ( $\text{SCNx Opn4}^{+/+}$ ,  $P_{\text{SCN-condition}} = 0.002$ ;  $\text{Syn10}^{\text{Cre/Cre}}\text{Bmal1}^{\text{fl/-}}$ , ANOVA,  $P < 0.001$ ) and abolished in absence of both (not significantly different from zero, one-sample signed rank test,  $P = 0.22$ ). (e) Schema representing the respective contribution of the different pathways by which the daily light-dark cycle shapes the 24-hour temporal organization of sleep and waking. Calculations based upon inter-group differences according to data in d (for detailed calculations see extended materials). The Opn4-mediated direct phototransduction accounts for one third of the sleep-wake cycle, independently of the clock influence. Mean  $\pm$  SEM. Sham  $\text{Opn4}^{+/+}$  n=9; Sham  $\text{Opn4}^{-/-}$  n=7;  $\text{SCNx Opn4}^{+/+}$  n=10;  $\text{SCNx Opn4}^{-/-}$  n=8; Wild-type n=7;  $\text{Syn10}^{\text{Cre/Cre}}\text{Bmal1}^{+/+}$  n=7;  $\text{Syn10}^{\text{Cre/Cre}}\text{Bmal1}^{\text{fl/-}}$  n=10. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , post-hoc t-tests.

#### **4. REFERENCES**

1. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941 (2002).
2. Gooley, J. J., Lu, J., Chou, T. C., Scammell, T. E. & Saper, C. B. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat. Neurosci.* 4, 1165 (2001).
3. Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M. & Yau, K. W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070 (2002).
4. Altimus, C. M. et al. Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 105, 19998-20003 (2008).
5. Cajochen, C., Chellappa, S. & Schmidt, C. What keeps us awake? The role of clocks and hourglasses, light, and melatonin. *Int. Rev. Neurobiol.* 93, 57-90 (2010).
6. Hubbard, J., Ruppert, E., Gropp, C. M. & Bourgin, P. Non-circadian direct effects of light on sleep and alertness: lessons from transgenic mouse models. *Sleep Med. Rev.* 17, 445-452 (2013).
7. Lupi, D., Oster, H., Thompson, S. & Foster, R. G. The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. *Nat. Neurosci.* 11, 1068-1073 (2008).
8. Tsai, J. W. et al. Melanopsin as a sleep modulator: circadian gating of the direct effects of light on sleep and altered sleep homeostasis in *Opn4*(*-/-*) mice. *PLoS Biol.* 7, e1000125 (2009).
9. Stephenson, K. M., Schroder, C. M., Bertschy, G. & Bourgin, P. Complex interaction of circadian and non-circadian effects of light on mood: shedding new light on an old story. *Sleep Med. Rev.* 16, 445-454 (2012).

10. Vandewalle, G., Maquet, P. & Dijk, D. J. Light as a modulator of cognitive brain function. *Trends Cogn. Sci.* 13, 429-438 (2009).
11. Hannibal, J. & Fahrenkrug, J. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 316, 99-113 (2004).
12. Hattar, S. et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326-349 (2006).
13. Husse, J., Zhou, X., Shostak, A., Oster, H. & Eichele, G. Synaptotagmin10-Cre, a driver to disrupt clock genes in the SCN. *J. Biol. Rhythms* 26, 379-389 (2011).
14. Ruby, N. F. et al. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211-2213 (2002).
15. Jin, X. et al. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57-68 (1999).
16. Buzsaki, G. & Moser, E. I. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat. Neurosci.* 16, 130-138 (2013).
17. Herrmann, C. S., Munk, M. H. & Engel, A. K. Cognitive functions of gamma-band activity: memory match and utilization. *Trends Cogn. Sci.* 8, 347-355 (2004).
18. Wang, X. J. Neurophysiological and computational principles of cortical rhythms in cognition. *Physiol. Rev.* 90, 1195-1268 (2010).
19. Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P. & Fahrenkrug, J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J. Mol. Neurosci.* 27, 147-155 (2005).
20. Sakamoto, K. et al. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3129-3136 (2005).

21. Ruby, N. F. et al. Hippocampal-dependent learning requires a functional circadian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 15593-15598 (2008).
22. Knoblauch, V. et al. Age-related changes in the circadian modulation of sleep-spindle frequency during nap sleep. *Sleep* 28, 1093-1101 (2005).



## 5. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1: Time spent asleep and awake under the LD 12 : 12 and LD

1 : 1 schedules in SCN lesioned *Opn4*<sup>-/-</sup> mice and their controls

Schedule	Time Spent	Condition	<i>Opn4</i> Genotype	Waking (h)	NREMS (h)	REMS (min)
12h:12h LD	12-h light period	Sham	+/+	4.06±0.08	6.46±0.13	88.7±3.9
			-/-	5.48±0.48 <sup>a</sup>	4.99±0.45 <sup>a</sup>	91.8±3.1
		SCNx	+/+	4.51±0.21 <sup>D</sup>	6.42±0.17 <sup>D</sup>	64.1±2.4 <sup>D</sup>
			-/-	4.83±0.14 <sup>D</sup>	6.22±0.12 <sup>D</sup>	56.8±4.1 <sup>D</sup>
	12-h dark period	Sham	+/+	7.41±0.26 <sup>C</sup>	4.00±0.23 <sup>C</sup>	34.8±3.8 <sup>C</sup>
			-/-	7.80±0.29 <sup>C</sup>	3.44±0.25 <sup>C</sup>	46.0±3.7 <sup>C</sup>
		SCNx	+/+	5.23±0.23 <sup>D,C</sup>	5.85±0.19 <sup>D,C</sup>	55.2±3.1 <sup>D,C</sup>
			-/-	4.92±0.28 <sup>D</sup>	6.10±0.11 <sup>D</sup>	58.7±5.4 <sup>D</sup>
	24 h	Sham	+/+	11.47±0.37	10.47±0.39	123.5±7.7
			-/-	13.3±0.70 <sup>a</sup>	8.43±0.66 <sup>a</sup>	137.8±5.3
		SCNx	+/+	9.74±0.31 <sup>D</sup>	12.27±0.23 <sup>D</sup>	119.3±4.5
			-/-	9.75±0.28 <sup>D</sup>	12.32±0.22 <sup>D</sup>	115.5±8.7
1h :1h LD	Subjective 12-h light period	Sham	+/+	5.29±0.19	5.73±0.22	59.0±7.6
			-/-	6.25±0.44 <sup>a</sup>	4.79±0.33 <sup>a</sup>	56.9±9.0
		SCNx	+/+	5.12±0.15	6.03±0.14	50.8±2.6
			-/-	5.10±0.18 <sup>D</sup>	6.03±0.17 <sup>D</sup>	51.5±2.2
	Subjective 12-h dark period	Sham	+/+	6.79±0.23 <sup>C</sup>	4.50±0.20 <sup>C</sup>	42.3±7.6 <sup>C</sup>
			-/-	6.31±0.31	5.06±0.43	37.7±8.6 <sup>C</sup>
		SCNx	+/+	5.06±0.16 <sup>D</sup>	6.11±0.15 <sup>D</sup>	50.0±1.5
			-/-	5.13±0.22 <sup>D</sup>	6.03±0.23 <sup>D</sup>	50.1±2.6
	24 h	Sham	+/+	12.08±0.31	10.23±0.32	101.3±14.8
			-/-	12.56±0.65	9.86±0.49 <sup>a</sup>	94.6±17.4
		SCNx	+/+	10.18±0.25 <sup>D</sup>	12.14±0.25	100.8±3.2
			-/-	10.23±0.31 <sup>D</sup>	12.07±0.25	101.6±3.3
24h DD	Subjective 12-h light period	Sham	+/+	6.03±0.34	4.67±0.33	77.7±9.0
			-/-	5.74±0.11	5.12±0.15	68.5±7.1
	Subjective 12-h dark period	Sham	+/+	7.47±0.50	3.72±0.45	48.8±8.6
			-/-	7.21±0.25	4.09±0.22	41.8±9.1
	24 h	Sham	+/+	13.50±0.77	8.39±0.69	126.4±17.5
			-/-	12.95±0.16	9.21±0.27	110.3±15.4

**12h:12h LD - Light vs Dark** 3-way ANOVA genotype x SCN x TIME: genotype x SCN W p=0.01, N p=0.002; SCN x TIME W p=0.004, N p=0.003, R p<0.0001; genotype x TIME W p<0.0001, N p<0.0001

**24hr** 2-way ANOVA genotype x SCN: genotype W  $p=0.04$ , N  $p=0.04$ ; SCN  $p<0.0001$

**1h:1h LD - Light vs Dark** 3-way ANOVA genotype x SCN x TIME: genotype x SCN x TIME W  $p=0.009$ , N  $p=0.015$ ; SCN x TIME W  $p=0.007$ , N  $p=0.04$ , R  $p<0.0001$ ; genotype x TIME W  $p=0.02$ , N  $p=0.007$

**24hr** 2-way ANOVA genotype x SCN: SCN W  $p<0.0001$ , N  $p<0.0001$

**12x L vs D pulses** 3-way ANOVA genotype x SCN x TIME: SCN x TIME W  $p=0.005$ , N  $p=0.008$ , R  $p=0.02$ ; genotype x TIME W  $p=0.01$ , N  $p=0.005$

(a) Indicates significant genotype difference (post-hoc  $p<0.05$ );

(b) Indicates significant SCN difference (post-hoc  $p<0.05$ );

(c) Indicates significant difference between subjective 12-h

and L cycles (post-hoc  $p<0.05$ ); Values represent mean $\pm$ SEM

Supplementary Table 2: Time spent asleep and awake under the LD 12 : 12 and LD

1 : 1 schedules in *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>* and their controls

Time Spent	Condition	<i>Bmal1</i> Genotype	Waking (h)	NREMS (h)	REMS (min)
12-h light period	Wild-type	+/+	5.30±0.14	5.94±0.08	45.9±7.0
		+/-	5.11±0.62	6.12±0.60	45.6±9.3
	SCN-disabled	fl/-	4.38±0.37	6.83±0.33	47.5±3.8
12-h dark period	Wild-type	+/+	8.18±0.28	3.55±0.24	14.4±2.8
		+/-	8.05±0.19	3.75±0.22	12.3±3.7
	SCN-disabled	fl/-	5.42±0.30 <sup>a</sup>	6.15±0.28 <sup>a</sup>	21.3±3.0 <sup>a</sup>
24 h	Wild-type	+/+	13.48±0.39	9.63±0.30	63.5±9.3
		+/-	13.16±0.65	9.87±0.99	58.0±10.7
	SCN-disabled	fl/-	9.81±0.59 <sup>a</sup>	12.98±0.54 <sup>a</sup>	68.8±4.3
Subjective 12-h light period	Wild-type	+/+	5.90±0.48	5.45±0.47	38.7±6.1
		+/-	6.08±0.64	5.17±0.55	45.0±6.3
	SCN-disabled	fl/-	6.70±0.18 <sup>a</sup>	4.30±0.17 <sup>a</sup>	49.2±8.4
Subjective 12-h dark period	Wild-type	+/+	7.44±0.42 <sup>c</sup>	4.20±0.41 <sup>c</sup>	20.9±3.3 <sup>c</sup>
		+/-	8.73±0.23 <sup>c</sup>	2.92±0.20 <sup>c</sup>	20.9±3.5 <sup>c</sup>
	SCN-disabled	fl/-	7.11±0.23 <sup>a</sup>	4.30±0.19 <sup>a</sup>	35.8±4.2 <sup>a</sup>
24 h	Wild-type	+/+	13.3±0.88	9.66±0.83	59.6±9.1
		+/-	14.8±0.62	8.09±0.57	65.9±8.6
	SCN-disabled	fl/-	13.8±0.35	8.78±0.31	85.0±11.6

**12h:12h LD-** Light vs Dark Repeated measures ANOVA between Genotype x Light/Dark: Genotype x LIGHT W  $P=0.007$ , N  $P=0.007$ ; Genotype W  $P<0.0001$ , N  $P=0.007$ ; LIGHT W  $P=0.005$ , N  $P<0.001$ , R  $P<0.001$

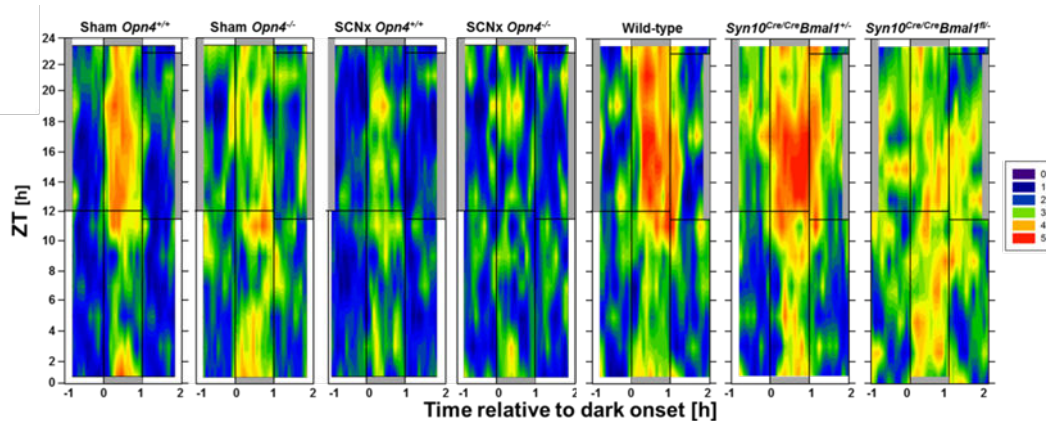
**24hr** One-way ANOVA genotype: genotype W  $P=0.005$ , N  $P=0.007$ ,

**1h:1h LD- Light vs Dark** 3-way ANOVA genotype x TIME: genotype x TIME W  $P=0.021$ , N  $P=0.014$ ; TIME W  $P<0.0001$ , N  $P<0.0001$ , R  $P<0.0001$

**12x L vs D pulses** 2-way ANOVA genotype x TIME: genotype x TIME W  $P=0.03$ , N  $P=0.02$ ; TIME W  $P<0.0001$ , N  $P<0.0001$ , R  $P=0.003$

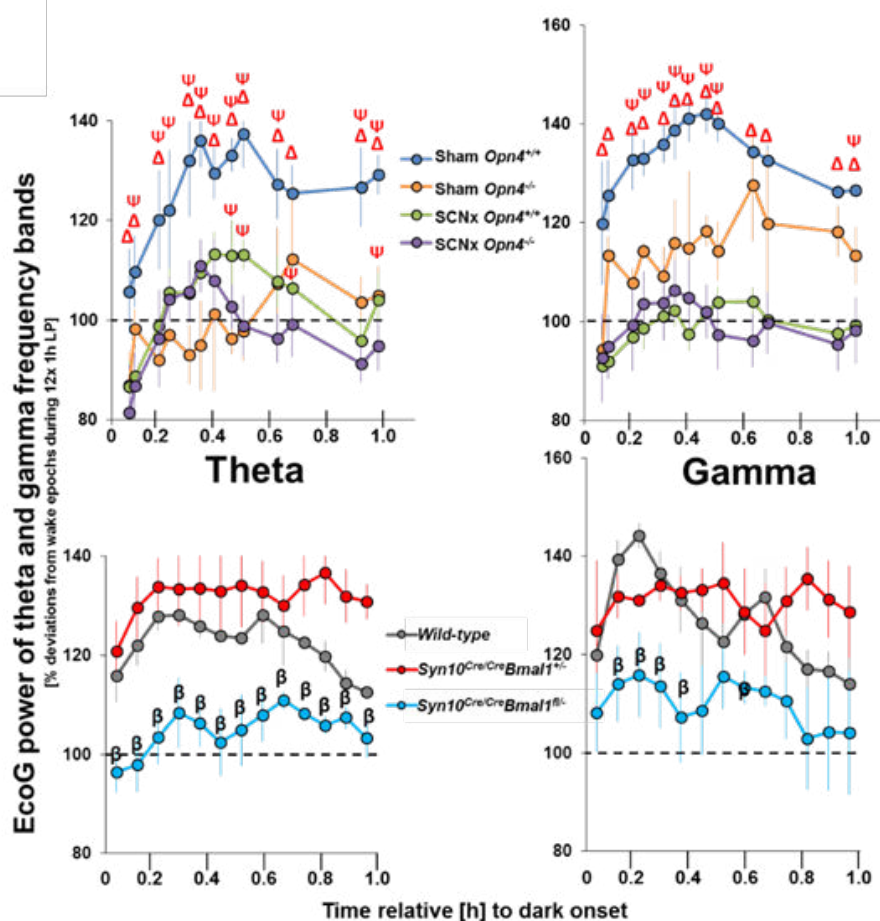
(a) Indicates significant genotype difference (post-hoc  $P<0.05$ ); (c) Indicates significant difference between subjective 12-h D and L cycles (post-hoc  $P<0.05$ );

Values represent mean±SEM



Supplementary Figure 1: Time-course of wake during LD1:1

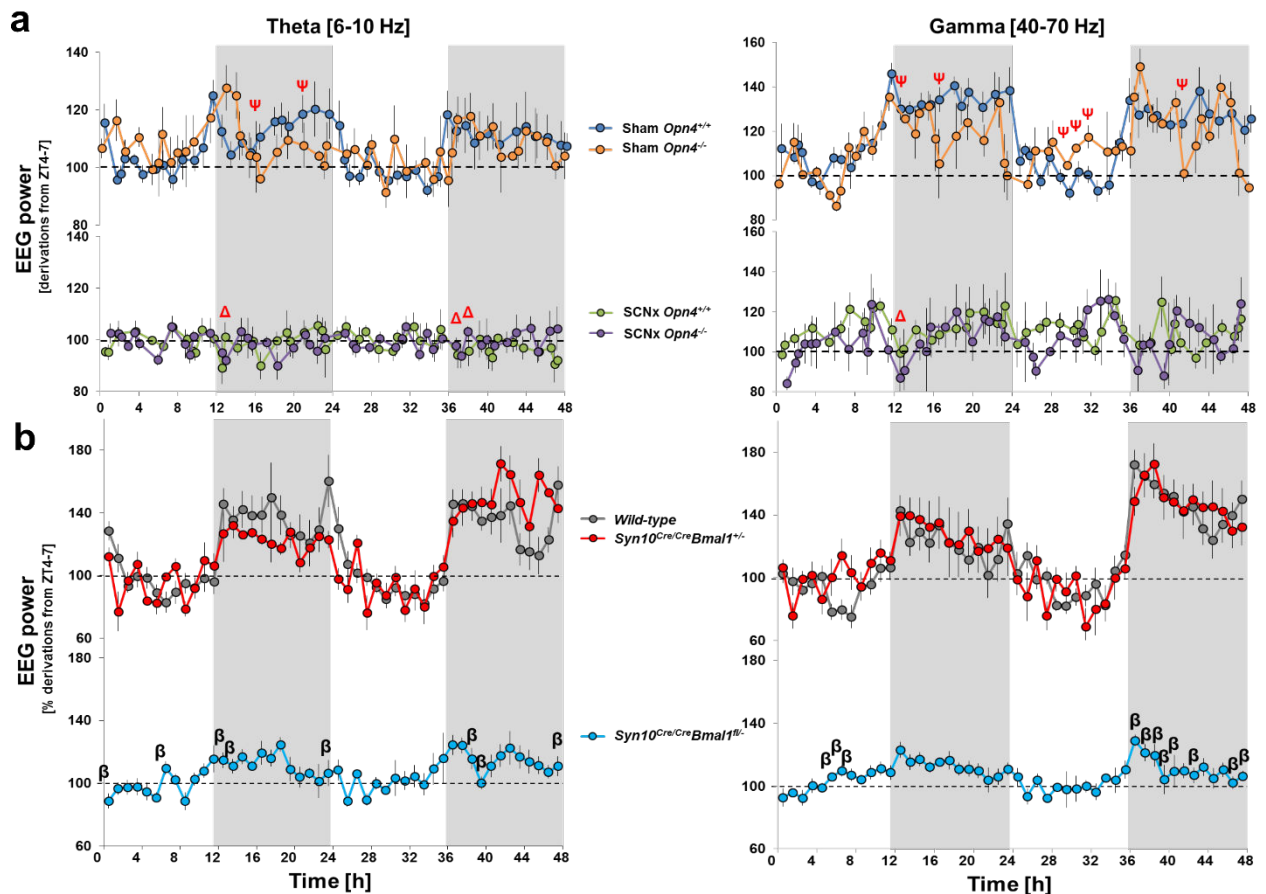
Waking values expressed as minutes/5 minute bout. In the absence of melanopsin, sham mice do not have as strong an induction of wake from the dark pulse, especially during the subjective dark period, as compared to Sham *Opn4*<sup>+/+</sup>. SCNx *Opn4*<sup>+/+</sup> still react to the dark pulse but at a much lower interval, and does not seem to be dependent on circadian time-of-day. SCNx *Opn4*<sup>-/-</sup> mice are unable to anticipate or react to the dark pulses regardless of ZT. *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> show strong arrhythmicity which is not seen in their controls (wild-type and *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>+/-</sup>). x-axis numbers denote the time before and after the dark pulse (centered).



Supplementary Figure 2: The alerting effect of darkness is primarily signaled by the SCN

Quantification of theta (7–10 Hz) and gamma (40–70 Hz) power spectra, in the waking ECoG during all averaged 12 1-hour dark pulses across the 24-hours of the LD1:1. Note the significant increase in theta and gamma power spectra in all control groups. This dark-induced activation is delayed and attenuated in *Opn4*<sup>-/-</sup> and abolished in the absence of SCN. (Top) 3-way ANOVA: Theta:  $P_{\text{SCN-condition}}=0.003$ ,  $P_{\text{time-course}}=0.0005$ ; Gamma:  $P_{\text{SCN-condition}}<0.001$ ,  $P_{\text{time-course}}<0.001$ . (bottom) In *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> and their controls, 2-way repeated measures ANOVA: Theta:  $P_{\text{time-course}}=0.021$ ,  $P_{\text{genotype}}=0.006$ ; Gamma:  $P_{\text{time-course} \times \text{genotype}}=0.044$ ,  $P_{\text{time-course}}<0.001$ ,  $P_{\text{genotype}}=0.007$ . Red *psi* (top) and *beta* (bottom) symbols indicate significant genotype differences and *delta* SCN-condition differences ( $P<0.05$ ; post-hoc *t*-tests).

Dark-associated theta/gamma activities are also suppressed under LD12:12 (see Supplementary Fig. 3) Sham *Opn4*<sup>+/+</sup> n=5; Sham *Opn4*<sup>-/-</sup> n=6; SCNx *Opn4*<sup>+/+</sup> n=5; SCNx *Opn4*<sup>-/-</sup> n=5; Wild-type n=5; *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>+/-</sup> n=5; *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> n=6.



Supplementary Figure 3: Theta and Gamma per hour of wake under LD12:12 in SCN-lesioned *Opn4*<sup>-/-</sup>, *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> mice and their controls

(a) In SCN-lesioned *Opn4*<sup>-/-</sup> mice and their controls. A 3-way ANOVA was performed during light and dark to compare SCN condition and genotype effect (genotype x SCN condition x time-course) of changes in theta and gamma (across the 48-hours of LD12:12). No significant differences were observed during the subjective light period. During dark significant differences were seen between genotype (theta:  $P < 0.001$ ; gamma:  $P = 0.011$ ) and between SCN condition (theta:  $P = 0.002$ ; gamma:  $P < 0.001$ ). Post-hoc analysis shows significance for genotype and SCN condition depending on the time during the pulse. *Psi* symbols indicate significant genotype

either between Sham or SCNx animals, and delta represents significant SCN condition differences. EEG power was normalized against the period of lowest power for theta and gamma (ZT4-7 for each day). For day 1 (*Sham Opn4<sup>+/+</sup>*  $n=8$ ; *Sham Opn4<sup>-/-</sup>*  $n=6$ ; *SCNx Opn4<sup>+/+</sup>*  $n=5$ ; *SCNx Opn4<sup>-/-</sup>*  $n=5$ ), and day 2 (*Sham Opn4<sup>+/+</sup>*  $n=7$ ; *Sham Opn4<sup>-/-</sup>*  $n=4$ ; *SCNx Opn4<sup>+/+</sup>*  $n=5$ ; *SCNx Opn4<sup>-/-</sup>*  $n=5$ ) (b) *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>* mice and their controls. One way ANOVA between controls and *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>* were significant ( $P < 0.05$ ) of changes in theta (a) and gamma (b) during certain hours across 48-hours of 12h:12h LD. Post-hoc significance is represented by beta symbols. For day 1 and 2 (*wild-type*  $n=6$ ; *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>+/-</sup>*  $n=5$ ; *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>*  $n=8$ ).

## **6. EXTENDED MATERIALS & METHODS**

### ***Animals***

All experiments were performed on adult male *Opn4*<sup>-/-</sup> mice and wild-type littermates (as controls), and were approved by university animal care facilities and pursuant to local and international rules. To disable the circadian pacemaker we performed under deep anesthesia a state-of-the-art 4-position electrolytic lesion of the SCN as detailed in supplementary material. The same surgical and stereotaxic procedure without injected current was used for Sham control animals. Locomotor activity was recorded using a standard infrared motion detector. All mice were implanted with a classical set of electrodes. Sleep and EEG power spectrum were analyzed and quantified according to standard criteria<sup>1</sup>. After completion of the protocol, the anterograde tracer cholera toxin subunitB (CtB) was injected under anesthesia into the posterior chamber of the eye. After sacrifice and perfusion of the animals three days later, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and immunostaining to arginine vasopressin (AVP) and CTB was performed and visualized using a confocal microscope.

Sleep experiments were performed using male *Opn4*<sup>-/-</sup> C57/Bl6&129P2 mice, age approximately 2 months at time of implantation. These mice were originally obtained from Deltagen Laboratory, and subsequently bred in the Institute for Cellular and Integrative Neurosciences breeding facility at the University of Strasbourg. Animals were raised under environmentally stable conditions (LD12:12; 23 ± 0.5° C, food and water ad libitum) and handled properly in agreement with the ethical guidelines for laboratory animal experimentation in the European Union. All experimental protocols were approved by the appropriate committees at the university and supervised by a veterinarian. Genotyping to verify the genetic background was performed using a



standard PCR (primers: Mel4: 5'–GCT CAC TAT ACC CTA GGC AC–3'; Mel2: 5'–GTC CAT GGC TAT GGC TGT CA–3'; TodoNeo1: 5'–CCG CTT TTC TGG ATT CAT CGA C–3' from Integrated DNA Technologies, Inc.), described previously in Ruby, et al.<sup>2</sup>.

A complimentary group of transgenic mice were used to verify the effects in the absence of a working SCN without lesioning the tissue. Synaptotagmin10-Cre (*Syt10Cre*) *Bmal1* knock-out (*Bmal1<sup>fl/-</sup>*) mice from the Max Planck Institute for Genetics in Göttingen, Germany, were subject to identical photo periods as the *Opn4*<sup>3</sup>. These mice, created with a *Syt10Cre* driver line, individual targeted the SCN. Cloning of the *Syt10Cre* vector was done with replacement of the ATG in exon 1 of the *Syt10* gene using a Cre cassette. A genomic region of 8.7-kb was then cloned. Targeted clones were then injected into blastocysts of *C57/B16* mice and resulting offspring were bred using wild-type *C57/B16* to produce F1, followed by continued breeding to produce a colony. *Syt10Cre* were then crossed with *Bmal1<sup>fl/fl</sup>* to disable *Bmal1* expression, solely in the SCN.

### ***Lesion of the SCN***

A subset of mice (*Opn4<sup>-/-</sup>*, n=8) and their littermate controls (*Opn4<sup>+/+</sup>*, n=10) were radio frequency lesioned regarding the suprachiasmatic nucleus, before electrode implantation as previously described<sup>4</sup>. Lesions were performed under anesthesia by heating the (250µm) tip of a Radionics (Burlington, MA) TCZ electrode to 55°C for 20 sec by passing RF current from a RFG-4 lesion generator (Radionics). The mice were then placed in a stereotaxic instrument (Kopf Instrument), and a standard electric probe was lowered into four points of the SCN region (from zero ear bar, nose at +5°: lateral: +/-0.2 mm; antero-posterior: +3.4 and +3.6 mm; dorso-ventral: +0.95 mm;<sup>5</sup>). A lesion generator (Radionics Lesion Generator System) was then

used to control both the temperature and voltage of the probe, for 30 seconds at each lesion site. All other mice underwent Sham lesions for control, where the probe was used but the generator was not activated. All animals then underwent identical ECoG/EMG electrode implantation to the others (described below).

### ***EEG implantation***

Before undergoing implantation mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine 80mg/kg and xylazine 7mg/kg. Male *Opn4<sup>-/-</sup>* (n=16) , *Opn4<sup>+/+</sup>* (n=19), *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>fl/-</sup>* (n=10), *Syn10<sup>Cre/Cre</sup>Bmal1<sup>+/-</sup>* (n=7), and *wild-type* (n=7) mice were implanted with two EEG, one reference, and two EMG electrodes in order to record vigilance states, aged 10-12 weeks. Mice were given a minimum of 14 days to recover from surgery and habituate to the baseline control conditions before any further experiments were carried out. 48 hours was recorded under LD12:12 light-dark conditions (white fluorescent lights, 150lux, measured at the bottom of the cage) for use as a baseline measurement and made using commercially available hardware and software (Micromed France, SystemPLUS Evolution version 1092). Following this, other continuous sleep recordings were taken under several experimental conditions: (1) a LD1:1 cycle for 24 hours, (2) 24-hour cycle of constant darkness (DD) under red light. All experiments occurred on different days from one another and a minimum of 14 days under LD12:12 was used to habituate the animals to the control condition. The 24 hours of recording which preceded each experiment was used to confirm that the mice had returned to baseline, in terms of sleep-wake amounts and architecture had. All mice were recorded simultaneously.

### Scoring of sleep and wake state

EEG and EMG signals were amplified, filtered, and analog-to-digital converted to 256Hz. The EEG signal was then modified using a Discrete-Fourier Transform (DFT)

to yield a power spectra between 0 and 90 Hz (0.25Hz resolution) using a 4-s window. Any epochs containing EEG artifacts identified and excluded during further analyses. Differences between genotypes in sleep amounts were calculated by averaging time spent in each state over 5-min, and 1-, 12-, and 24-h intervals.

The amplitude of the light-dark dependent changes in wakefulness under the LD1:1 schedule were determined using sine-waves, fitted to the individual 5-min values for wakefulness obtained in the 1-hour before, during, and after the 1-hour dark periods. For each mouse, the 5-min values for the 6 dark-pulses given during the 12-hour subjective light period and the 6 dark-pulses given during the 12-hour subjective dark period were averaged. Sine-waves were fitted to the average time courses using SigmaPlot (Systat v. 12) with amplitude, phase, y-offset as free parameters and period set to 2 hours. These individual amplitudes for the subjective light and dark period were then further analyzed using a factorial 2-way ANOVA with genotype and SCN condition and the repeated measures for factor light or dark period.

For each vigilance state of the ECoG, an average spectral profile was constructed using all 4-second epochs scored with the same state. The frequency range 49-51 Hz was omitted due to power-line artifacts in some of the recordings. In NREM sleep, time-dependent changes in ECoG power for specific frequency bands, was performed for delta (0.75-4Hz). During wakefulness, theta (6-10Hz) and gamma (40-70Hz) were measured instead. ECoG delta power during NREM sleep was normalized by expressing all values relative to the mean value obtained in the last 4-h of the (subjective) light period, the lowest period of homeostatic sleep pressure. Profiles were calculated using overlapping 10 min windows of waking at 5-min increments (13/hour).

### **Detailed Calculations for Model Figure 3d**

Under a standard LD 12:12 cycle, the intact circadian system is responsible for the majority of regulation of sleep and alertness and is abolished with the removal of the SCN, demonstrated in Fig. 1a. Melanopsinergic cell transmission under this condition passes both directly through and around the SCN, though at a smaller magnitude than under a non-circadian light/dark regimen.

During the LD 12:12 cycle a combination of direct and indirect effects of light with or without *Opn4* on sleep and alertness is observable. In order to determine the relative contribution of melanopsin and rods/cones through and external to the SCN, the groups must be parsed apart. The total contribution of effects mediated or relayed by the SCN is represented as the normalized difference between Sham *Opn4*<sup>+/+</sup> and SCNx *Opn4*<sup>+/+</sup> (72%), which consists of the circadian drive with light entrainment via melanopsin and rod and cones non-circadian and circadian effects of *Opn4* via the SCN as well as the contribution of rods/cones and intrinsic circadian processes. The melanopsin direct non-circadian effect of light passing through the SCN during this condition is represented as the total amount of melanopsin contribution (the difference between the two Sham *Opn4*<sup>+/+</sup> and *Opn4*<sup>-/-</sup>) subtracted from the difference of melanopsin contribution when the SCN is removed (SCNx *Opn4*<sup>+/+</sup> and *Opn4*<sup>-/-</sup>) and normalized (13%). The contribution via external pathways from *Opn4* would simply be the difference between the two SCNx genotypes (20%). The SCNx *Opn4*<sup>-/-</sup> group would thus represent rod/cones contributions to the non-circadian extra-SCN response to light. Since further reduction is difficult under these experimental conditions the remainder is assumed to consist of all circadian processes contributions to the regulation of sleep and alertness via the SCN, which is calculated as the difference between the groups lacking *Opn4* (Sham and SCNx). However, a

certain percentage of this remaining 59% represents the direct effects of light on rods/cones via the SCN, which involve the *Opn4* ipRGCs as well. Thus by using a similar ratio as evidenced between melanopsin information via and external to the SCN, we can postulate that the percentage of rods and cones passing information via the SCN is approximately 5% (a ratio of the 8% previously stated above).

### **Statistical methodology**

All statistics were calculated using standard methods with Statistica (Statsoft v. 8) and graphics were generated either in SigmaPlot (Systat, v. 11) or Microsoft Excel (v. 2010). Differences in n-values between certain light/dark regimes were due to signal problems on day of recording. For EEG spectrum analysis some animals were excluded due to the increased number of signal artifacts which allowed for the quantification of sleep and wake distribution, but hampered Fourier signal transformation.

### **Main Figures**

For Figure 2, (b) Sine waves were calculated to show best fits for the data points using SigmaPlot (Systat, v. 11). The lack of reactivity in SCNx *Opn4*<sup>-/-</sup> mice is represented with a dashed line (purple). A four-way ANOVA with factors “genotype,” “SCN condition”, “time of day” (subjective light versus subjective dark period), and “time course” (5-min values) revealed that for wake (W), time course was significantly affected by SCN condition (W: P=0.004) and genotype (W: P=0.003) (interactions: genotype x SCN condition: W: P=0.04; genotype x time course: W: P=0.0005; SCN condition x time course: W: P<0.0001). Red *Psi* denote significant genotype differences, red *Delta* denote significant SCN differences as compared to Sham *Opn4*<sup>+/+</sup> ( $p<0.05$ ; post hoc *t*-tests). *Psi* symbol represents statistically significant genotype differences either between Sham or SCNx groups. *Delta*

symbols represent SCN-condition differences between Sham *Opn4*<sup>+/+</sup> and SCNx groups.

For figure 3, (a) A three-way ANOVA (genotype, SCN condition, time-course), showed significance for “SCN condition x genotype” ( $P = 0.004$ ), “SCN condition x time-course” ( $P < 0.0001$ ), “genotype x time-course” ( $P = 0.01$ ), “SCN condition” ( $P < 0.001$ ), and “genotype” ( $P = 0.01$ ); post-hoc *t*-tests showed significant ( $P < 0.05$ ) genotype differences (red *psi*), and SCN differences (red *delta*). For *Syn10*<sup>Cre/Cre</sup>*Bmal1*<sup>fl/-</sup> a two-way ANOVA (genotype, time-course), showed significance for, “genotype x time-course” ( $P = 0.01$ ), “time” ( $P < 0.001$ ), and “genotype” ( $P = 0.007$ ); post-hoc *t*-tests showed significant ( $P < 0.05$ ) genotype differences (red *phi*). Dunnet’s test was used for (b). (c) One-way ANOVA (genotype) –  $P < 0.05$ (d) One-way ANOVA (genotype) -  $P = 0.005$ , post-hoc  $P < 0.05$ . (e) . A two-way ANOVA (genotype, SCN condition), showed significance for “SCN condition” ( $P = 0.002$ ), and “genotype” ( $P < 0.001$ ) [post-hoc *t*-tests against control group Sham *Opn4*<sup>+/+</sup> and wild-type ;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$  respectively, Red asterisks in (c)]. SCNx *Opn4*<sup>-/-</sup> L-D difference in NREM was not significantly different from zero as determined using One-Sample Signed Rank Test [( $P = 0.48$ ) insert].

### **EEG Immunohistochemistry (IHC)**

AVP and CtB immunostaining was carried out as described previously<sup>6</sup>. Free-floating slices were heated to ambient temperature before being rinsed with a solution containing PBS and 0,25% of Triton-X-100. Then slices were blocked with a solution containing 0,25% of bovine albumin and 5% of normal donkey serum. Hereafter, slices were incubated overnight at 4°C with two antibodies. SCN was stained for arginin-vasopressin in lesioned and Sham animals to visualize the extent of the lesion with an anti-AVP antibody diluted at 1:2000 (Bachem T-5018 Arg8-

Vasopression-Undiluted Antiserum for Immunohistochemistry, Host: Guinea Pig). Anti-cholera toxin B subunit antibody diluted at 1:1000 (Calbiochem© 227040 Anti-Cholera Toxin, B-Subunit, Goat pAb) was used to check whether fibers of the retinohypothalamic tract remained intact and projected to the different cerebral areas. The next day, slices were rinsed (PBS – 0,25% Triton-X-100) before being incubated for 30 minutes with the fluorescent secondary antibodies obtained from the donkey: anti-guinea pig conjugated Cy5 (Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L)ML\* / Jackson ImmunoResearch 706-175-148) diluted at 1:200, and anti-goat conjugated Alexa 555 (Donkey anti –goat IgG (H+L) Invitrogen A21432) diluted at 1:200. Slices then were rinsed (PBS – 0,25% Triton – X – 100) and mounted on slides with DAPI diluted at 1:500 (4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride Sigma-Aldrich D9542). Omission of the primary antibody abolished all staining.

### ***Photomicrographs***

Expressing neurons and fibers were analyzed using a microscope equipped with appropriate filter settings for detecting Cy5, Alexa 555 and DAPI. Fluorescence images were obtained via a non-confocal microscope (DMRXA2, Leica Microsystems) equipped with Metamorph v 2.1.39 (Olympus, Ballerup, Denmark). Light microscopy images were grabbed with a Leica DC200 camera using Leica DC200 software (Leica, Cambridge, UK). The software program Image J was used to fusion the images and the image editing software Microsoft publisher was used to combine the obtained imaged into plates. Reference of the various brain structures was made according to the Franklin and Paxinos atlas “mouse brain in stereotaxic coordinates” (third edition, 2007)<sup>5</sup>.

### **Supplementary References**

1. Franken, P., Malafosse, A. & Tafti, M. Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *Am. J. Physiol.* 275, R1127-1137 (1998).
2. Ruby, N. F. *et al.* Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298, 2211-2213 (2002).
3. Husse, J., Zhou, X., Shostak, A., Oster, H. & Eichele, G. Synaptotagmin10-Cre, a driver to disrupt clock genes in the SCN. *J. Biol. Rhythms* 26, 379-389 (2011).
4. Easton, A., Meerlo, P., Bergmann, B. & Turek, F. W. The suprachiasmatic nucleus regulates sleep timing and amount in mice. *Sleep* 27, 1307-1318 (2004).
5. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 3rd ed., (Academic Press, 2007)
6. Tsai, J. W. *et al.* Melanopsin as a sleep modulator: circadian gating of the direct effects of light on sleep and altered sleep homeostasis in *Opn4(-/-)* mice. *PLoS Biol.* 7, e1000125 (2009).



# « Validation d'un nouveau modèle animal pour l'étude du sommeil : Arvicanthis ansorgei »

## *Introduction*

La caractérisation et la quantification des effets directs de la lumière sur le sommeil via la phototransduction mélanospinergique ont été réalisées chez la souris qui est un rongeur nocturne. Dans la mesure où la lumière est inductrice de sommeil chez l'animal nocturne et de vigilance chez l'animal diurne, il était intéressant de caractériser les effets de la lumière sur le sommeil d'un rongeur diurne. L'Arvicanthis ansorgei est un rongeur qui a surtout été étudié dans le cadre de la chronobiologie. Il a été établi qu'il avait un rythme circadien diurne au regard de l'activité locomotrice. Ainsi pour mieux comprendre les mécanismes du sommeil, la part de la diurnalité de l'animal dans cette fonction biologique et pour éventuellement comparer et transposer nos résultats à l'homme, nous avons entrepris de caractériser le cycle veille/ sommeil de ce rongeur (E. Ruppert, J. Hubbard, L. Calvel, C. Allemann, L. Robin, D. Ciocca, P. Bourgin: Arvicanthis ansorgei: validation of a novel model for sleep study. *en préparation pour Sleep* ).

## *Article*

### *1. Title page. Original paper*

***Title: Arvicanthis ansorgei, a novel model for the study of sleep and waking in diurnal rodents***

***Short title: Sleep ECoG characterization of diurnal Arvicanthis ansorgei***

Authors and affiliations: Elisabeth Ruppert<sup>1,2\*</sup> MD, Jeffrey Hubbard<sup>1,2</sup> PhD\*, Laurent Calvel<sup>1,2</sup> MD, Ludivine Robin-Choteau<sup>1,2</sup> MS, Claire-Marie Gropp<sup>1,2</sup> MD, Caroline

Allemann<sup>1</sup> MS, Etienne Challet<sup>1</sup> PhD, Dominique Sage-Ciocca<sup>3</sup> PhD, Patrice Bourgin<sup>1,2,†</sup> MD, PhD

<sup>1</sup>CNRS-UPR 3212, Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Sleep Disorders Center, CHU and FMTS, University of Strasbourg, France

<sup>3</sup> CNRS-UMS 3415, Chronobiotron, Strasbourg, France

\* These authors contributed equally to the manuscript

† Corresponding address: Patrice Bourgin

CNRS UPR 3212, Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, 5 rue Blaise Pascal; and Sleep Disorders Center, 1 place de l'hôpital, CHU and FMTS, 67000 Strasbourg, France.

Tel: +33 3 88116430, Fax: + 33 3 88 11 51 53; email: pbourgin@unistra.fr

This work was performed at the Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg, France

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial support: This study received financial support from ADS.

Tables and Figures: 5 Figures, 1 supplemental figure, 1 supplemental table,

Keywords: *Arvicanthis ansorgei*, diurnality, sleep regulation, sleep deprivation, sleep homeostasis, circadian rhythm, direct effects of light, crepuscular, rodent, nocturnality

Word count: Main text = 4725; Abstract = 249; References = 36

## **2. Main manuscript:**

### **ABSTRACT**

Study Objectives: Sleep neurobiology studies use nocturnal species, mainly rats and mice. However, as their daily sleep/wake organization is inversed as compared to humans, a diurnal model for sleep studies is needed. To fill this gap, we phenotyped sleep and waking in *Arvicanthis ansorgei*, a diurnal rodent widely utilized for the study of circadian rhythms.

Design: video-ECOG, EMG and EOG recordings.

Setting: Rodent sleep laboratory

Participants: 14 male *Arvicanthis ansorgei*, aged 3 months

Interventions: 12hL:12hD baseline condition, 24-hour constant darkness, 6-hour sleep deprivation

Measurements and Results: Wake, NREM, and REM showed similar electrophysiological characteristics as nocturnal rodents. On average, animals spent  $12.9\text{h}\pm 0.4$  awake per 24-hour cycle, of which  $6.88\pm 0.3$  was during the light period. NREM sleep accounted for  $9.63\text{h}\pm 0.4$ , which of  $5.13\text{h}\pm 0.2$  during dark period, and REM sleep for  $89.9\text{min}\pm 6.7$ , which of  $52.8\pm 4.4$  during dark period. The time-course of sleep and waking across the 12hL:12hD was overall inverted to that observed in rats or mice, though with larger amounts of crepuscular activity at light and dark transitions. This crepuscular regulation persisted under constant darkness, as did the circadian diurnal distribution of vigilance states. Conservation of the homeostatic regulation was confirmed with the observation of higher delta power following sustained waking periods and a 6-hour sleep deprivation, with subsequent decrease during recovery sleep.

Conclusions: *Arvicanthis ansorgei* is a valid diurnal rodent model for studying the regulatory mechanisms of sleep and so represents a valuable tool for further

understanding of the nocturnality/diurnality switch and for translational research from animal to human.

**Keywords:** *Arvicanthis ansorgei*, diurnality, sleep regulation, sleep deprivation, sleep homeostasis, circadian rhythm, direct effects of light, crepuscular, rodent, nocturnality

## **INTRODUCTION**

The majority of laboratory sleep research today focuses on nocturnal rodents, primarily mice due to the transgenic tools available, including optogenetics. *Drosophila* and zebrafish, two other powerful genetic models, have been used for sleep studies, yet restrictions such as the limited neuronal network restrain their interest for research on mammalian physiology and behavior. To date, sleep has been characterized in a large range of species. Historically, sleep research was conducted on disparate animals such as cats or even rabbits, though now is all but abandoned, (experiments and colonies expensive to maintain, lack of genetic and biological tools). Through mice and rat research has provided major insights into sleep neurobiology, these animals are nocturnal, underlying the need for a diurnal rodent model.

To our knowledge, a chipmunk *Eutamias sibiricus*, is the only diurnal rodent in which sleep has been studied using EEG recordings. Sleep and wake distribution across the 24-hour day showed that they sleep for about one quarter of the 12-hour light period and three quarters of the 12-hour dark period.<sup>1</sup> Additionally, a significant increase in the level of EEG delta power, a marker of sleep need, was seen following a 24-hour sleep deprivation.<sup>1</sup> Though these initial results were promising, further experimentation was stopped, probably due to the isolated research conducted on a poorly characterized model, as well as the lack of laboratory colonies and therefore

difficulties to realize additional studies. Sleep regulation has also been studied in *Octodon degus*, a dual-phasing rodent showing crepuscular timed episodes of sustained waking evocative of a bimodal crepuscular modulation of arousal.<sup>2,3</sup> Furthermore, selective REM sleep deprivation resulted in this species in consistent REM sleep rebound only after nocturnal deprivation suggesting a unimodal promotion of nocturnal REM sleep.<sup>3</sup> Finally, for the same reasons as mentioned above for *Eutamias sibiricus*, and because *Octodon degus* exhibits no strong preference for sleep during the light or dark phase, further sleep studies were not conducted in this species.

In the field of chronobiology, the diurnal muridae of the Arvicanthis family (*A. ansorgei* and *A. niloticus*) have proven to be useful models. Originally, more than one hundred *Arvicanthis ansorgei* were screened for daily patterns of wheel-running activity in our laboratory.<sup>4</sup> The colony was then extended and maintained for fifteen years, with recurrent import of new animals to keep the genetic diversity of the species. Most of the animals expressed a clear diurnal pattern of locomotor activity.<sup>5,6</sup> Subsequent studies analyzed the circadian expression of clock genes (*Per1*, *Per2*, *Cry2*, *Bmal1*)<sup>7</sup> and clock-related neuropeptides (AVP, VIP and GRP)<sup>8</sup> in the suprachiasmatic nucleus (SCN) where the primary clock is located. The circadian rhythmic expression of these latter was roughly similar to what was observed in nocturnal rodents.<sup>7,8</sup> Melatonin and its rate-limiting enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) are expressed in *Arvicanthis ansorgei* during the night or dark phase, similarly to the distribution observed in human.<sup>9,10</sup> This underlies, not only a parallel to humans for translational research, but also the possibility to study the melatonergic regulation of sleep, whereas most of the mice strains used in laboratory research do not express melatonin (C57BL6/J, 129/Sv).<sup>11</sup> Moreover, the

phase response curve to light pulses in *Arvicanthis ansorgei* behaves comparatively to both nocturnal and other diurnal species,<sup>7</sup> whereas the circadian responses to dark pulses differ from those of nocturnal rodents.<sup>12</sup> Resetting of the circadian clock through the use of hypocaloric feeding in *Arvicanthis ansorgei* results in phase delays of the SCN pacemaker, contrary to nocturnal rodents.<sup>13</sup> Additionally, the proportion of retinal photoreceptors, rods, cones and melanopsin, in the retina of the *Arvicanthis ansorgei*, and subsequently their phototransduction systems which mediate the non-visual effects of light, are closer to what is observed in humans.<sup>14,15</sup> These data taken together have confirmed the relevance of *Arvicanthis ansorgei* as a diurnal model, yet it is still essential to phenotype sleep and to characterize sleep regulatory mechanisms in this species.

In the current study we recorded sleep for the first time in *Arvicanthis ansorgei* and sought to address whether *this species* is a valid diurnal model for studying the regulatory mechanisms of sleep and waking.

## **METHODS**

### ***Animals, Housing Conditions, and Sleep Deprivation***

*Arvicanthis ansorgei* were obtained from our animal facility- the Chronobiotron CNRS UMS3415, housed at the Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, France. Animals were raised under environmentally stable conditions [12-hour:12-hour light-dark schedule (12hL:12hD); 150 lux; 23 ± 0.5° C; food and water ad libitum] and were maintained according to the European Union guidelines for laboratory animal experimentation. LD and DL-transitions switched instantly, thus not mimicking natural twilight. Sleep deprivation was performed by gentle handling as described previously.<sup>16</sup> All experimental sleep protocols were supervised by a

veterinarian and approved by the ethical committees for animal research at the University of Strasbourg and CNRS.

### ***Locomotor activity monitoring***

Prior to electrode implantation, running-wheel actimetry (DataportDP24) was performed under standard 12hL:12hD condition using software (VitalView, Minimitter). Analysis and production of the actograms were performed using Clocklab (Actimetrics) following data transformation via Matlab. All of the 14 male *Arvicanthis ansorgei* included in the study showed a clearly diurnal organization (Supplemental Figure 1A), with an almost complete cessation of locomotor activity during the night period. Examination of the total number of wheel counts between the light and dark periods further confirmed this rhythmicity (Supplemental Figure 1B).

### ***Surgery and experiments***

Surgery protocol for electrodes implantation was performed according to the methods previously described<sup>16</sup> with minor changes to adapt to the *Arvicanthis* species. The electrodes were implanted under deep anesthesia (intraperitoneal injection of ketamine 80mg/kg and xylazine 7mg/kg), then soldered to a connector and cemented to the skull, before the skin was sutured. Animals were implanted with two ECoG on the dura using the same coordinates as in the rat (frontal: 2.0 mm lateral to midline, 2.0 mm anterior to bregma; parietal 2.0 mm lateral to midline, 2.0 mm anterior to lambda),<sup>17</sup> one reference electrode, two EMG inserted into the neck muscles along the back of the skull and, in a subset of rodents two EOG electrodes to record eyes movements observed during waking and especially during REM sleep. The video was also recorded in a subset of animals to verify behavioral state in

conjunction with ECoG. Given the increased activity of *Arvicantis*, compared to laboratory mice or rats, we designed a specific cable in order to prevent decoupling of the electrode chip as well as we reinforced it with INOX metal to prevent destruction by the animal. The cable material, however, was flexible and relatively light and the increased weight of this system was offset by the size of the *Arvicantis ansorgei* which averaged 150g at time of implantation. All experiments were performed using male *Arvicantis ansorgei*, aged approximately 3 months at time of implantation. A minimum of 14 days was given to recover from surgery and to habituate to the baseline conditions before any protocol began. Signals were recorded for analysis using commercially available hardware and software (Micromed France, SystemPLUS Evolution version 1092). Sleep recordings were performed under several experimental conditions: (1) baseline 12hL:12hD cycle, (2) 24-hour of constant darkness, (3) 6-hour sleep deprivation starting at ZT12. All experiments occurred on different days from one another and a minimum of 14 days under 12hL:12hD between each condition was used to re-habituate the animals to the control conditions. All animals were recorded simultaneously.

### ***ECoG sleep scoring and power spectrum analysis***

ECoG and EMG signals were amplified, filtered, and analog-to-digital converted to 256Hz. The vigilance states for each 4-s epoch were then classified as waking, NREM sleep, or REM sleep, using visual inspection without knowledge of the recording condition. The scoring was performed according to criteria similar to those classically used for other rodents: The EEG during REM was characterized by a regular, low-amplitude theta (6-10 Hz) rhythm and a low EMG. During NREM, the EEG amplitude was larger and dominated by both delta (0.75–4 Hz) and theta-



frequency components and the EMG was low. Wakefulness was characterized by a higher and variable EMG and a low-amplitude EEG with both slower (delta during drowsiness) and faster (theta during exploratory behavior) components. Furthermore, as sleep and waking had previously not been categorized in these animals, initial scoring was verified in several animals using ECoG/EMG/EOG in conjunction with infrared video recording. Video recording using a commercially available night-vision camera (Sony HDR-CX550VE) mounted on a tripod was used in 4 animals to confirm concordance between behavior and ECoG scoring (wake, cessation of EMG activity during NREM, cessation of EMG activity coupled with EOG measured rapid-eye movements during REM sleep). The ECoG signal was subjected to Discrete-Fourier Transform (DFT) yielding power spectra between 0 and 100Hz (0.25Hz resolution) using a 4-second window and a 50Hz filtering. All four-second epochs containing signal artifacts were marked so they could be excluded from ECoG spectral analyses. Amounts spent in each vigilance state were calculated by averaging time spent either in 5min, 1-, 12-, and 24-hour intervals. Moreover, an average spectral profile was constructed using all 4-s epochs scored with the same vigilance state.

Time-dependent changes in ECoG power for specific frequency bands under NREM sleep was performed for delta (0.75-4Hz), and during REM, theta (6-10Hz), and in wake, both theta (6-10Hz) and gamma (40-70Hz). ECoG delta power during NREM sleep was normalized by expressing all values relative to the mean value of the period consistently showing the lowest period of homeostatic pressure, ZT20-24, inverted to nocturnal mice.<sup>16,18</sup>

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was realized using Statistica (Statsoft v. 8) with graphic representations created either in SigmaPlot (Systat, v. 11) or Microsoft Excel (v. 2010). Programs written in Visual Studio or Pascal were created by J. Hubbard to perform non-standard analyses. For statistical significance, one-way ANOVAs followed by post-hoc Protected Least Significant Difference (PLSD) were performed unless otherwise specified.

## **RESULTS**

### **Polysomnographic Characterization of Sleep and Waking in *Arvicantis Ansongei***

Initial scoring was verified in four animals using ECoG/EMG/EOG in conjunction with video recording (for details, see methods above). Epochs scored as wake (W) showed highly desynchronized ECoG and high muscle activity on the EMG, as well as non-rhythmic eye movements on the EOG (Figure 1A). The ECoG spectral profile showed higher power within the theta (6-10 Hz), and delta range (0.75-4 Hz), this latter being also observed in nocturnal rodents during wake (Figure 1B). NREM sleep (N) was identified according to highly synchronized slow oscillating delta waves and lower activity of higher frequency bands, associated with low muscle tone, consistent with a resting state. Additionally no eye movements were observed (Figure 1A). The ECoG Power spectrum was dominated by delta frequencies (0.75-4 Hz), characteristic ECoG rhythm of NREM sleep (Figure 1B). REM or rapid-eye-movement sleep was characterized by highly desynchronized ECoG activity, coupled with complete muscle atonia, and rapid eye movements every several seconds (Figure 1A). Note the presence of high peaks of theta-waves in the absence of delta associated to muscle atonia and an ECoG characteristics of this state (Figure 1B).

## **Distribution of Sleep and Wakefulness during the 12L:12D Baseline**

Analysis of two consecutive days under a standard 12hL:12hD cycle showed that wake accounted for 59% ( $6.88\text{h} \pm 0.3$ ) during the light period compared to 48% ( $5.99\text{h} \pm 0.3$ ) in the dark phase (Figure 3A, 3C, Supplemental Table 1). Conversely, there is also a significant difference of time spent in NREM [37% ( $4.50\text{h} \pm 0.3$ ) vs. 43% ( $5.13\text{h} \pm 0.2$ )] or REM [5.1% ( $37.1\text{min} \pm 3.8$ ) vs. 7.3% ( $52.8\text{min} \pm 4.4$ )] between the light and dark periods. Across the 24-hour period, wake and NREM sleep are relatively mirrored to one another (Figure 3A). Moreover, the length of wake and sleep bouts was not different between light and dark phases (Figure 2C). Finally, under standard 12hL:12hD condition the 24-hour sleep and wake distribution represented in the form of a hypnogram was overall inverted to that observed in rats or mice (Figure 2A). This is further confirmed by the distribution of NREM sleep expressed per 5 minutes bouts (Figure 2B).

## **Circadian, Direct Photic, Crepuscular and Homeostatic Components Regulate Sleep and Waking**

### ***Circadian and direct photic non-circadian regulation of sleep and waking in *Arvicanthis ansorgei****

We analyzed sleep under a 24-hour constant darkness condition to determine whether the 24-hour distribution of sleep and waking observed under a standard 12hL:12hD cycle was regulated by a clock-driven mechanism and/or due to the direct influence of light on sleep.<sup>16,19</sup> The results confirm that both sleep regulatory mechanisms play a role. Under constant darkness sleep and waking display an overall daily distribution relatively similar to that of baseline 12hL:12hD confirming the

clock-driven circadian regulation of the sleep-wake cycle (Figure 3C). The difference in sleep amounts was quantified between the light and dark phase under 12hL:12hD, which represents the amplitude of the daily sleep-wake cycle. When comparing this light dark difference to the difference in sleep amounts between the corresponding subjective periods under 24hD:D (ZT 0-12, subjective light period and ZT12-24, subjective dark period), we observed that the amplitude of the sleep-wake cycle is attenuated in constant darkness, due to the lack of wake promotion by light (Figure 3C) (Hubbard, Ruppert et al., submitted). Indeed, in constant darkness, we observed during the subjective light period higher amounts of shorter wake bouts as compared to the standard 12hL:12hD condition, suggesting a light-dependent consolidation of wakefulness (Figure 2C). The longest wake bout lasted on average 57.1 ( $\pm 8.5$ ) minutes during the 12hL:12hD condition, whereas it was of 27.2 ( $\pm 2.7$ ) minutes during 24-h darkness (One-way ANOVA Light condition:  $p=0.007$ ). Conversely, during the subjective dark period, we observed under constant darkness lower amounts of shorter NREM sleep bouts as compared to the standard 12hL:12hD condition. Finally, the frequency distribution of REM sleep bouts did not show any particular differences between the 12hL:12hD and 24hD:D conditions.

### ***Crepuscular regulation of sleep and waking***

Abrupt changes in wake and sleep are observed in *Arvicanthus* at L-D-L transitions with two sustained periods of wake at light and dark onsets, referred to as crepuscular (Figure 3A, Figure 4A, 4B).<sup>3</sup> This bimodal profile persists under constant darkness (Figure 3B, 3C, Figure 4A, 4B) with a maximum of waking amounts two hours immediately before and following the light or dark onset (Figure 4B). Additionally, ECoG power spectrum analysis at L-D-L transitions showed highly

increased EEG theta and gamma activities (Figure 4C), ECoG correlates of cognition and exploratory behavior in rodents.<sup>20,21</sup> Thus, this bimodal expression of waking corresponds to a cyclic pattern with a period of 12 hours. Therefore, we then applied sine-wave calculations to the results obtained during baseline under 12hL:12hD and 24-hour constant darkness. The time course of each vigilance state fits a sine wave curve of 12 hours periodicity without significant differences between both lightening conditions (Figure 4A). These data suggest that *Arvicanthis ansorgei* has a 12-hour periodic expression of sleep and waking, resulting from a prevailing crepuscular regulatory mechanism.

### ***Process S is conserved in Arvicanthis ansorgei***

ECoG delta activity is the most reliable marker of the buildup of homeostatic sleep need with time spent awake. Sleep deprivation represents the best approach to challenge the sleep homeostat.<sup>22,23</sup> Analysis of baseline days revealed an increase in delta power following activity periods corresponding to the animal's crepuscular peaks of activity at light and dark transitions (Figure 5A). The ECoG delta activity exponentially decreased during subsequent NREM rebound following these activity peaks, describing the classical time course of sleep homeostasis (Figure 5A, 5B).<sup>22,23</sup> This is consistent with the increases seen in theta maker for alertness, observed during the activity peaks preceding these bouts of NREM sleep (Figure 4C). Due to an overall inversion of the sleep wake architecture in *Arvicanthis ansorgei* as compared to mice, animals were placed under a 6-hour sleep deprivation which began at dark onset (ZT12), whereas sleep deprivation experiments in nocturnal rodents are usually performed at light onset (ZT0) (Bourgin, Curie et al., submitted).<sup>16,22</sup> Following the sleep deprivation, animals showed a significant

increase in the amount of NREM sleep (Figure 5B) and in delta power (Figure 5A, 5C). Sleep rebound was similar to that seen in mice under a similar length deprivation, exponentially decreasing within 4-hours to the baseline levels observed before sleep deprivation.<sup>16</sup>

Finally, to summarize the results, the daily pattern of sleep and wake as measured with the ECoG suggests in *Arvicanthis Ansorgei* that it follows a circadian organization, but with a sleep-wake rhythm of lower amplitude contrasting with a prevalent bimodal crepuscular expression. Moreover, the weakness of the circadian sleep-wake cycle contrasts with the high amplitude locomotor activity 24-hour rhythm as measured using wheel-running actimetry (Supplemental Figure 1A, 1B). This suggest that the species can engage its daily sleep-wake distribution from a bimodal crepuscular pattern in the absence of external cues to a clear diurnal pattern of sleep-wake rhythmicity in presence of circadian Zeitgebers such as a running wheel.

## ***DISCUSSION***

Here we characterized sleep and waking in *Arvicanthis ansorgei*, and our findings confirm that this is a diurnal model whose sleep is regulated by all main sleep regulatory mechanisms classically described in mice or in human research. This suggests that *Arvicanthis ansorgei* may represent a useful model for future sleep research.

### **Why is *Arvicanthis ansorgei* a model of interest for sleep research?**

Our comprehension of the neurobiology of sleep and wakefulness results mainly from studies performed in nocturnal rodents, mice and rats, whose sleep-wake cycle is inverted in comparison to humans. This urges for the development and

characterization of a diurnal model that could satisfy the requirements for the study of sleep neurobiology. Animal research on circadian rhythms has been largely conducted on rats and mice, facing the same challenge. The field of chronobiology addresses this issue through the extensive study for more than fifteen years of the rodent *Arvicanthis*. Two subspecies of this African grass rat have been used for investigations, the Nile *Arvicanthis niloticus* and *Arvicanthis ansorgei* from Mali. Interestingly, the Ansorgei subtype has been maintained under laboratory conditions for over fifteen years, which turned the animal behavior from wild to a behavior closer to laboratory conditions.<sup>4,24</sup> Finally, *Arvicanthis* proved to be an appropriate model for laboratory experiments and the species has been widely utilized for the study of circadian rhythms. As a result and as described in the introduction, the species has already been well characterized and specific biological tools have been developed as well as the development of transgenic models and other genetic tools is under way. However, as of this writing, sleep has never been phenotyped in *Arvicanthis*, although a few sleep recordings were performed in different rodent species. Despite challenges associated with this animal due to its more savage nature within the laboratory environment as compared to rats or mice, the procedure was nevertheless similar. Based on ECoG, EOG, EMG, and with video support, *Arvicanthis ansorgei* have clear differences in their vigilance states which are nearly identical to those found in other rodents such as mice and rats.<sup>18,25</sup> Characteristics seen in each vigilance state based upon power spectrum analysis were extremely similar to those observed in previously studied nocturnal rodents, in addition to the length of sleep and wake bouts.<sup>18,25</sup> Moreover, the main processes known to regulate sleep and waking are conserved in *Arvicanthis ansorgei* and differences with other rodent species are discussed below.

***Arvicanthis ansorgei* is a Diurnal Rodent Whose Sleep is regulated by Light and Circadian, Crepuscular and Homeostatic Processes**

***Arvicanthis* has a diurnal pattern of sleep and wakefulness resulting from clock-driven as well as direct photic influences**

In mammals, the distribution of sleep over the 24-h cycle is regulated by a circadian process generated by an endogenous clock located in the suprachiasmatic nuclei (Bourgin, Curie et al., , submitted).<sup>26,27</sup> In *Arvicanthis ansorgei* the sleep-wake distribution under a standard 12hL:12hD condition shows a weak, but significant, diurnal circadian rhythmicity. This circadian distribution of sleep and wakefulness is clock-driven, as it is also observed under 24h-hour of constant darkness. Yet, some differences are observed between the 12hL:12hD and 24hD:D conditions, more likely due to a sustained direct effect of light promoting wakefulness in diurnal species (Hubbard, Ruppert et al., , submitted).<sup>16,19</sup> Indeed, we demonstrated in mice that, the difference in sleep and wake amounts between a 12hL:12hD cycle and a 24hD:D cycle results from a loss of direct photic influence in constant darkness, and not from an attenuated circadian signal, at least for the first days in D:D (Hubbard al., in preparation for Nature, 2014). The direct influence of light, through melanopsin-based phototransduction, plays a major role in sleep regulation in mice, as did here in *Arvicanthis ansorgei*. Therefore, further experiments are needed especially to understand by which mechanisms the direct photic regulation of sleep switches between diurnals and nocturnals.

Melatonin, a hormone released by the pineal gland and whose levels vary within a daily cycle, reinforces the entrainment of circadian rhythms including the sleep-wake cycle, yet it also exerts soporific effects.<sup>28</sup> Melatonin secretion is suppressed by light and rhythmically expressed as a function of the master circadian



oscillator in the SCN, synchronizing peripheral clocks.<sup>29</sup> Although some differences have been observed in diurnal mammals (sheep, bovine, monkey) regarding regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), the limiting enzyme for nocturnal increase in melatonin synthesis, its regulation in *Arvicanthis ansorgei* is very similar to that of the nocturnal Wistar rat.<sup>9</sup> Daily profile of pineal *Aa-nat* mRNA and melatonin peak 9-h after dark onset (7-h in Wistar rat). AA-NAT activity is still detected 1.5-h after light onset, but melatonin levels have completely decreased at light onset.<sup>9</sup> Under constant darkness condition in *Arvicanthis ansorgei*, it is hypothetical whether a significant level of melatonin secretion persists during the subjective light phase and whether it could result in soporific effects.

### ***Crepuscular activity overrides the circadian drive***

Under standard 12hL:12hD cycles the animals display peaks of wakefulness at L-D-L transitions which are conserved, albeit slightly altered, under constant darkness. These consolidated periods of waking are sustained, beginning about two hours before light and dark onsets, and ending about two hours after light and dark offsets. Certain animal species are incredibly active at light and dark onsets, referred to as crepuscular.<sup>2,3</sup> The wake-induced crepuscular regulation observed in *Arvicanthis ansorgei* is far more pronounced than what is normally seen in laboratory rats and mice, and its persistence under constant darkness implies crepuscularity as a major sleep-wake regulatory component. This 12-h bimodal rhythm is also found for core body temperature in the absence of a running-wheel,<sup>6</sup> and in corticosterone release with peak values close to L-D and D-L transitions.<sup>30</sup> For *Arvicanthis ansorgei*, several reasons might explain this crepuscular wake behavior. Primarily one must consider the environment in which the *Arvicanthis ansorgei* comes from. In the sub-

Saharan grasslands, average temperature can reach above 40° C as the day progresses, forcing the animal to rest during certain times, such as the “siesta-like” period of NREM activity seen between ZT5-9. Following this, activity slowly increases, maximizing around sunset and dusk, continuing after “lights-off” in a laboratory environment. It is likely at this time of the day, that the animal searches for food and shelter before sleeping during the night. Video recording also confirms that at certain times during both the light and dark period the animal is engaged in a waking state with restricted movement, confirmed with ECoG and EMG. Further video comparison between animals showed that during the light and dark transitions most were engaged in foraging behavior, having buried their food in the preceding period. Furthermore, the repetition of this activity around light and dark onsets suggests an ultradian cycle of 12-hours rather than a circadian period of 24-hours. Finally, it would be of interest to study the circadian and crepuscular regulatory mechanisms under experimental conditions mimicking dawn and dusk, as suggested in flies.<sup>31</sup>

### ***The homeostatic regulation of sleep in *Arvicanthis ansorgei****

*Arvicanthis ansorgei* is an active animal compared to laboratory rats, and increased activity is known to augment homeostatic pressure.<sup>32,33</sup> The time-course of delta activity following the two periods of high activity suggests that sleep pressure builds up faster in *Arvicanthis ansorgei* than in mice or rats, yet this remains to be further established. A 6-hour sleep deprivation started at dark onset challenged the sleep homeostat with a significant increase in the amount of delta power at sleep rebound. As compared to delta peaks after crepuscular wake bouts under baseline, the delta peak obtained at recovery sleep was relatively low. Given that there are two

peaks of activity, it may be pertinent to perform a sleep deprivation at crepuscular activity onset. A more complete analysis of all increases in EEG delta activity in relation with periods of waking needs to be examined for further integrated understanding of the interaction between the circadian, the crepuscular and the homeostatic components.

### ***The Sleep-Wake Rhythm has a Weaker Circadian Organization as Compared to Wheel-Running Activity***

In *Arvicanthis ansorgei*, the amplitude of the sleep wake circadian rhythm is weak as compared to that of locomotor activity rhythm measured through wheel-running. Locomotor activity is known to reinforce circadian rhythmicity and, indeed, in our experiments the diurnal pattern of locomotor activity in *Arvicanthis ansorgei* is largely strengthened in presence of a running wheel. Therefore, further experiments are needed to explore whether the *Arvicanthis* diurnal sleep-wake rhythm might be solidified in the presence of external cues such as a running-wheel.<sup>34</sup> The influence of locomotor activity on the circadian system can even be more pronounced in certain species such as the diurnal unstriped Nile Grass rat. Indeed, *Arvicanthis niloticus* have been shown to switch partially or totally their locomotor profile from a diurnal to a nocturnal pattern when a wheel is available.<sup>35</sup> However, we did not reproduce this observation in *Arvicanthis ansorgei*. as no significant changes were noticed after recording animals using infrared motion detectors in the absence of a wheel,<sup>4</sup> except for a few animals displaying such a behavioral switch from “predominantly diurnal” to “predominantly nocturnal”.<sup>6</sup> This behavioral variety is probably due to different constitutive traits of the species, even though *Arvicanthis niloticus* and *Arvicanthis ansorgei* share common characteristics.

In conclusion, the present study is the first characterization and validation of *Arvicanthis ansorgei* as a model for studying the regulatory mechanisms of sleep and waking in a diurnal rodent. Their diurnal sleep-wake rhythm is, however, partly overridden by a strong crepuscular regulatory process. A stronger synchronization of the diurnal profile might be obtained through exposure of the animals to external cues such as light-dark condition as well as reward properties of wheel-running. This is an important step for further research aimed at deciphering the mystery of the diurnality/nocturnality switch. Moreover, our findings suggest that *Arvicanthis ansorgei* represents a powerful model that is currently missing, for translational research from animal to applications in humans.

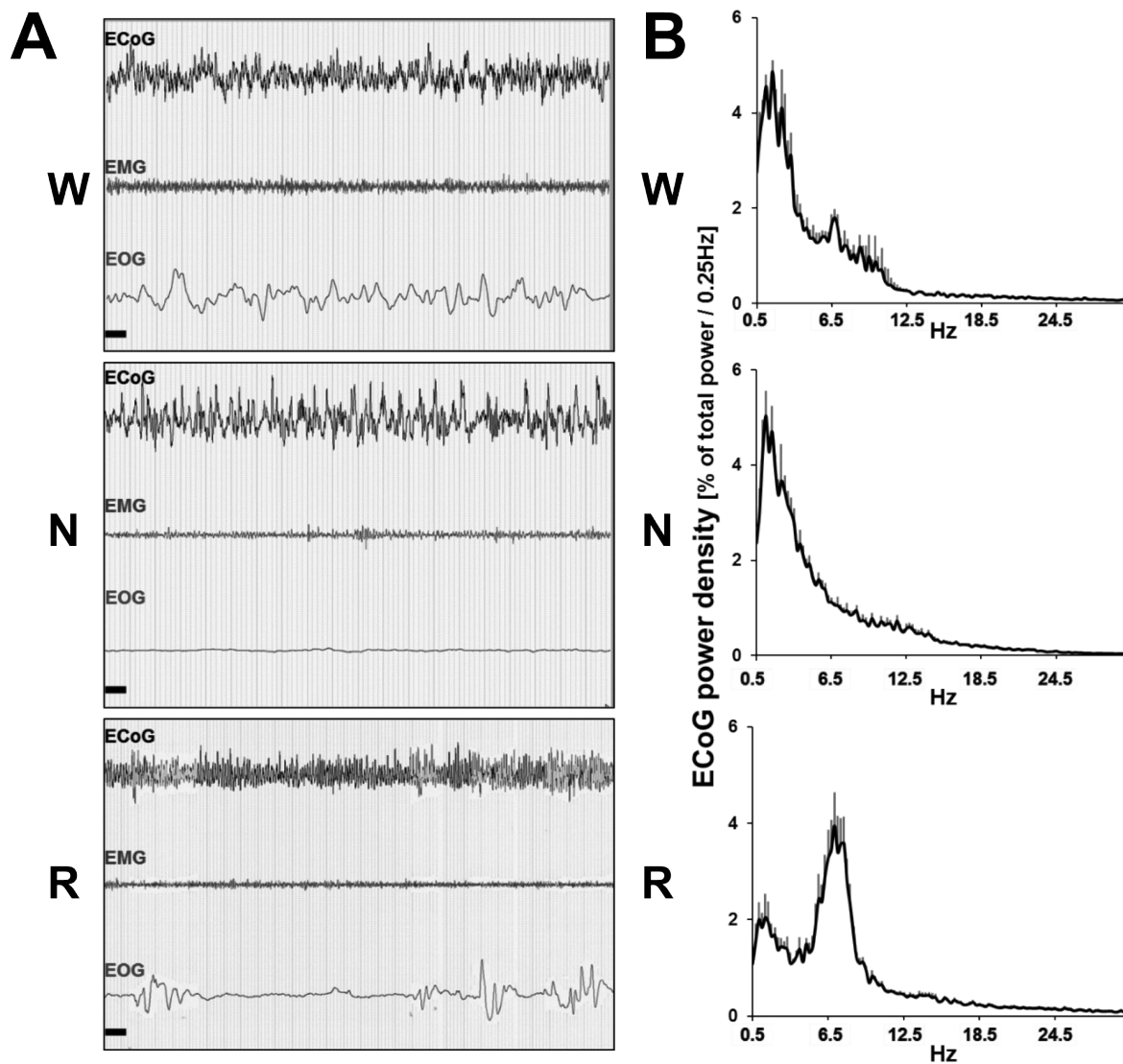
## ACKNOWLEDGMENTS/

The authors thank ADS Alsace for financial support.

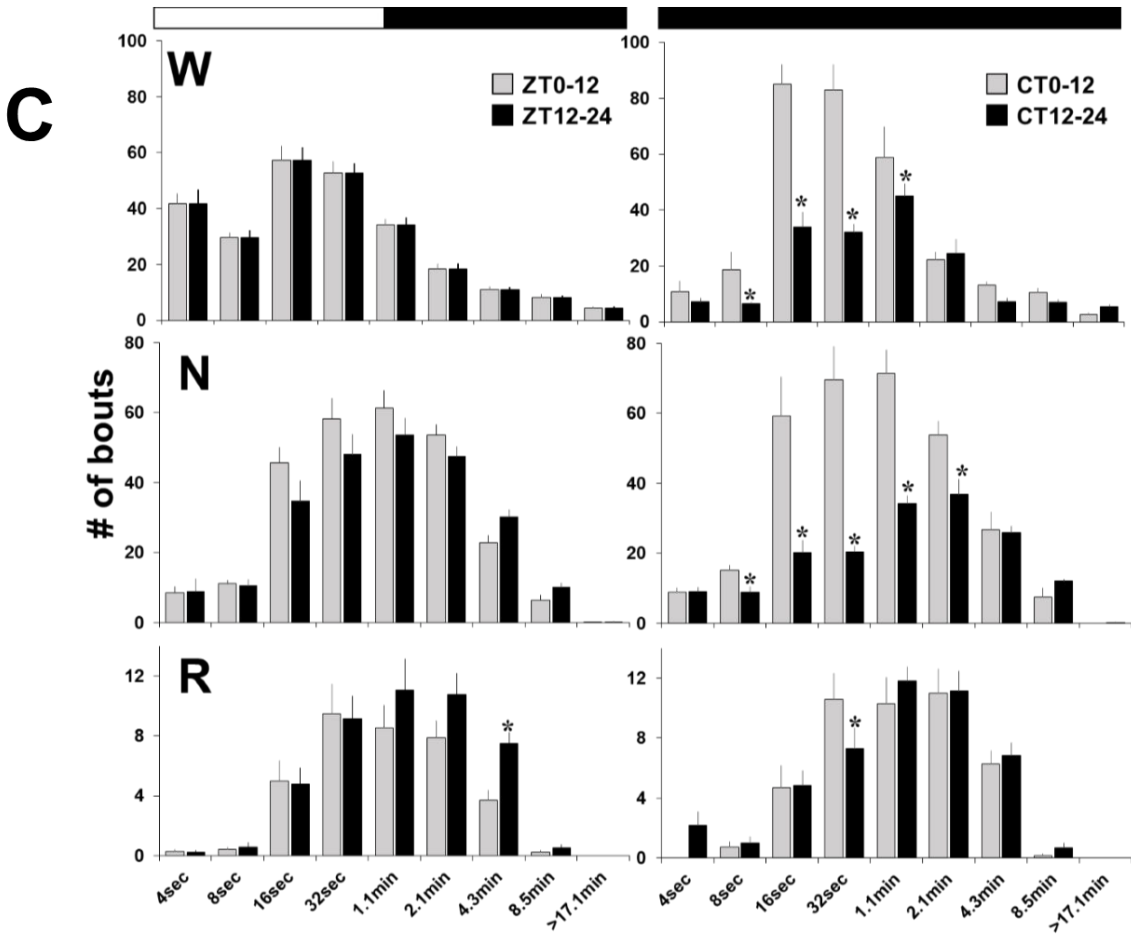
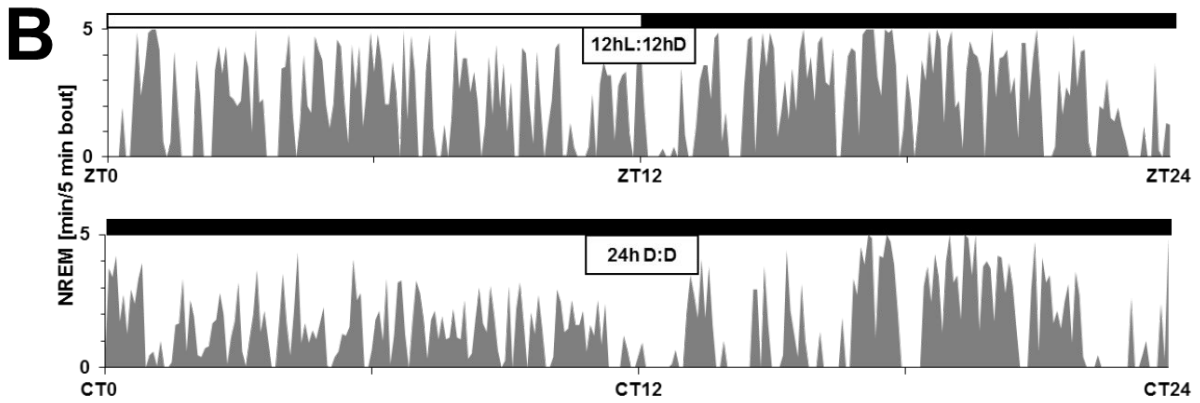
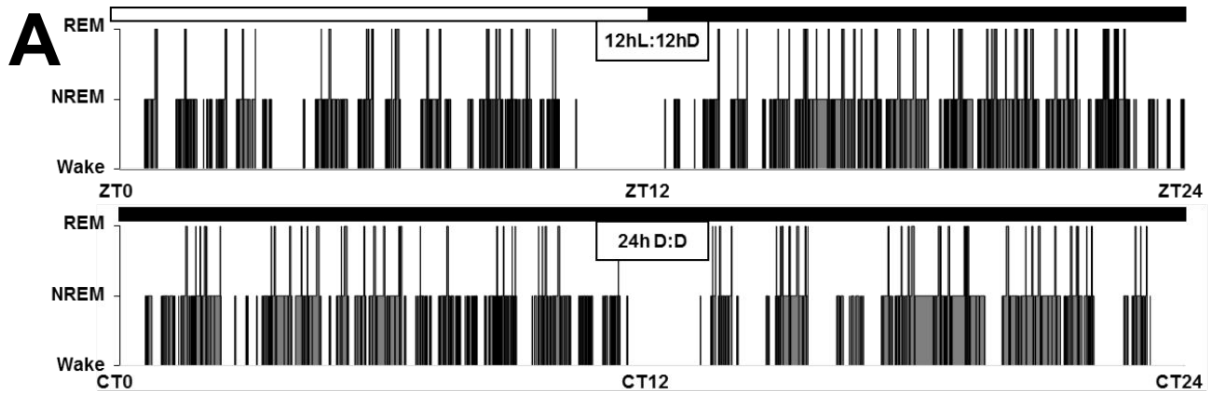
## LEGENDS

Figure legends, numbered sequentially. Give the meaning of all symbols and abbreviations used in the figure.

## FIGURES

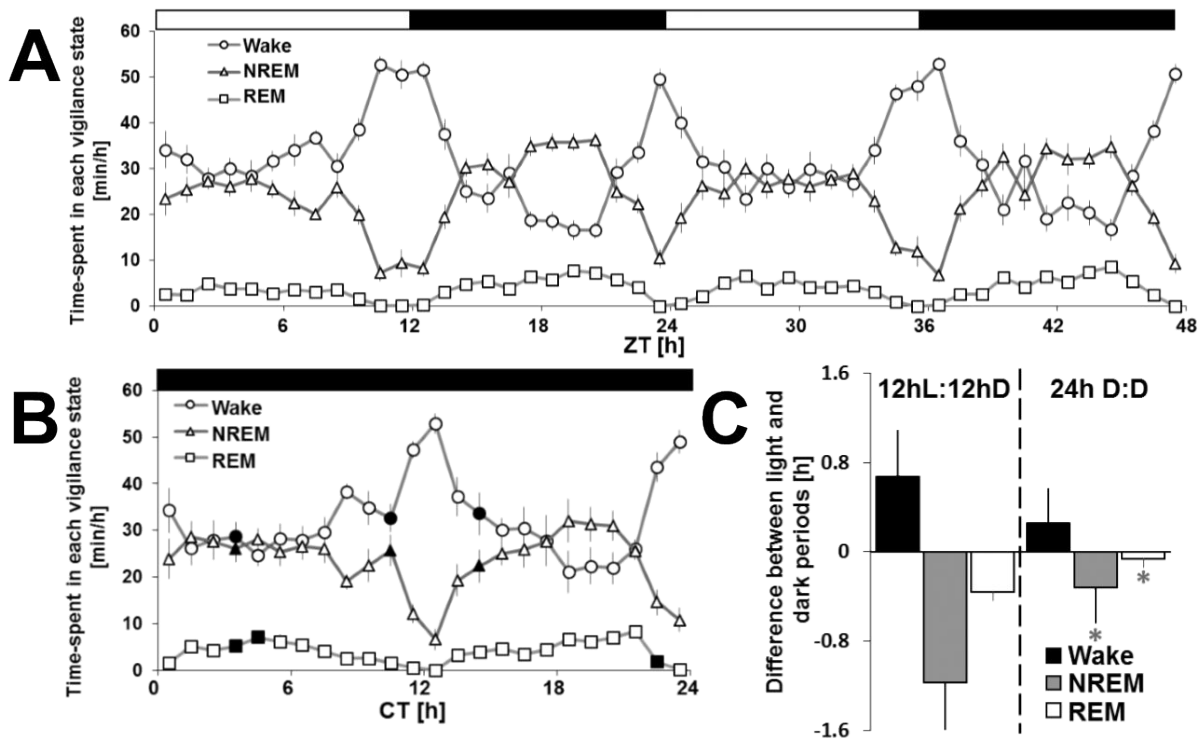


**Figure 1: Samples of polygraphic recordings and EEG power spectrum profile in W, NREM and REM under baseline condition. Samples of ECoG, EMG and EOG recordings obtained during baseline 12L:12D condition: (A) During waking a desynchronized ECoG pattern occurs in parallel with high levels of EOG and EMG activities, (B) Power spectrum analysis of all waking epochs during baseline. Peaks are noticed in both the delta (0.5-4 Hz) and theta (6-10 Hz) ranges. (C) Recordings during NREM show synchronized slow-wave activity oscillations in the ECoG, with a near complete suppression of EMG and EOG activity. (D) Spectral profile is dominated by delta frequencies. (E) During REM sleep a desynchronized ECoG pattern emerges with a total flattening of the EMG, reflecting the atonic state of the animal. Rapid eye movements are indicated by EOG activity. (F) Power spectrum profile is dominated by theta activity. Behavioral states were additionally verified using infrared video recording. Graph represents peak relative frequencies of total power between 0.5-25 Hz. Horizontal black bars: 1 second, window represents 20 seconds of recording.**

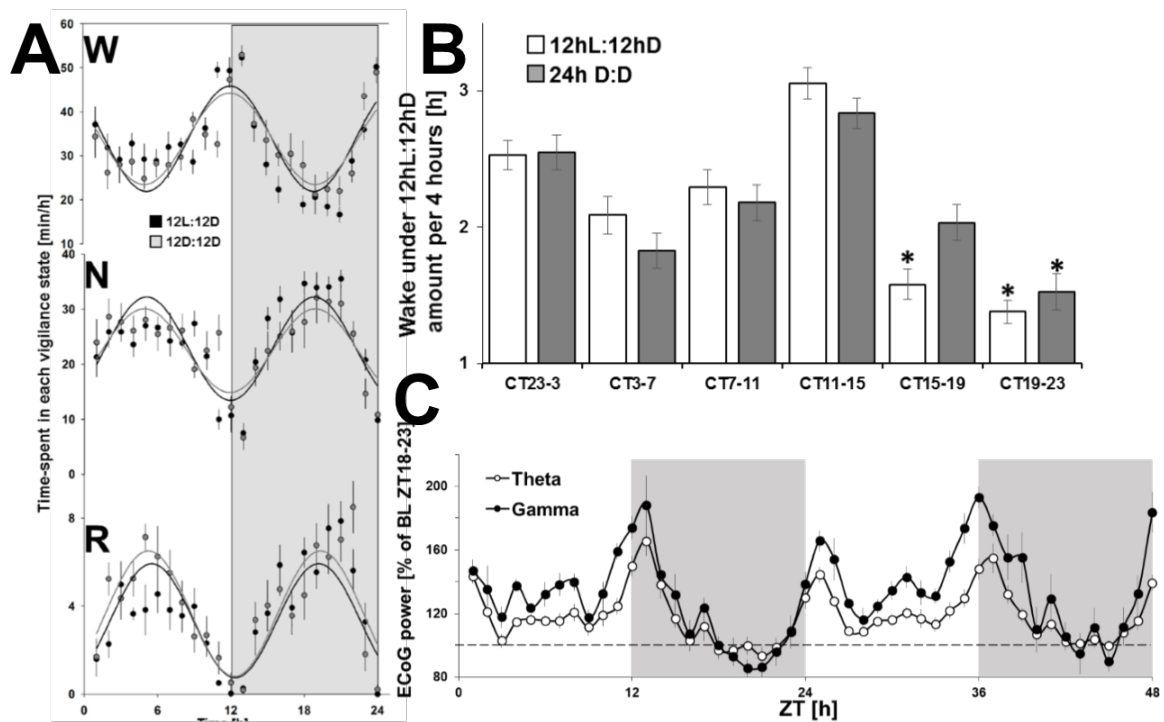


**Figure 2: 24- hours distribution of sleep and waking under 12hL:12hD and 24h D:D. Examples of a hypnogram (A) and of NREM sleep per 5 minute bouts (B) in two different *Arvicanthis ansorgei* across 12hL:12hD and 24h D:D conditions. Frequency distribution of W, NREM and REM episode lengths (C) during 12L:12D vs. 24h D:D. Vertical bars represent the number of episodes (mean  $\pm$  SEM) expressed as time spent during light or dark periods (left) or subjective light or dark periods (right), in each state by episode duration. Asterisks represent significance between subjective light and dark phases (one-way ANOVAs, post-hoc t-tests  $p < 0.05$ ).**

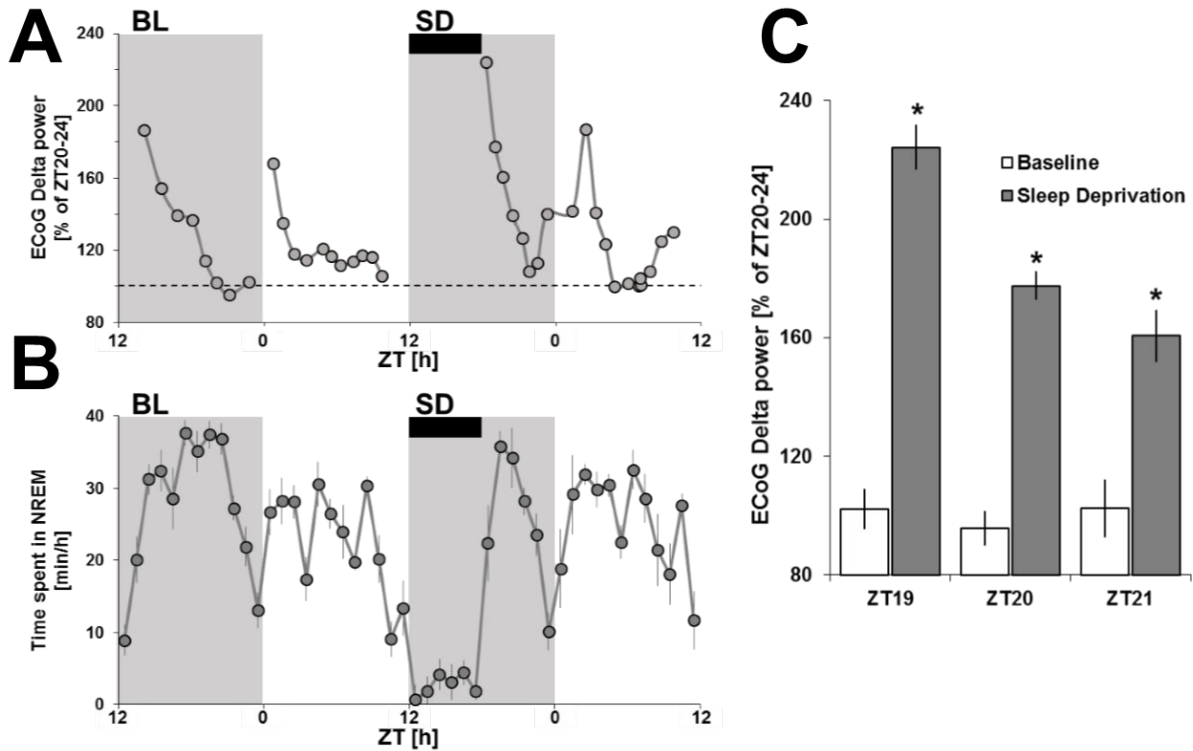




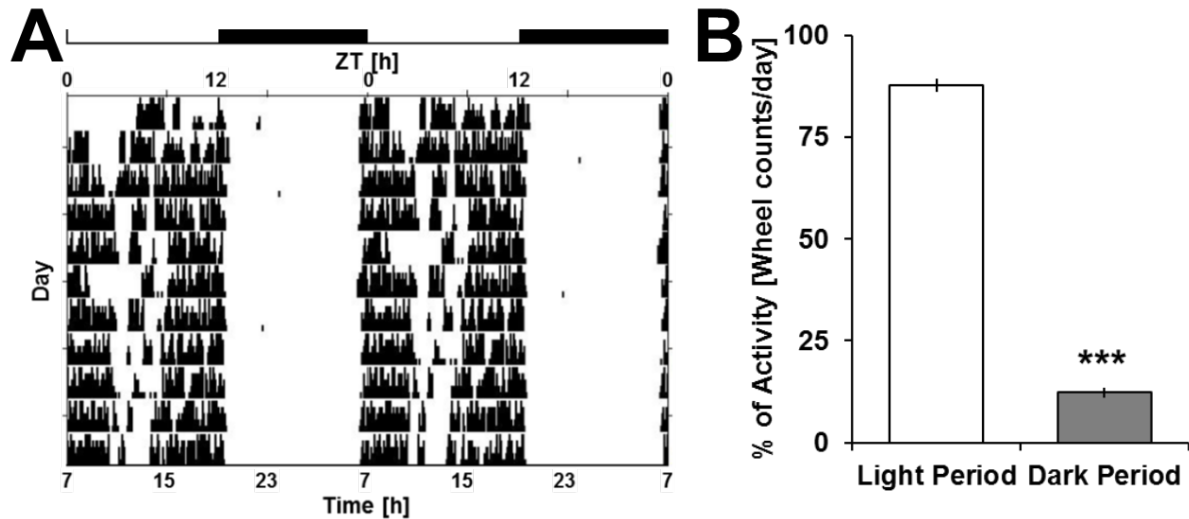
**Figure 3: Time course of sleep and waking under 12L:12D and 24h D:D. (A) Vigilance states are represented as the amount of minutes per hour across 48-hours of the 12L:12D cycle (A) or 24h D:D (B). (C) Difference between the light and dark periods of total amounts of W, NREM and REM sleep during the 24-hour 12L:12D baseline condition (left). (C) Difference of vigilance states between the subjective light and dark periods under 24h D:D (right). All values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. A two-way ANOVA for time-course and light condition showed significance for any vigilance states between baseline and constant darkness (black points- one-way ANOVA for light condition, post-hoc t-test,  $p < 0.05$ ). Asterisks denote significant differences ( $p < 0.05$ ).**



**Figure 4: Crepuscular regulation of sleep and waking. (A)** Sine-waves were calculated for each vigilance state to determine their mathematical profile during 12L:12D (grey) and 24h D:D (black). No significant difference was observed between the two conditions. **(B)** Amounts of wake per periods of 4 hours centered on the (subjective – grey bar) D-L-D transitions show predominant wake activity at (subjective – grey bar) crepuscular time points and an increased wake during the (subjective – grey bar) light period outside of the (subjective – grey bar) crepuscular zone, as compared to the dark (subjective – grey bar) period outside the (subjective – grey bar) crepuscular zone. Asterisks denote significant differences ( $p < 0.05$ ) by  $t$ -test, between the different 4-hour periods. All values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. **(C)** Time course of ECoG theta and gamma power spectrum during waking epochs expressed per hour across the two baseline days.



**Figure 5: NREM sleep and ECoG delta power under sleep deprivation at ZT12. (A) ECoG delta power expressed as a percentage of ZT20-ZT24 during baseline (ZT20-ZT24 was determined to consistently be the period with the lowest sleep pressure). The 6-hour sleep deprivation is displayed as well as the preceding baseline day. (B) Similarly, an important rebound of NREM is observed following 6-hour SD. (C) Histograms representing ECoG delta power during the three first recovery hours after the sleep deprivation as compared to the same baseline ZT (n=8).**



**Supplemental Figure 1: Daily wheel-running activity under a standard 12hL:12hD cycle (A) Actimetry sample from a single animal, double-plotted and centered at ZT0 (7h00) for a total period of 11 days under standard baseline conditions. (B) Differences for total wheel counts under actimetry recording during the light vs. dark period. Analysis was done using Student T-test and found to be highly significant ( $p < 0.001$ ).**

**Supplemental Table 1 – Daily amounts of wake (h), NREM sleep (h) and REM sleep (min) in a 12hL:12hD cycle**

	W (h) $\pm$ sem	N (h) $\pm$ sem	R (min) $\pm$ sem	N/R (%) $\pm$ sem
Light Period	6.88 $\pm$ 0.3	4.50 $\pm$ 0.3	37.1 $\pm$ 3.8	14.0 $\pm$ 1.3
Dark Period	5.99 $\pm$ 0.3*	5.13 $\pm$ 0.2	52.8 $\pm$ 4.4*	17.5 $\pm$ 1.6
24-hour Total	12.9 $\pm$ 0.4	9.63 $\pm$ 0.4	89.9 $\pm$ 6.7	15.9 $\pm$ 1.4

\* : significance between L and D periods ( $p < 0,05$ )

Values are expressed as mean  $\pm$  s.e.m. Asterisks denote significant differences ( $p < 0.05$ ) by t-test.

## **REFERENCES**

1. Dijk DJ, Daan S. Sleep EEG spectral analysis in a diurnal rodent: *Eutamias sibiricus*. *J Comp Physiol A* 1989;165:205-15.
2. Kas MJ, Edgar DM. Crepuscular rhythms of EEG sleep-wake in a hystricomorph rodent, *Octodon degus*. *J Biol Rhythms* 1998;13:9-17.
3. Ocampo-Garces A, Hernandez F, Palacios AG. REM sleep phase preference in the crepuscular *Octodon degus* assessed by selective REM sleep deprivation. *Sleep* 2013;36:1247-56.
4. Challet E, Pitrosky B, Sicard B, Malan A, Pevet P. Circadian organization in a diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910: chronotypes, responses to constant lighting conditions, and photoperiodic changes. *J Biol Rhythms* 2002;1:52-64.
5. Challet E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 2007;148:5648-55.
6. Cuesta M, Clesse D, Pevet P, Challet E. From daily behavior to hormonal and neurotransmitters rhythms: comparison between diurnal and nocturnal rat species. *Horm Behav* 2009;55:338-47.
7. Caldelas I, Poirel VJ, Sicard B, Pevet P, Challet E. Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 2003;116:583-91.
8. Dardente H, Menet JS, Challet E, Tournier BB, Pevet P, Masson-Pevet M. Daily and circadian expression of neuropeptides in the suprachiasmatic nuclei of nocturnal and diurnal rodents. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;124:143-51.
9. Garidou ML, Gauer F, Vivien-Roels B, Sicard B, Pevet P, Simonneaux V. Pineal arylalkylamine N-acetyltransferase gene expression is highly stimulated at night in the diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *Eur J Neurosci* 2002;15:1632-40.
10. Garidou-Boof ML, Sicard B, Bothorel B, Pitrosky B, et al., Environmental control and adrenergic regulation of pineal activity in the diurnal tropical rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *J Pineal Res* 2005;38:189-97.
11. Kasahara T, Abe K, Mekada K, Yoshiki A, Kato T. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:6412-7.

12. Mendoza J, Revel FG, Pevet P, Challet E. Shedding light on circadian clock resetting by dark exposure: differential effects between diurnal and nocturnal rodents. *Eur J Neurosci* 2007;25:3080-90.
13. Mendoza J, Gourmelen S, Dumont S, Sage-Ciocca D, Pevet P, Challet E. Setting the main circadian clock of a diurnal mammal by hypocaloric feeding. *J Physiol* 2012;590:3155-68.
14. Bobu C, Lahmam M, Vuillez P, Ouarour A, Hicks D. Photoreceptor organisation and phenotypic characterization in retinas of two diurnal rodent species: potential use as experimental animal models for human vision research. *Vision Res* 2008;48:424-32.
15. Karnas D, Hicks D, Mordel J, Pevet P, Meissl H. Intrinsic photosensitive retinal ganglion cells in the diurnal rodent, *Arvicanthis ansorgei*. *PLoS One* 2013;8:e73343.
16. Tsai JW, Hannibal J, Hagiwara G, et al., Melanopsin as a sleep modulator: circadian gating of the direct effects of light on sleep and altered sleep homeostasis in *Opn4(-/-)* mice. *PLoS Biol* 2009;7:e1000125.
17. Bourgin P, Fabre V, Huitron-Resendiz S, et al., Cortistatin promotes and negatively correlates with slow-wave sleep. *Eur J Neurosci* 2007;26:729-38.
18. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *Am J Physiol* 1998;275:R1127-37.
19. Hubbard J, Ruppert E, Gropp CM, Bourgin P. Non-circadian direct effects of light on sleep and alertness: lessons from transgenic mouse models. *Sleep Med Rev* 2013;17:445-52.
20. Chrobak JJ, Buzsaki G. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J Neurosci* 1998;18:388-98.
21. Montgomery SM, Sirota A, Buzsaki G. Theta and gamma coordination of hippocampal networks during waking and rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 2008;28:6731-41.
22. Franken P, Chollet D, Tafti M. The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *J Neurosci* 2001;21:2610-21.
23. Franken P, Dijk DJ, Tobler I, Borbely AA. Sleep deprivation in rats: effects on EEG power spectra, vigilance states, and cortical temperature. *Am J Physiol* 1991;261:R198-208.
24. Katona C, Smale L. Wheel-running rhythms in *Arvicanthis niloticus*. *Physiol Behav* 1997;61:365-72.

25. Neckelmann D, Ursin R. Sleep stages and EEG power spectrum in relation to acoustical stimulus arousal threshold in the rat. *Sleep* 1993;16:467-77.
26. Ibuka N, Kawamura H. Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res* 1975;96:76-81.
27. Mistlberger RE, Bergmann BM, Waldenar W, Rechtschaffen A. Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats. *Sleep* 1983;6:217-33.
28. Brzezinski A, Vangel MG, Wurtman RJ, et al., Effects of exogenous melatonin on sleep: a meta-analysis. *Sleep Med Rev* 2005;9:41-50.
29. Simonneaux V, Ribelayga C. 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* 2003;55:325-95.
30. Verhagen LA, Pevet P, Saboureau M, et al., Temporal organization of the 24-h corticosterone rhythm in the diurnal murid rodent *Arvicanthis ansorgei* Thomas 1910. *Brain Res* 2004;995:197-204.
31. Vanin S, Bhutani S, Montelli S, et al., Unexpected features of *Drosophila* circadian behavioural rhythms under natural conditions. *Nature* 2012;484:371-5.
32. Dijk DJ, Beersma DG, Daan S. EEG power density during nap sleep: reflection of an hourglass measuring the duration of prior wakefulness. *J Biol Rhythms* 1987;2:207-19.
33. Tobler I, Borbely AA. Sleep EEG in the rat as a function of prior waking. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1986;64:74-6.
34. Kohler M, Wollnik F. Locking and unlocking of running wheel affects circadian period stability differently in three inbred strains of rats. *J Biol Rhythms* 1998;13:296-304.
35. Blanchong JA, McElhinny TL, Mahoney MM, Smale L. Nocturnal and diurnal rhythms in the unstriped Nile rat, *Arvicanthis niloticus*. *J Biol Rhythms* 1999;14:364-77.



# CONCLUSION

Notre étude a permis de préciser voire de réviser certains concepts concernant les effets directs non-circadiens de la lumière sur le sommeil et sur le comportement chez le rongeur nocturne, en l'occurrence la souris. Nous avons montré que les effets directs de la lumière i) exerçaient un effet bénéfique sur des comportements de type dépressif, à travers vraisemblablement un effet sur l'activité locomotrice ; ii) avaient un rôle majeur dans la genèse du cycle journalier veille sommeil ; iii) influençaient positivement le mécanisme de régulation homéostatique du sommeil. Ces effets dépendent essentiellement de la phototransduction mélanopsinergique comme le montrent les résultats chez la souris *Opn4<sup>-/-</sup>*.

Dans une perspective de recherche translationnelle de l'animal à l'homme, nous avons effectué une première caractérisation du sommeil d'un rongeur diurne, *Arvicanthis ansorgei*, afin de pouvoir étudier dans le futur ses mécanismes photiques chez un rongeur diurne.

Pour étudier les effets directs de la lumière, nous avons, tout d'abord, utilisé une condition d'exposition lumineuse faisant varier le niveau d'intensité (10 lux, 150 lux et 600 lux) sans modifier les horaires d'application de la lumière. Nous avons alors montré que le rythme circadien de l'activité locomotrice et du sommeil conservait une période de 24h synchronisée au cycle de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité, ceci quelle que soit l'intensité lumineuse de la phase éclairée, y compris à faible intensité et indépendamment du génotype. Cette donnée était un préalable indispensable pour considérer que les effets de la lumière correspondraient à des effets directs et non pas à des effets intervenant sur la phase du rythme circadien.

Par ailleurs, pour étudier le comportement chez la souris, il est nécessaire de connaître le caractère « stresser » des conditions expérimentales utilisées. Pour cela, nous avons vérifié que les conditions lumineuses appliquées dans notre étude

ne généraient pas un stress chronique susceptible d'activer l'axe corticotrope. Certes, un effet significatif de la condition dim light est observé, mais les taux de corticostérone augmentés après exposition dans cette condition par rapport aux conditions 150 et 600 restent bien inférieurs aux taux observés dans le cadre d'un stress chronique (Miyazaki et al., 2013). Il est intéressant de noter que les taux de corticostérone ne sont pas significativement différents entre les deux génotypes. Finalement, l'ensemble des résultats suggère, là encore, que notre paradigme expérimental est approprié à l'étude des effets de la lumière sur le comportement.

Pour évaluer les effets de l'intensité lumineuse sur le comportement anxio-dépressif, nous avons utilisé des tests comportementaux évaluant des comportements de type dépressif et anxieux, les tests étaient réalisés pendant la période d'obscurité (dite d'activité chez un mammifère nocturne) pour qu'ils soient effectués dans les mêmes conditions quel que soit le paradigme d'exposition lumineuse utilisé. Un phénotype anxio-dépressif s'installe chez les souris sauvages soumises à une faible intensité lumineuse (<10 lux). En effet, dans cette condition de faible intensité, les souris ont un profil anhédonique et « dépression-like » comme l'attestent les résultats de la PS, du FTS et du TST, et également anxieux comme mesuré par l'E+M. L'administration d'un antidépresseur reverse le comportement anhédonique. Dans les différents tests comportementaux utilisés, l'effet de l'intensité lumineuse est significativement moindre en l'absence de mélanopsine. L'intensité lumineuse n'influence pas significativement le comportement anxio-dépressif des souris *Opn4*<sup>-/-</sup> excepté pour le TST. Cependant, les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> ne présentent pas spontanément dans tous les tests, des performances comparables à celles des souris sauvages exposées à 10 lux, ce qui peut laisser envisager la mise en place de

mécanismes adaptatifs au cours du développement; l'intervention du réseau rétinien avec la mise en oeuvre de collaboration entre les photorécepteurs classiques, cônes et bâtonnets et les cellules à mélanopsine en fonction des caractéristiques de la lumière est vraisemblable. En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère que la phototransduction mélanopsinergique est principalement impliquée dans les effets directs de la lumière sur la dépression et sur l'anxiété.

L'enregistrement actimétrique sur des périodes prolongées permet d'évaluer la distribution journalière de l'activité locomotrice. Il peut sembler contre-intuitif d'observer des variations d'activité locomotrice pendant la phase d'obscurité alors que le paramètre qui varie est le niveau d'intensité lumineuse administrée pendant la phase éclairée. Cependant, ceci correspond également à nos observations EEG chez la souris. En effet, au delà de l'effet « hypnotique » de la lumière chez la souris, espèce nocturne, l'obscurité exerce également un puissant effet éveillant et stimule la vigilance. En condition standard, le ratio jour/nuit de l'activité locomotrice est d'environ un cinquième / quatre cinquième. L'intensité lumineuse influence cette répartition puisque dans la condition d'exposition en dim light, les souris sauvages répartissent leur activité locomotrice entre le jour et la nuit selon un ratio d'environ un tiers /deux tiers. En condition scotopique, le signal lumineux est principalement traité par les bâtonnets qui transmettent ensuite cette information lumineuse aux structures cérébrales *via* les cellules à mélanopsine. L'effondrement de l'activité locomotrice chez les *Opn4*<sup>-/-</sup> dans la condition 600 lux et son renforcement chez les *Opn*<sup>+/+</sup> en deuxième partie de nuit semblent impliquer prioritairement la photoréception des cellules à mélanopsine et des cônes pendant la phase éclairée. Le rôle de la mélanopsine, bien que non exclusif, semble indissociable de celui des cônes dans la condition 600 lux (intensité forte pour une souris) compte tenu de l'effondrement de

l'activité locomotrice pendant la nuit chez les *Opn4*<sup>-/-</sup> qui n'est pas constaté dans les conditions standard et faible et qui suggère un rôle prépondérant des cônes à de telles intensités lumineuses. Cette plus faible activité locomotrice chez les souris *Opn4*<sup>-/-</sup> est à mettre en relation avec la moindre quantité de sommeil observée chez ces souris pendant la phase de lumière, et dont nous avons montré qu'elle résultait d'un effet direct non-circadien de la lumière. En effet nous avons montré que (Hubbard *et al.*, en préparation pour Nature 2014) la lumière et l'obscurité exercent des effets directs soutenus pendant de longues périodes de temps influençant ainsi l'amplitude du cycle veille sommeil. Finalement, ces résultats posent la question de savoir si l'influence positive de la lumière sur la dépression et sur l'anxiété n'est pas en partie la conséquence d'un effet sur l'activité locomotrice.

Nos observations soulignent l'importance de la phototransduction mélanopsinergique dans la médiation des effets directs de la lumière sur le comportement de type dépressif et locomoteur. En perspective dans les prochaines années, nous avons prévu d'analyser d'autres modèles transgéniques, sans cônes et/ou sans bâtonnets ou sans cellules à mélanopsine (insertion, sous le contrôle du promoteur de la mélanopsine, d'un gène codant pour la toxine diphtérique), afin de mieux préciser le rôle des cônes et des bâtonnets, et la contribution respective de chacun des systèmes de photodétection. Pour tenter d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de phototransduction impliqués, nous avons prévu d'étudier des modèles de souris transgéniques chez lesquelles seule un sous type de cellules à mélanopsine est invalidé. Ayant accès dans le futur à ces modèles grâce à nos collaborateurs, nous pourrons alors avoir une compréhension intégrée des mécanismes de phototransduction impliqués dans le contrôle du comportement par la lumière.

Le sommeil et l'humeur sont des comportements ayant de très fortes interactions fonctionnelles. L'humeur est également sous le contrôle du processus homéostatique puisqu'elle est fortement influencée par le temps passé éveillé. Certaines études suggèrent que l'homéostasie du sommeil, en comparaison à des sujets sains, est altérée chez les patients souffrant de dépression saisonnière. À cet égard, nos récents travaux sur le rôle de la mélanopsine dans la régulation du sommeil ouvrent des perspectives intéressantes. En effet, notre équipe a récemment montré (Tsai et al., 2009) que la mélanopsine influence l'homéostasie du sommeil, suggérant un lien entre lumière et homéostasie du sommeil.

Nous avons décidé d'analyser le sommeil de nos souris exposées aux trois conditions lumineuses appliquées lors de notre étude comportementale et de réaliser une privation de sommeil. Les résultats montrent que l'intensité lumineuse influence positivement la réponse homéostatique à des périodes prolongées d'éveil et que cet effet dépend de la mélanopsine puisqu'il n'est pas observé en l'absence de mélanopsine. Ces données permettent d'envisager un mécanisme supplémentaire par lequel la lumière pourrait influencer l'humeur. En effet, en agissant sur le processus homéostatique du sommeil, la lumière pourrait ainsi améliorer les comportements de type dépressif. Ces données ouvrent donc un nouveau champ de recherche dans le domaine.

Précédemment, notre équipe a montré l'importance des effets directs, aigus (en réponse à des pulses) de la lumière sur le sommeil et sur la vigilance. Il est admis depuis plusieurs décennies que le cycle veille-sommeil de 24 heures est sous le contrôle de l'horloge centrale, située dans les SCN. Cette dernière est entraînée par la lumière pour synchroniser le rythme veille sommeil à l'alternance lumière obscurité liée à la rotation de la terre sur son axe. Compte tenu de l'ampleur des

effets aigus de la lumière, nous avons cherché à déterminer s'ils pouvaient être maintenus pendant de longues périodes de temps et ainsi façonner l'enchaînement des états de veille et de sommeil. Il est difficile de séparer l'influence directe des effets indirects liés à l'entraînement de l'horloge. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé deux approches complémentaires d'inactivation des SCNs. Nous avons caractérisé le sommeil et l'activité EEG d'une part, de souris *Opn4*<sup>-/-</sup> et *Opn4*<sup>+/+</sup> rendues arythmiques à la suite d'une lésion électrolytique des SCN et d'autre part, de souris sans pacemaker circadien, par inactivation de l'horloge par transgénèse (*Synaptotagmin10*<sup>Cre/Cre</sup>, *Bmal1*<sup>fl/-</sup>). Cet imposant travail a permis de montrer que les noyaux suprachiasmatiques, en plus de leur rôle d'horloge, relaient pour 50%, les effets directs non-circadiens de la lumière sur le sommeil et sur la vigilance. Les résultats montrent que les effets directs de la lumière constituent un mécanisme capable de maintenir une organisation temporelle veille sommeil synchronisée par le cycle de lumière-obscurité en l'absence de pacemaker circadien. Nos observations démontrent que le mécanisme circadien entraîné par l'horloge ne contribue que pour la moitié à l'amplitude du cycle journalier veille sommeil, et que l'influence photique directe est responsable de l'autre moitié, essentiellement à travers la photodétection mélanopsinergique. Nous avons élaboré un schéma synthétique à partir de l'ensemble de nos résultats et nous montrons qu'il peut permettre de prédire l'amplitude du cycle veille sommeil dans d'autres conditions d'exposition lumineuse, comme le décalage horaire ou le changement de photopériode. Ces concepts novateurs modifient notre compréhension du rôle de la lumière ouvrant des perspectives importantes pour le futur (Hubbard, et al., en préparation pour Nature, 2014).

Notre connaissance de la neurobiologie des comportements et du sommeil provient en grande partie de la recherche fondamentale, actuellement, effectuée chez le rat et chez la souris, c'est-à-dire chez des rongeurs nocturnes. Ces animaux ayant des rythmes biologiques inversés par rapport à l'homme, il est nécessaire de développer un modèle de rongeur diurne adapté à des conditions de laboratoire. Le domaine de la chronobiologie a, en grande partie, résolu ce problème en réalisant des recherches sur un rongeur diurne, *l'Arvicanthis (ansorgei et noliticus)*. Ainsi, depuis quinze ans, notre institut a maintenu en captivité et a étudié plusieurs générations *d'Arvicanthis ansorgei*. Dans ce travail, nous avons caractérisé le sommeil de cette espèce, car ceci n'avait jamais été fait. Nous avons confirmé la caractère diurne de cette espèce, en soulignant malgré tout que le processus circadien du cycle veille sommeil est assez faible, comparativement à d'autres espèces. Les résultats montrent une forte composante de régulation crépusculaire établit par la présence d'un double pics d'activité locomotrice et d'éveil situés aux périodes de transition lumière-obscurité, le matin et le soir. Néanmoins, les mécanismes de régulation homéostatique et de régulation photique directe sont conservés. Nos observations valident l'intérêt de ce modèle pour l'étude du sommeil, et laissent entrevoir des perspectives très intéressantes pour l'étude de la neurobiologie des comportements. En effet, ce modèle permettra peut-être de combler en partie le fossé entre la recherche animale chez le rongeur diurne et les applications chez l'homme. (Ruppert et al., en préparation pour Sleep, 2014)

Notre équipe s'intéresse au comportement de manière intégré et tout particulièrement aux interactions fonctionnelles entre la lumière, les rythmes circadiens, le sommeil et l'humeur.



L'objectif principal de notre étude résidait dans l'approche explicative des mécanismes neurobiologiques qui sous tendent la dépression, notamment saisonnière et les effets thérapeutiques de la lumière. En effet, dans les études empiriques, observationnelles chez l'homme et dans celles menées chez l'animal, une large place est accordée à l'hypothèse circadienne. Pourtant, cette dernière reposant en priorité sur des troubles psychiatriques générés par des décalages de phase, ne permet pas de comprendre l'ensemble des phénomènes observés. Ainsi, dans un esprit translationnel de l'animal à l'homme, nous avons tenté de reproduire la variation de la luminosité pendant le jour de deux saisons contrastées que sont l'été et l'hiver. Nous avons pris soin de ne pas modifier les heures ou durées ou longueurs d'onde des stimuli lumineux et les photopériodes des animaux de laboratoire établies sur une base alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Par ailleurs, l'essentiel des critères diagnostiques d'une dépression se basent sur le comportement pendant la période d'activité qui est chez l'homme le jour et chez la souris la nuit, d'où notre choix d'explorer le comportement des souris étudiées pendant la nuit plus à même de révéler l'installation d'un phénotype dépressif induit par l'ambiance lumineuse durant le jour. Etonnamment, les résultats de notre étude révèlent d'une part, que la souris, rongeur nocturne, est d'autant moins dépressive et d'autant plus active d'un point de vue locomoteur que l'intensité lumineuse appliquée pendant le jour est forte et d'autre part, que cet effet direct, non circadien de la lumière implique la phototransduction mélanopsinergique.

Les interactions fonctionnelles entre sommeil, rythmes circadiens et dépression sont très fortes. La majorité des sujets insomniaques présentent un trouble de l'humeur. A l'inverse, la plupart des patients souffrant de dépression ont également des perturbations de l'initiation et du maintien du sommeil. Ces

interactions fonctionnelles entre sommeil et dépression sont bien décrites, mais les mécanismes les sous-tendant restent mal compris. Comme nous l'avons mentionné auparavant, plusieurs hypothèses ont été évoquées pour expliquer les troubles du sommeil associés à la dépression. Les principales hypothèses concernent une désynchronisation des rythmes, des décalages de phase du rythme veille sommeil et un déficit de régulation homéostatique du sommeil. Ainsi, les thérapeutiques favorisant une avancée de phase comme peut le faire une privation totale de sommeil de fin de nuit, en réponse à un retard de phase à l'origine du trouble peuvent avoir un effet antidépresseur. La luminothérapie constitue un traitement antidépresseur dans certains sous-types de dépression telle que la dépression saisonnière également par un effet d'avance de phase du rythme circadien. Cet effet sur l'horloge ne peut cependant expliquer à lui seul le rôle antidépresseur de la lumière. La luminothérapie peut être également efficace chez des patients sans décalage de phase, ce qui soulève la question des mécanismes impliqués.

De ce point de vue, nos travaux ouvrent des perspectives intéressantes. En effet, ils montrent, tout au moins chez la souris, que la lumière peut être bénéfique sur l'humeur voire exercer un effet antidépresseur direct sans modifier la phase des rythmes circadiens des états de veille et de sommeil, de l'activité locomotrice, de l'activité de l'axe corticotrope, à travers principalement la phototransduction mélanospinergique et à conditions de favoriser un niveau de luminosité nécessaire et suffisant. Ce point est d'autant plus important qu'une étude récente a montré qu'une lumière « aberrante » aggrave les comportements de type dépressif chez la souris *via* la phototransduction mélanopsinergique (LeGates et al., 2012). Les auteurs ont utilisé un paradigme extrêmement perturbant pour la souris, à savoir un cycle ultradien de lumière : obscurité de 3.5 h : 3.5 h, c'est-à-dire un cycle qui ne respecte

pas la période de 24 heures des rythmes biologiques, l'animal ne pouvant jamais se recalé. Les animaux sont maintenus pendant plusieurs semaines dans ces conditions et les auteurs affirment que le sommeil et le processus circadien ne sont pas modifiés, ce dont nous ne sommes pas convaincus sur la base de la littérature existante, mais également d'après certaines données de notre équipe. Quoi qu'il en soit, ce travail publié dans la revue Nature a eu un fort impact international, et suggère dans l'esprit de nombreux chercheurs et cliniciens que la lumière peut exercer un effet direct néfaste sur l'humeur. De ce point de vue, notre travail est important, car il permet de clarifier ce point. De plus, nos données montrent que la lumière peut améliorer l'humeur par un autre mécanisme, en renforçant le processus de régulation homéostatique du sommeil.

L'ambiance lumineuse des laboratoires est habituellement maintenue à une intensité standard plus faible que la condition « high » utilisée dans ce travail, car la souris a tendance à se protéger de la lumière. Au regard de nos conclusions sur le sommeil, l'humeur et l'activité locomotrice, l'homéostasie de la souris de laboratoire bénéficierait d'une augmentation de l'intensité de lumière pendant la phase éclairée dans les pièces de stabulation. De plus, les effets directs de la lumière chez la souris, mammifère nocturne et chez l'homme, mammifère diurne ne se comporteraient pas si différemment. Ce qui varie en sens inverse du fait de la nocturnalité de l'un et de la diurnalité de l'autre apparaît en raison des modalités d'application de la lumière et du décours temporel des effets directs de la lumière. En effet, les effets aberrants et néfastes sur l'homéostasie de l'animal qu'il soit nocturne ou diurne sont plus le fait d'un stimulus lumineux appliqué en dehors de la phase lumineuse. Par contre, l'attention particulière accordée au choix de paramètres physiques de la source lumineuse pendant la phase lumineuse en terme

de durée, d'intensité ou de longueur d'onde, par exemple, semble essentiel au maintien du bien être qu'il s'agisse d'un mammifère diurne ou nocturne. Au delà de l'hypothèse circadienne déjà établie, une meilleure compréhension des mécanismes sous tendant les effets directs de la lumière sur l'humeur, la veille, le sommeil à travers la phototransduction mélanopsinergique permettrait d'aborder l'approche thérapeutique de la lumière sous un angle nouveau Encouragées par ces éléments, de futures recherches chez l'homme pourraient se consacrer à l'évaluation de l'homéostasie du sommeil en réponse à des modalités nouvelles de l'uminothérapie, comme celles utilisant une lumière enrichie dans la gamme du bleu, notamment. Ceci permettrait d'élaborer des stratégies thérapeutiques complémentaires, indispensables pour l'amélioration de la qualité de vie de patients souffrant de troubles de l'humeur et du sommeil. Ces perspectives s'intègrent dans une recherche translationnelle de l'animal à l'homme qui est au cœur de nos projets.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Adrien J. Neurobiological bases for the relation between sleep and depression. *Sleep Medicine Reviews*. 2002 Oct;6(5):341–51.
2. Aizawa H, Cui W, Tanaka K, Okamoto H. Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front Hum Neurosci*. 2013;7:826.
3. Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R, et al. The Synchronous Activity of Lateral Habenular Neurons Is Essential for Regulating Hippocampal Theta Oscillation. *J Neurosci*. 2013 May 15;33(20):8909–21.
4. Altimus CM, Güler AD, Villa KL, McNeill DS, LeGates TA, Hattar S. Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *PNAS*. 2008 Dec 16;105(50):19998–20003.
5. Altimus CM, Güler AD, Alam NM, Arman AC, Prusky GT, Sampath AP, et al. Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. *Nat Neurosci*. 2010 Sep;13(9):1107–12.
6. Andretic R, Franken P, Tafti M. Genetics of Sleep. *Annual Review of Genetics*. 2008;42(1):361–88.
7. Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA. Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007 Feb;7(1):8–17.
8. Armitage R. Sleep and circadian rhythms in mood disorders. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 2007;(433):104–15.
9. Armitage R, Hoffmann R, Trivedi M, Rush AJ. Slow-wave activity in NREM sleep: sex and age effects in depressed outpatients and healthy controls. *Psychiatry Research*. 2000 Jul 11;95(3):201–13.
10. Armitage R, Hoffmann RF. Sleep EEG, depression and gender. *Sleep Medicine Reviews*. 2001 Jun;5(3):237–46.

11. Ashkenazy T, Einat H, Kronfeld-Schor N. Effects of bright light treatment on depression- and anxiety-like behaviors of diurnal rodents maintained on a short daylight schedule. *Behavioural Brain Research*. 2009 Aug 12;201(2):343–6.
12. Association AP. DSM-IV-TR: manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux. Elsevier Masson; 2004. 1146 p.
13. Bailes HJ, Lucas RJ. Melanopsin and inner retinal photoreception. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Jan 1;67(1):99–111.
14. Barnard AR, Hattar S, Hankins MW, Lucas RJ. Melanopsin Regulates Visual Processing in the Mouse Retina. *Current Biology*. 2006 Feb 21;16(4):389–95.
15. Bartolomucci A, Leopardi R. Stress and Depression: Preclinical Research and Clinical Implications. Baune B, editor. *PLoS ONE*. 2009 Jan 30;4(1):e4265.
16. Bedrosian TA, Nelson RJ. Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry*. 2013 Jul;18(7):751–7.
17. Belzung C, Billette de Villemeur E. The design of new antidepressants: can formal models help? A first attempt using a model of the hippocampal control over the HPA-axis based on a review from the literature. *Behavioural Pharmacology* December 2010. 2010;21(8):677–89.
18. Belzung C, Turiault M, Griebel G. Optogenetics to study the circuits of fear- and depression-like behaviors: A critical analysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2014 Jul;122:144–57.
19. Benca RM, Gilliland MA, Obermeyer WH. Effects of lighting conditions on sleep and wakefulness in albino Lewis and pigmented Brown Norway rats. *Sleep*. 1998 Aug 1;21(5):451–60.

20. Benington JH, Heller HC. REM-sleep timing is controlled homeostatically by accumulation of REM-sleep propensity in non-REM sleep. *Am J Physiol.* 1994 Jun;266(6 Pt 2):R1992–2000.
21. Berson DM. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science.* 2002 Feb 8;295(5557):1070–3.
22. Berson DM, Castrucci AM, Provencio I. Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J Comp Neurol.* 2010 Jul 1;518(13):2405–22.
23. Berton O, Hahn C-G, Thase ME. Are We Getting Closer to Valid Translational Models for Major Depression? *Science.* 2012 Oct 5;338(6103):75–9.
24. Berton O, Nestler EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Feb;7(2):137–51.
25. Birchler-Pedross A, Schröder CM, Münch M, Knoblauch V, Blatter K, Schnitzler-Sack C, et al. Subjective Well-Being Is Modulated by Circadian Phase, Sleep Pressure, Age, and Gender. *J Biol Rhythms.* 2009 Jun 1;24(3):232–42.
26. Bogdanova OV, Kanekar S, D’Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior.* 2013 Jun 13;118:227–39.
27. Bogdanova OV, Kanekar S, D’Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiology & Behavior.* 2013 Jun 13;118:227–39.
28. Boivin DB. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *Journal of Psychiatry and Neuroscience.* 2000 Nov;25(5):446.
29. Boivin DB, James FO. Light Treatment and Circadian Adaptation to Shift Work. *Industrial Health.* 2005;43(1):34–48.



30. Boivin DB, Czeisler CA, Dijk D, et al. COmplex interaction of the sleep-wake cycle and circadian phase modulates mood in healthy subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 1997 Feb 1;54(2):145–52.
31. Borbély AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J Biol Rhythms*. 1999 Dec;14(6):557–68.
32. Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM, Byrne B, Glickman G, Gerner E, et al. Action Spectrum for Melatonin Regulation in Humans: Evidence for a Novel Circadian Photoreceptor. *J Neurosci*. 2001 Aug 15;21(16):6405–12.
33. Brankač J, Kukushka VI, Vyssotski AL, Draguhn A. EEG gamma frequency and sleep–wake scoring in mice: Comparing two types of supervised classifiers. *Brain Research*. 2010 Mar 31;1322:59–71.
34. Bromundt V, Wirz-Justice A, Kyburz S, Opwis K, Dammann G, Cajochen C. Circadian Sleep-Wake Cycles, Well-Being, and Light Therapy in Borderline Personality Disorder. *Journal of Personality Disorders*. 2013 Oct;27(5):680–96.
35. Brunner DP, Kräuchi K, Dijk D-J, Leonhardt G, Haug H-J, Wirz-Justice A. Sleep electroencephalogram in seasonal affective disorder and in control women: Effects of midday light treatment and sleep deprivation. *Biological Psychiatry*. 1996 Sep 15;40(6):485–96.
36. Cajochen C. Alerting effects of light. *Sleep Medicine Reviews*. 2007 Dec;11(6):453–64.
37. Cajochen C, Brunner DP, Kräuchi K, Graw P, Wirz-Justice A. EEG and subjective sleepiness during extended wakefulness in seasonal affective disorder: circadian and homeostatic influences. *Biological Psychiatry*. 2000 Apr 1;47(7):610–7.

38. Cajochen C, Zeitzer JM, Czeisler CA, Dijk D-J. Dose-response relationship for light intensity and ocular and electroencephalographic correlates of human alertness. *Behavioural Brain Research*. 2000 Oct;115(1):75–83.
39. Challet E. Minireview: Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals. *Endocrinology*. 2007 Dec 1;148(12):5648–55.
40. Challet E. Interactions between light, mealtime and calorie restriction to control daily timing in mammals. *J Comp Physiol B*. 2010 Jun 1;180(5):631–44.
41. Chang A-M, Scheer FAJL, Czeisler CA, Aeschbach D. Direct Effects of Light on Alertness, Vigilance, and the Waking Electroencephalogram in Humans Depend on Prior Light History. *SLEEP* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2014 Apr 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/pmc/articles/PMC3700721/>
42. Chang L, Breuninger T, Euler T. Chromatic Coding from Cone-type Unselective Circuits in the Mouse Retina. *Neuron*. 2013 Feb 6;77(3):559–71.
43. Cirelli C, Tononi G. Chapter 12 - Molecular neurobiology of sleep. In: Pasquale Montagna and Sudhansu Chokroverty, editor. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2011 [cited 2014 Apr 29]. p. 191–203. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444520067000125>
44. Couillard-Despres S, Wuertinger C, Kandasamy M, Caioni M, Stadler K, Aigner R, et al. Ageing abolishes the effects of fluoxetine on neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 2009 Jan 13;14(9):856–64.
45. Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Research*. 1999 Jul 17;835(1):18–26.
46. Crawley JN. *What's Wrong With My Mouse: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. John Wiley & Sons; 2007. 542 p.

47. Cryan JF, Slattery DA. Animal models of mood disorders: recent developments: Current Opinion in Psychiatry. 2007 Jan;20(1):1–7.
48. Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov. 2005 Sep;4(9):775–90.
49. Cryan JF, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2005;29(4–5):571–625.
50. Cryan JF, Page ME, Lucki I. Differential behavioral effects of the antidepressants reboxetine, fluoxetine, and moclobemide in a modified forced swim test following chronic treatment. Psychopharmacology. 2005 Nov 1;182(3):335–44.
51. Cunha MP, Pazini FL, Oliveira Á, Machado DG, Rodrigues ALS. Evidence for the involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice. Brain Research Bulletin. 2013 Jun;95:61–9.
52. Czeisler CA, Gooley JJ. Sleep and Circadian Rhythms in Humans. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2007 Jan 1;72:579–97.
53. Dalm S, Enthoven L, Meijer OC, van der Mark MH, Karssen AM, de Kloet ER, et al. Age-Related Changes in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity of Male C57BL/6J Mice. Neuroendocrinology. 2005;81(6):372–80.
54. Datta S, MacLean RR. Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2007;31(5):775–824.
55. Davies WL, Foster RG, Hankins MW. Focus on Molecules: Melanopsin. Experimental Eye Research. 2012 Apr;97(1):161–2.

56. Desseilles M, Balteau E, Sterpenich V, Dang-Vu TT, Darsaud A, Vandewalle G, et al. Abnormal Neural Filtering of Irrelevant Visual Information in Depression. *J Neurosci*. 2009 Feb 4;29(5):1395–403.
57. Dijk DJ, Shanahan TL, Duffy JF, Ronda JM, Czeisler CA. Variation of electroencephalographic activity during non-rapid eye movement and rapid eye movement sleep with phase of circadian melatonin rhythm in humans. *J Physiol*. 1997 Dec 15;505(Pt 3):851–8.
58. Dijk D-J, Duffy JF, Riel E, Shanahan TL, Czeisler CA. Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin and temperature rhythms. *J Physiol*. 1999 Apr 15;516(2):611–27.
59. Dkhissi-Benyahya O, Gronfier C, De Vanssay W, Flamant F, Cooper HM. Modeling the Role of Mid-Wavelength Cones in Circadian Responses to Light. *Neuron*. 2007 Mar 1;53(5):677–87.
60. Dkhissi-Benyahya O, Rieux C, Hut RA, Cooper HM. Immunohistochemical Evidence of a Melanopsin Cone in Human Retina. *IOVS*. 2006 Apr 1;47(4):1636–41.
61. Do MTH, Yau K-W. Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *Physiological Reviews*. 2010 Oct 1;90(4):1547–81.
62. Doyle SE, Yoshikawa T, Hillson H, Menaker M. Retinal pathways influence temporal niche. *PNAS*. 2008 Sep 2;105(35):13133–8.
63. Drouyer E, Dkhissi-Benyahya O, Chiquet C, WoldeMussie E, Ruiz G, Wheeler LA, et al. Glaucoma Alters the Circadian Timing System. *PLoS ONE*. 2008 Dec 12;3(12):e3931.
64. Dulawa SC. Effects of Chronic Fluoxetine in Animal Models of Anxiety and Depression. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Apr 7;29(7):1321–30.

65. Ecker JL, Dumitrescu ON, Wong KY, Alam NM, Chen S-K, LeGates T, et al. Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion-Cell Photoreceptors: Cellular Diversity and Role in Pattern Vision. *Neuron*. 2010 Jul 15;67(1):49–60.
66. El Yacoubi M, Vaugeois J-M. Genetic rodent models of depression. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007 Feb;7(1):3–7.
67. Ellenbogen MA, Hodgins S, Linnen A-M, Ostiguy CS. Elevated daytime cortisol levels: A biomarker of subsequent major affective disorder? *Journal of Affective Disorders*. 2011 Jul;132(1):265–9.
68. Emens J, Lewy A, Kinzie JM, Arntz D, Rough J. Circadian misalignment in major depressive disorder. *Psychiatry Research*. 2009 Aug 15;168(3):259–61.
69. Erickson KI, Miller DL, Roecklein KA. The Aging Hippocampus: Interactions between Exercise, Depression, and BDNF. *The Neuroscientist*. 2012 Feb 1;18(1):82–97.
70. Even C, Schröder CM, Friedman S, Rouillon F. Efficacy of light therapy in nonseasonal depression: A systematic review. *Journal of Affective Disorders*. 2008 May;108(1–2):11–23.
71. Fonken LK, Finy MS, Walton JC, Weil ZM, Workman JL, Ross J, et al. Influence of light at night on murine anxiety- and depressive-like responses. *Behavioural Brain Research*. 2009 Dec 28;205(2):349–54.
72. Fonken LK, Kitsmiller E, Smale L, Nelson RJ. Dim Nighttime Light Impairs Cognition and Provokes Depressive-Like Responses in a Diurnal Rodent. *J Biol Rhythms*. 2012 Aug 1;27(4):319–27.
73. Foster RG, Hankins MW. Non-rod, non-cone photoreception in the vertebrates. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2002 Nov;21(6):507–27.

74. Frank E, Sidor MM, Gamble KL, Cirelli C, Sharkey KM, Hoyle N, et al. Circadian clocks, brain function, and development. *Ann NY Acad Sci.* 2013 Dec 1;1306(1):43–67.
75. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic determinants of sleep regulation in inbred mice. *Sleep.* 1999 Mar 15;22(2):155–69.
76. Franken P, Malafosse A, Tafti M. Genetic variation in EEG activity during sleep in inbred mice. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* 1998 Oct 1;275(4):R1127–R1137.
77. Freedman MS. Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):502–4.
78. Frey S, Birchler-Pedross A, Hofstetter M, Brunner P, Götz T, Münch M, et al. Challenging the sleep homeostat: Sleep in depression is not premature aging. *Sleep Medicine.* 2012 Aug;13(7):933–45.
79. Frey S, Birchler-Pedross A, Hofstetter M, Brunner P, Götz T, Münch M, et al. Young Women With Major Depression Live on Higher Homeostatic Sleep Pressure Than Healthy Controls. *Chronobiology International.* 2012 Apr;29(3):278–94.
80. Fu Y, Liao H-W, Do MTH, Yau K-W. Non-image-forming ocular photoreception in vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology.* 2005 Aug;15(4):415–22.
81. Fuller PM, Gooley JJ, Saper CB. Neurobiology of the Sleep-Wake Cycle: Sleep Architecture, Circadian Regulation, and Regulatory Feedback. *J Biol Rhythms.* 2006 Dec 1;21(6):482–93.
82. Fuller PM, Saper CB, Lu J. The pontine REM switch: past and present. *J Physiol.* 2007 Nov 1;584(3):735–41.

83. Gallin PF, Terman M, Remé CE, Rafferty B, Terman JS, Burde RM. Ophthalmologic examination of patients with seasonal affective disorder, before and after bright light therapy. *Am J Ophthalmol.* 1995 Feb;119(2):202–10.
84. Gardier AM, Bourin M. Appropriate use of “knockout” mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. *Psychopharmacology.* 2001 Jan 15;153(3):393.
85. Glickman G, Byrne B, Pineda C, Hauck WW, Brainard GC. Light Therapy for Seasonal Affective Disorder with Blue Narrow-Band Light-Emitting Diodes (LEDs). *Biological Psychiatry.* 2006 Mar 15;59(6):502–7.
86. Goeldner C, Lutz P-E, Darcq E, Halter T, Clesse D, Ouagazzal A-M, et al. Impaired Emotional-Like Behavior and Serotonergic Function During Protracted Abstinence from Chronic Morphine. *Biological Psychiatry.* 2011 Feb 1;69(3):236–44.
87. Golden RN, Gaynes BN, Ekstrom RD, Hamer RM, Jacobsen FM, Suppes T, et al. The Efficacy of Light Therapy in the Treatment of Mood Disorders: A Review and Meta-Analysis of the Evidence. *Am J Psychiatry.* 2005 Apr 1;162(4):656–62.
88. Gonzalez MMC, Aston-Jones G. Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. *PNAS.* 2008 Mar 25;105(12):4898–903.
89. Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB. A Broad Role for Melanopsin in Nonvisual Photoreception. *J Neurosci.* 2003 Aug 6;23(18):7093–106.
90. Gooley JJ, Mien IH, Hilaire MAS, Yeo S-C, Chua EC-P, Reen E van, et al. Melanopsin and Rod–Cone Photoreceptors Play Different Roles in Mediating Pupillary Light Responses during Exposure to Continuous Light in Humans. *J Neurosci.* 2012 Oct 10;32(41):14242–53.

91. Gorgulu Y, Caliyurt O. Rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy correlates with serum BDNF changes in major depression. *Brain Research Bulletin*. 2009 Sep 28;80(3):158–62.
92. Gronfier C. Physiologie de l'horloge circadienne endogène : des gènes horloges aux applications cliniques. *Médecine du Sommeil*. 2009 Jan;6(1):3–11.
93. Güler AD, Ecker JL, Lall GS, Haq S, Altimus CM, Liao H-W, et al. Melanopsin cells are the principal conduits for rod–cone input to non-image-forming vision. *Nature*. 2008 May 1;453(7191):102–5.
94. Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends in Neurosciences*. 2008 Jan;31(1):27–36.
95. Hannibal J. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res*. 2002 Jul 1;309(1):73–88.
96. Hannibal J, Fahrenkrug J. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res*. 2004 Apr 1;316(1):99–113.
97. Hariri AR. Genetic Polymorphisms: A Cornerstone of Translational Biobehavioral Research. *Sci Transl Med*. 2010 Feb 10;2(18):18ps6–18ps6.
98. Hatori M, Le H, Vollmers C, Keding SR, Tanaka N, Schmedt C, et al. Inducible Ablation of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells Reveals Their Central Role in Non-Image Forming Visual Responses. *PLoS ONE*. 2008 Jun 11;3(6):e2451.
99. Hatori M, Panda S. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends in Molecular Medicine*. 2010 Oct;16(10):435–46.
100. Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod–cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. 2003 Jul 3;424(6944):75–81.



101. Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau K-W, et al. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*. 2006;497(3):326–49.
102. Holmes A. Galanin GAL-R1 Receptor Null Mutant Mice Display Increased Anxiety-Like Behavior Specific to the Elevated Plus-Maze. *Neuropsychopharmacology*. 2003 Apr 9;28(6):1031–44.
103. Holmes A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2008 Sep;32(7):1293–314.
104. Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biological Psychiatry*. 2003 Nov 15;54(10):953–9.
105. Holmes A, Yang RJ, Murphy DL, Crawley JN. Evaluation of Antidepressant-related Behavioral Responses in Mice Lacking the Serotonin Transporter. *Neuropsychopharmacology*. 2002 Dec;27(6):914–23.
106. Hubbard J, Ruppert E, Gropp C-M, Bourgin P. Non-circadian direct effects of light on sleep and alertness: Lessons from transgenic mouse models. *Sleep Medicine Reviews*. 2013 décembre;17(6):445–52.
107. Jacobson LH, Cryan JF. Feeling Strained? Influence of Genetic Background on Depression-Related Behavior in Mice: A Review. *Behav Genet*. 2007 Jan 1;37(1):171–213.
108. Kalsbeek A, van der Spek R, Lei J, Endert E, Buijs RM, Fliers E. Circadian rhythms in the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012 février;349(1):20–9.

109. Karnas D, Hicks D, Mordel J, Pévet P, Meissl H. Intrinsic Photosensitive Retinal Ganglion Cells in the Diurnal Rodent, *Arvicanthis ansorgei*. PLoS ONE. 2013 août;8(8):e73343.
110. Kasahara T, Abe K, Mekada K, Yoshiki A, Kato T. Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010 Apr 6;107(14):6412–7.
111. Koorengevel KM, Beersma DGM, Boer D, A J, Hoofdakker VD, H R. Mood regulation in seasonal affective disorder patients and healthy controls studied in forced desynchrony. Psychiatry Research. 2003 Jan 25;117(1):57–74.
112. Koorengevel KM, Beersma DGM, Den Boer JA, Van Den Hoofdakker RH. Sleep in seasonal affective disorder patients in forced desynchrony: an explorative study. Journal of Sleep Research. 2002;11(4):347–56.
113. Kramer A, Yang F-C, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC, et al. Regulation of Daily Locomotor Activity and Sleep by Hypothalamic EGF Receptor Signaling. Science. 2001 Dec 21;294(5551):2511–5.
114. Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. Nature. 2008 Oct 16;455(7215):894–902.
115. Krishnan V, Nestler EJ. Linking Molecules to Mood: New Insight Into the Biology of Depression. Am J Psychiatry. 2010 Nov 1;167(11):1305–20.
116. Kronfeld-Schor N, Einat H. Circadian rhythms and depression: Human psychopathology and animal models. Neuropharmacology. 2012 Jan;62(1):101–14.
117. Lall GS, Revell VL, Momiji H, Al Enezi J, Altimus CM, Güler AD, et al. Distinct Contributions of Rod, Cone, and Melanopsin Photoreceptors to Encoding Irradiance. Neuron. 2010 May 13;66(3):417–28.

118. Lam MD, Levitt MBBS, Levitan MD, Enns MD, Morehouse MD, Michalak PD, et al. The Can-SAD Study: A Randomized Controlled Trial of the Effectiveness of Light Therapy and Fluoxetine in Patients With Winter Seasonal Affective Disorder. *Am J Psychiatry*. 2006 May 1;163(5):805–12.
119. Lam MD, F.R.C.P.C. ,Raymond, Levitt MBBS, F.R.C.P.C. ,Anthony, Levitan MD, F.R.C.P.C. ,Robert, Enns MD, F.R.C.P.C. ,Murray, Morehouse MD, F.R.C.P.C. ,Rachel, Michalak PD, Erin, et al. The Can-SAD Study: A Randomized Controlled Trial of the Effectiveness of Light Therapy and Fluoxetine in Patients With Winter Seasonal Affective Disorder. *Am J Psychiatry*. 2006 May 1;163(5):805–12.
120. Lam RW, Levitan RD. Pathophysiology of seasonal affective disorder: a review. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. 2000 Nov;25(5):469.
121. Lavoie M-P, Lam RW, Bouchard G, Sasseville A, Charron M-C, Gagné A-M, et al. Evidence of a Biological Effect of Light Therapy on the Retina of Patients with Seasonal Affective Disorder. *Biological Psychiatry*. 2009 Aug 1;66(3):253–8.
122. LeGates TA, Altimus CM, Wang H, Lee H-K, Yang S, Zhao H, et al. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*. 2012 Nov 22;491(7425):594–8.
123. LeGates TA, Fernandez DC, Hattar S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nat Rev Neurosci*. 2014 Jul;15(7):443–54.
124. Leproult R, Van Cauter E. Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism. In: Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, Maghnie M, Savage MO, editors. *Endocrine Development* [Internet]. Basel: KARGER; 2009 [cited 2014 Jul 19]. p. 11–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.scd-rproxy.u-strasbg.fr/pmc/articles/PMC3065172/>

125. Lewy AJ. Depressive disorders may more commonly be related to circadian phase delays rather than advances: Time will tell. *Sleep Medicine*. 2010 Feb;11(2):117–8.
126. Lewy AJ, Emens JS, Songer JB, Sims N, Laurie AL, Fiala SC, et al. Winter Depression: Integrating Mood, Circadian Rhythms, and the Sleep/Wake and Light/Dark Cycles into a Bio-Psycho-Social-Environmental Model. *Sleep Medicine Clinics*. 2009 Jun;4(2):285–99.
127. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(2):180–5.
128. Lobo MK, Nestler EJ, Covington III HE. Potential Utility of Optogenetics in the Study of Depression. *Biological Psychiatry*. 2012 Jun 15;71(12):1068–74.
129. Lockley SW, Evans EE, Scheer FAJL, Brainard GC, Czeisler CA, Aeschbach D. Short-wavelength sensitivity for the direct effects of light on alertness, vigilance, and the waking electroencephalogram in humans. *Sleep*. 2006 Feb;29(2):161–8.
130. Lockley SW, Arendt J, Skene DJ. Visual impairment and circadian rhythm disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2007 Sep;9(3):301.
131. Lok C. Vision science: Seeing without seeing. *Nature News*. 2011 Jan 19;469(7330):284–5.
132. Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB. A putative flip–flop switch for control of REM sleep. *Nature*. 2006 Jun 1;441(7093):589–94.
133. Lucas RJ. Regulation of the Mammalian Pineal by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science*. 1999 Apr 16;284(5413):505–7.
134. Lucas RJ. Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice. *Science*. 2003 Jan 10;299(5604):245–7.

135. Lucki I, Dalvi A, Mayorga AJ. Sensitivity to the effects of pharmacologically selective antidepressants in different strains of mice. *Psychopharmacology*. 2001 May 1;155(3):315–22.
136. Lupi D, Oster H, Thompson S, Foster RG. The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. *Nat Neurosci*. 2008 Sep;11(9):1068–73.
137. Magnusson A, Boivin D. Seasonal affective disorder: an overview. *Chronobiol Int*. 2003 Mar;20(2):189–207.
138. Malatynska E, Steinbusch HWM, Redkozubova O, Bolkunov A, Kubatiev A, Yeritsyan NB, et al. Anhedonic-like traits and lack of affective deficits in 18-month-old C57BL/6 mice: Implications for modeling elderly depression. *Experimental Gerontology*. 2012 Aug;47(8):552–64.
139. Malhi GS, Kuiper S. Chronobiology of mood disorders. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 2013;128:2–15.
140. Markov D, Goldman M. Normal sleep and circadian rhythms: neurobiologic mechanisms underlying sleep and wakefulness. *Psychiatr Clin North Am*. 2006 Dec;29(4):841–853; abstract vii.
141. Massart R, Mongeau R, Lanfumey L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Phil Trans R Soc B*. 2012 Sep 5;367(1601):2485–94.
142. McCarthy MJ, Welsh DK. Cellular Circadian Clocks in Mood Disorders. *J Biol Rhythms*. 2012 Oct 1;27(5):339–52.
143. Mignot E, Taheri S, Nishino S. Sleeping with the hypothalamus: emerging therapeutic targets for sleep disorders. *Nat Neurosci*. 2002 Oct 28;5:1071–5.

144. Miyazaki K, Itoh N, Ohyama S, Kadota K, Oishi K. Continuous Exposure to a Novel Stressor Based on Water Aversion Induces Abnormal Circadian Locomotor Rhythms and Sleep-Wake Cycles in Mice. *PLoS ONE*. 2013 Jan 30;8(1):e55452.
145. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. 1972 Jul 13;42(1):201–6.
146. Morin LP, Studholme KM. Separation of function for classical and ganglion cell photoreceptors with respect to circadian rhythm entrainment and induction of photosomnolence. *Neuroscience*. 2011 Dec 29;199:213–24.
147. Morin LP. Nocturnal Light and Nocturnal Rodents Similar Regulation of Disparate Functions? *J Biol Rhythms*. 2013 Apr 1;28(2):95–106.
148. Morselli L, Leproult R, Balbo M, Spiegel K. Role of sleep duration in the regulation of glucose metabolism and appetite. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010 Oct;24(5):687–702.
149. Morselli L, Leproult R, Balbo M, Spiegel K. Role of sleep duration in the regulation of glucose metabolism and appetite. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010 Oct;24(5):687–702.
150. Mrosovsky N, Hattar S. Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol Int*. 2003 Nov;20(6):989–99.
151. Muindi F, Zeitzer JM, Colas D, Heller HC. The acute effects of light on murine sleep during the dark phase: importance of melanopsin for maintenance of light-induced sleep. *Eur J Neurosci*. 2013 Jun 1;37(11):1727–36.
152. Mure LS, Rieux C, Hattar S, Cooper HM. Melanopsin-Dependent Nonvisual Responses: Evidence for Photopigment Bistability In Vivo. *J Biol Rhythms*. 2007 Oct 1;22(5):411–24.

153. Nayak SK, Jegla T, Panda S. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Jan 1;64(2):144–54.
154. Nelson A, Faraguna U, Zoltan J, Tononi G, Cirelli C. Sleep Patterns and Homeostatic Mechanisms in Adolescent Mice. *Brain Sciences.* 2013 Mar 19;3(1):318–43.
155. O’Leary OF, Cryan JF. Towards translational rodent models of depression. *Cell Tissue Res.* 2013 Oct 1;354(1):141–53.
156. Oren DA, Kozirowski M, Desan PH. SAD and the Not-So-Single Photoreceptors. *Am J Psychiatry.* 2013 Dec 1;170(12):1403–12.
157. Otsuka T, Goto M, Kawai M, Togo Y, Sato K, Katoh K, et al. Photoperiod Regulates Corticosterone Rhythms by Altered Adrenal Sensitivity via Melatonin-Independent Mechanisms in Fischer 344 Rats and C57BL/6J Mice. *PLoS ONE.* 2012 Jun 15;7(6):e39090.
158. Panda S. Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photic Responses in Blind Mice. *Science.* 2003 Jul 25;301(5632):525–7.
159. Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T. Illumination of the Melanopsin Signaling Pathway. *Science.* 2005 Jan 28;307(5709):600–4.
160. Panda S, Sato TK, Castrucci AM, Rollag MD, DeGrip WJ, Hogenesch JB, et al. Melanopsin (Opn4) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting. *Science.* 2002 Dec 13;298(5601):2213–6.
161. Peirson S, Foster RG. Melanopsin: Another Way of Signaling Light. *Neuron.* 2006 Feb 2;49(3):331–9.
162. Peirson SN, Bovee-Geurts PHM, Lupi D, Jeffery G, DeGrip WJ, Foster RG. Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Molecular Brain Research.* 2004 Apr 7;123(1–2):132–5.

163. Perrin F, Peigneux P, Fuchs S, Verhaeghe S, Laureys S, Middleton B, et al. Nonvisual Responses to Light Exposure in the Human Brain during the Circadian Night. *Current Biology*. 2004 Oct 26;14(20):1842–6.
164. Pickard GE, Baver SB, Ogilvie MD, Sollars PJ. Light-Induced Fos Expression in Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in Melanopsin Knockout (*Opn4<sup>-/-</sup>*) Mice. Mansvelder HD, editor. *PLoS ONE*. 2009 Mar 25;4(3):e4984.
165. Pillai V, Kalmbach DA, Ciesla JA. A Meta-Analysis of Electroencephalographic Sleep in Depression: Evidence for Genetic Biomarkers. *Biological Psychiatry*. 2011 Nov 15;70(10):912–9.
166. Plante DT, Goldstein MR, Landsness EC, Riedner BA, Guokas JJ, Wanger T, et al. Altered overnight modulation of spontaneous waking EEG reflects altered sleep homeostasis in major depressive disorder: A high-density EEG investigation. *Journal of Affective Disorders*. 2013 Sep 25;150(3):1167–73.
167. Plante DT, Landsness EC, Peterson MJ, Goldstein MR, Riedner BA, Wanger T, et al. Sex-related differences in sleep slow wave activity in major depressive disorder: a high-density EEG investigation. *BMC Psychiatry*. 2012;12(1):146.
168. Popa D, El Yacoubi M, Vaugeois J-M, Hamon M, Adrien J. Homeostatic Regulation of Sleep in a Genetic Model of Depression in the Mouse: Effects of Muscarinic and 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Activation. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Nov 9;31(8):1637–46.
169. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*. 1978 Feb 15;47(4):379–91.
170. Provencio I, Jiang G, Grip WJD, Hayes WP, Rollag MD. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *PNAS*. 1998 Jan 6;95(1):340–5.



171. Provencio I, Rodriguez IR, Jiang G, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD. A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *J Neurosci*. 2000 Jan 15;20(2):600–5.
172. Richards J, Gumz ML. Mechanism of the circadian clock in physiology. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2013 Jun 15;304(12):R1053–R1064.
173. Ripoll N, David DJP, Dailly E, Hascoët M, Bourin M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behavioural Brain Research*. 2003 Aug 14;143(2):193–200.
174. Rodgers R., Boullier E, Chatzimichalaki P, Cooper G., Shorten A. Contrasting phenotypes of C57BL/6J OlaHsd, 129S2/SvHsd and 129/SvEv mice in two exploration-based tests of anxiety-related behaviour. *Physiology & Behavior*. 2002 Nov;77(2–3):301–10.
175. Roecklein K, Wong P, Ernecoff N, Miller M, Donofry S, Kamarck M, et al. The post illumination pupil response is reduced in seasonal affective disorder. *Psychiatry Research*. 2013 Nov 30;210(1):150–8.
176. Roecklein KA, Carney CE, Wong PM, Steiner JL, Hasler BP, Franzen PL. The role of beliefs and attitudes about sleep in seasonal and nonseasonal mood disorder, and nondepressed controls. *Journal of Affective Disorders*. 2013 Sep 5;150(2):466–73.
177. Roecklein KA, Wong PM, Franzen PL, Hasler BP, Wood-Vasey WM, Nimgaonkar VL, et al. Melanopsin Gene Variations Interact With Season to Predict Sleep Onset and Chronotype. *Chronobiology International*. 2012 Oct;29(8):1036–47.
178. Roecklein KA, Wong PM, Miller MA, Donofry SD, Kamarck ML, Brainard GC. Melanopsin, photosensitive ganglion cells, and seasonal affective disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2013 Mar;37(3):229–39.

179. Roecklein KA, Wong PM, Miller MA, Donofry SD, Kamarck ML, Brainard GC. Melanopsin, photosensitive ganglion cells, and seasonal affective disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2013 Mar;37(3):229–39.
180. Rolls A, Borg JS, de Lecea L. Sleep and metabolism: Role of hypothalamic neuronal circuitry. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010 Oct;24(5):817–28.
181. Roseboom PH, Namboodiri MAA, Zimonjic DB, Popescu NC, R. Rodriguez I, Gastel JA, et al. Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Molecular Brain Research*. 1998 Dec 10;63(1):189–97.
182. Ruby NF, Brennan TJ, Xie X, Cao V, Franken P, Heller HC, et al. Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light. *Science*. 2002 Dec 13;298(5601):2211–3.
183. Sage D, Ganem J, Guillaumond F, Laforge-Anglade G, François-Bellan A-M, Bosler O, et al. Influence of the Corticosterone Rhythm on Photic Entrainment of Locomotor Activity in Rats. *J Biol Rhythms*. 2004 Apr 1;19(2):144–56.
184. Sage D, Maurel D, Bosler O. Involvement of the suprachiasmatic nucleus in diurnal ACTH and corticosterone responsiveness to stress. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2001 Feb 1;280(2):E260–E269.
185. Sage D, Maurel D, Bosler O. Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensitivity to ACTH. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2002 Feb 1;282(2):E458–E465.
186. Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Pozdeyev NV, Iuvone PM, Tosini G. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *European Journal of Neuroscience*. 2005;22(12):3129–36.

187. Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE. Sleep State Switching. *Neuron*. 2010 Dec 22;68(6):1023–42.
188. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1257–63.
189. Savelyev SA, Rantamäki T, Rytönen K-M, Castren E, Porkka-Heiskanen T. Sleep homeostasis and depression: Studies with the rat clomipramine model of depression. *Neuroscience*. 2012 Jun 14;212:149–58.
190. Schmidt TM, Chen S-K, Hattar S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends in Neurosciences*. 2011 Nov;34(11):572–80.
191. Schmidt TM, Do MTH, Dacey D, Lucas R, Hattar S, Matynia A. Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *J Neurosci*. 2011 Nov 9;31(45):16094–101.
192. Schneider B, Prvulovic D. Novel biomarkers in major depression: Current Opinion in Psychiatry. 2013 Jan;26(1):47–53.
193. Semo M, Gias C, Ahmado A, Sugano E, Allen AE, Lawrence JM, et al. Dissecting a Role for Melanopsin in Behavioural Light Aversion Reveals a Response Independent of Conventional Photoreception. *PLoS ONE*. 2010 Nov 29;5(11):e15009.
194. Sexton T, Buhr E, Van Gelder RN. Melanopsin and Mechanisms of Non-visual Ocular Photoreception. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Jan 13;287(3):1649–56.
195. Shea JL, Mochizuki T, Sagvaag V, Aspevik T, Bjorkum AA, Datta S. Rapid eye movement (REM) sleep homeostatic regulatory processes in the rat: Changes in the

sleep–wake stages and electroencephalographic power spectra. *Brain Research*. 2008 Jun 5;1213:48–56.

196. Sidor MM, Rilett K, Foster JA. Validation of an automated system for measuring anxiety-related behaviours in the elevated plus maze. *Journal of Neuroscience Methods*. 2010 Apr 30;188(1):7–13.

197. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*. 2011 Aug 25;476(7361):458–61.

198. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Spence DW, Hardeland R, Poeggeler B, et al. Pathophysiology of depression: Role of sleep and the melatonergic system. *Psychiatry Research*. 2009 Feb 28;165(3):201–14.

199. Stehle JH, Gall C von, Korf H-W. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: a comparative investigation. *Cell Tissue Res*. 2002 Jul 1;309(1):173–82.

200. Steiger A, Kimura M. Wake and sleep EEG provide biomarkers in depression. *Journal of Psychiatric Research*. 2010 Mar;44(4):242–52.

201. Stephenson KM, Schroder CM, Bertschy G, Bourgin P. Complex interaction of circadian and non-circadian effects of light on mood: Shedding new light on an old story. *Sleep Medicine Reviews*. 2012 Oct;16(5):445–54.

202. Strelakova T, Couch Y, Kholod N, Boyks M, Malin D, Leprince P, et al. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behavioral and Brain Functions*. 2011 Apr 27;7(1):9.

203. Strelakova T, Steinbusch HWM. Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2010 Mar 17;34(2):348–61.

204. Tanti A, Belzung C. Open questions in current models of antidepressant action. *British Journal of Pharmacology*. 2010;159(6):1187–200.
205. Tanti A, Belzung C. Hippocampal neurogenesis: a biomarker for depression or antidepressant effects? Methodological considerations and perspectives for future research. *Cell Tissue Res*. 2013 Oct 1;354(1):203–19.
206. Terman M, Terman JS. Light therapy for seasonal and nonseasonal depression: efficacy, protocol, safety, and side effects. *CNS Spectr*. 2005 Aug;10(8):647–663; quiz 672.
207. Thompson S, Foster RG, Stone EM, Sheffield VC, Mrosovsky N. Classical and melanopsin photoreception in irradiance detection: negative masking of locomotor activity by light. *European Journal of Neuroscience*. 2008 Apr 1;27(8):1973–9.
208. Tononi G, Cirelli C. Sleep function and synaptic homeostasis. *Sleep Medicine Reviews*. 2006 Feb;10(1):49–62.
209. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron*. 2014 Jan 8;81(1):12–34.
210. Touma C. Stress and Affective Disorders: Animal Models Elucidating the Molecular Basis of Neuroendocrine-Behavior Interactions. *Pharmacopsychiatry*. 2011 May 4;44(S 01):S15–S26.
211. Touma C, Fenzl T, Ruschel J, Palme R, Holsboer F, Kimura M, et al. Rhythmicity in Mice Selected for Extremes in Stress Reactivity: Behavioural, Endocrine and Sleep Changes Resembling Endophenotypes of Major Depression. *PLoS ONE*. 2009 Jan 29;4(1):e4325.
212. Tsai JW, Hannibal J, Hagiwara G, Colas D, Ruppert E, Ruby NF, et al. Melanopsin as a Sleep Modulator: Circadian Gating of the Direct Effects of Light on

Sleep and Altered Sleep Homeostasis in *Opn4*<sup>-/-</sup> Mice. *PLoS Biol.* 2009 Jun 9;7(6):e1000125.

213. Vandewalle G, Archer SN, Wuillaume C, Balteau E, Degueldre C, Luxen A, et al. Effects of Light on Cognitive Brain Responses Depend on Circadian Phase and Sleep Homeostasis. *J Biol Rhythms.* 2011 Jun 1;26(3):249–59.

214. Vandewalle G, Hébert M, Beaulieu C, Richard L, Daneault V, Garon M-L, et al. Abnormal Hypothalamic Response to Light in Seasonal Affective Disorder. *Biological Psychiatry.* 2011 Nov 15;70(10):954–61.

215. Vaugeois J-M, Passera G, Zuccaro F, Costentin J. Individual differences in response to imipramine in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology.* 1997 Dec 1;134(4):387–91.

216. Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology.* 2010 Mar;72(1):551–77.

217. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Dec;134(4):319–29.

218. Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C. The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [Internet]. [cited 2013 Nov 13]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763412002163>

219. Wimmer ME, Rising J, Galante RJ, Wyner A, Pack AI, Abel T. Aging in Mice Reduces the Ability to Sustain Sleep/Wake States. *PLoS ONE.* 2013 Dec 16;8(12):e81880.

220. Wirz-Justice A. Chronobiology and mood disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience.* 2003 Dec;5(4):315.

221. Wirz-Justice A. Biological rhythm disturbances in mood disorders: International Clinical Psychopharmacology. 2006 Feb;21(Supplement 1):S11–S15.
222. Wirz-Justice A. From the basic neuroscience of circadian clock function to light therapy for depression: On the emergence of chronotherapeutics. Journal of Affective Disorders. 2009 Aug;116(3):159–60.
223. Wirz-Justice A, Graw P, Kräuchi K, et al. Light therapy in seasonal affective disorder is independent of time of day or circadian phase. Arch Gen Psychiatry. 1993 Dec 1;50(12):929–37.
224. Workman JL, Nelson RJ. Potential animal models of seasonal affective disorder. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2011 Jan;35(3):669–79.
225. Yang M, Weber MD, Crawley JN. Light phase testing of social behaviors: not a problem. Front Neurosci [Internet]. 2008 [cited 2013 Nov 13];2. Available from: <http://www.frontiersin.org/neuroscience/10.3389/neuro.01.029.2008/abstract>
226. Zeitzer JM, Dijk D-J, Kronauer RE, Brown EN, Czeisler CA. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. J Physiol. 2000 Aug 1;526(3):695–702.
227. Zhang D-Q, Wong KY, Sollars PJ, Berson DM, Pickard GE, McMahon DG. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. PNAS. 2008 Sep 16;105(37):14181–6.
228. High Sensitivity of the Human Circadian Melatonin Rhythm to Resetting by Short Wavelength Light. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2003 Sep 1;88(9):4502–4502.

# **ANNEXES**



## **Annexe 1**

### **Protocoles de génotypage**

#### ***Procédure classique***

##### **Etape 1: Extraction de l'ADN**

1. Pour 0,5 cm de queue il faut ajouter

200-300 ml DPCR contenant (0,2-0,3 mg de Proteinase K poudre par ml)

25 à 50ml de solution de PK par ml de DirectPCR

Remarque : la PK est stable dans le réactif DirectPCR pendant 24 heures

2. Agiter les tubes dans l'agitateur à 55°C pendant 6 heures (jusqu'à lyse complète des tissus)

3. Incuber le lysat brut au bain-marie à 95°C pendant 15' (inactivation PK)

Centrifuger les tubes à 13000 tpm pendant 10' pour séparer les débris de la solution aqueuse. Récupérer le surnageant dans un tube propre.

Maintenir à -20°C .

##### **Etape 2 : Purification de l'ADN, mesure de la concentration**

L'étape de purification de l'ADN par précipitation à l'alcool permet de se débarrasser des sels, de la protéinase K et du SDS contenus dans le réactif DirectPCR. Cette purification est nécessaire pour que l'amplification par PCR puisse

se faire. La concentration et la qualité de l'ADN sont évaluées par mesure spectrophotométrique à 206 et 280 nm.

Purification de l'ADN :

Rajouter au surnageant préalablement collecté (300ml):

NaCl 0,2M (1/25=12ml) final (stock 5M)

Agiter

Rajouter 2vol (600ml) EtOH100

Agiter

Mettre à -20°C de 15-20' à ¥

Centrifuger 15-20' à 4°C à 13-15ktpm

Vider le tube pour éliminer le surnageant

(Lavage EtOH70 2 vol, agiter) répéter 2X

Centrifuger 15-20' à 4°C à 13-15ktpm après chaque lavage

Vider le tube pour éliminer le surnageant

Sécher à l'air 15-20'

Suspendre dans l'H<sub>2</sub>O : 300-500ml (400ml)

Utiliser 1ml d'ADN par PCR

Mesure de la concentration/pureté :

Ajouter 1ul d'ADN purifié dans 99 ul d'H<sub>2</sub>O

Mesurer la densité optique à 260 nm et 280 nm (spectrophotomètre BioRad).

Calculer le ratio 260/280. Ce dernier doit être entre 1.8 et 2.0 pour un ADN non contaminé par des protéines.

### **Etape 3: Préparation de la solution pour la PCR d'ADN**

Les amorces spécifiques sont stockées à une concentration de 1mM (solution stock).

Une dilution de travail est effectuée à une concentration de 10  $\mu$ M.

Préparation de la solution pour la PCR pour 1 échantillon

H<sub>2</sub>O: 18,1ml

Buffer (tampon): 2,5ml contenant le DMSO (Diméthylsulfoxyde) 2,5ml et MgCl<sub>2</sub> 25 mM de Fermentas<sup>®</sup>(

DNTPs ( deoxynucleotide triphosphates): 1ml

Amorce ou Primer Sens Mel4E3 (sauvage) ou todoneo (mutant): 1ml de la solution à 10mM (400nM final)

Amorce ou Primer Anti sens Mel2E4: 1ml de la solution à 10mM (400nM final)

Taq DNA polymérase: 0,4ml

1ml d'ADN génomique

Remarques :

Le tampon de la PCR (réaction en chaîne par polymérase) est nécessaire pour créer des conditions optimales pour l'activité de la Taq (ADN polymérase isolée chez une bactérie *Thermus aquaticus*). Il contient souvent du Tris-HCl, KCl et du MgCl<sub>2</sub>.

Le magnésium est un cofacteur requis pour la thermostabilisation de la DNA polymérase, la concentration du magnésium est un facteur crucial qui peut affecter le succès de l'amplification.

### **Etape 4: conditions de PCR**

Dénaturation 3' à 95°C  
 Dénaturation 30" à 95°C  
 Hybridation 30" à 62°C  
 Elongation 60" à 72°C  
 Elongation finale 3' à 72°C

} 30X

### **Etape 5: Analyse de l'amplification**

Après amplification, les fragments d'ADN sont analysés sur gel d'agarose (1%, Tris Borate EDTA) coloré au bromure d'éthidium (BE) et visualisés sous éclairage UV.

Longueurs des bandes lors de la migration/révélation

#### Souris mutante

Todoneo+Mel2 (amorce anti sens utilisée jusqu'en octobre 2010) =960bp

Todoneo+Mel2E4=919bp

#### Souris sauvages

Mel4 (amorce sens utilisée jusqu' octobre 2010) + Mel2 (amorce anti sens utilisée jusqu'en octobre 2010) =1731bp

Mel4E3+Mel2E4=289bp

L'allèle sauvage est analysé par les amorces suivantes :

Sens (Mel4E3)                    TCA-TCA-ACC-TCG-CAG-TCA-GC

Anti sens (Mel2E4)            CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG

L'allèle muté est analysé par les amorces suivantes

Sens (Todo Neo)                CCG-CTT-TTC-TGG-ATT-CAT-CGA-C

Anti sens (Mel2E4)            CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG

Si une bande Mel4E3 (WT) (gel Mel 4E3/Mel2E4) et une bande « todoneo » (gel Todoneo/Mel2E4) (Mutant) alors= +/-

Si 1 bande en Mel4E3, rien en « todoneo » alors = +/+

Si pas de bande Mel4E3 et 1 bande « todoneo » alors = -/-

Le protocole de génotypage décrit ci-dessus ne permettait pas de générer des données fiables et reproductibles. Nous avons alors opté pour un kit commercial complet de génotypage palliant ces défauts (Kit PCR Fermentas®) en conservant les mêmes amorces spécifiques.

### ***Procédure propre à l'utilisation du KIT de PCR Fermentas ®***

©Nous avons analysé les modalités de construction du modèle d'inactivation du gène de la mélanopsine que nous utilisons en repérant exactement l'emplacement des exons, des introns et la localisation de l'inactivation par la cassette IRES-LacZ-Néo (grâce au logiciel serial-cloner 2.1®) pour commander des amorces adaptées et pour mettre en évidence des brins de DNA suffisamment discriminants pour distinguer les WT des KO. Ceci avait pour objectif de pouvoir régler au mieux les températures de la PCR afin d'optimiser la procédure.

Dans un deuxième temps, compte tenu du nombre d'animaux nécessaires pour nos expériences et de la sélection préalable des animaux en fonction de leur génotype et de leur sexe (mâle homozygote), nous avons optimisé notre technique de génotypage par l'acquisition d'un KIT de génotypage Fast Tissue-to-PCR Kit

(Fermentas K1091®) qui permettait de procéder à nos PCR en un temps plus réduit de la lyse de la queue à la révélation et de gérer nos colonies avec plus de pertinence.

### **Etape 1 :**

Prélèvement de tissu :

5 mm de queues sont prélevés sur les animaux à P10 et conservés à -20°C jusqu'au génotypage.

### **Etape 2**

Extraction :

Le jour du génotypage, les queues sont remises à température ambiante, puis déposées dans une solution de 100 µL de Tissue Lysis Solution et 10µL de protéinase K et incubés 10min à température ambiante. Ensuite, les échantillons sont incubés 3 min à 95°C au bain marie puis neutralisés par addition de 100µL de Neutralization Solution T et la solution est homogénéisée à l'aide d'un vortex. La PCR est immédiatement réalisée.

### **Etape 3**

La PCR :

L'analyse des allèles sauvage et muté est réalisée dans deux puits différents.

L'allèle sauvage est analysé par les amorces suivantes :

Sens (Mel4E3) TCA-TCA-ACC-TCG-CAG-TCA-GC

Anti sens (Mel2E4) CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG

L'allèle muté est analysé par les amorces suivantes

Sens (Todo Neo) CCG-CTT-TTC-TGG-ATT-CAT-CGA-C

Anti sens (Mel2E4) CAA-AGA-CAG-CCC-CGC-AGA-AG

Le mix PCR est réalisé comme suit :

5 µL Tissue Green PCR MasterMix(x2)

0.5µL amorce sens à 1µM final

0.5µL amorce anti sens à 1µM final

1µL d'extrait tissulaire

3µL eau

La PCR est réalisée comme suit :

5 min à 95°C

40 Cycles répétant cette séquence (Dénaturation 95°C 30s,Hybridation 62°C 30s,  
Elongation 72°C 1 min)

Fin 72°C 10 min

Les étapes suivantes procèdent de la même manière que les étapes 5,6 et 7 de celles suivies lors de la PCR classique décrite ci-dessus.

Annexe 2  
**Tableaux synthétiques des données de la partie 1**

**Préférence sucrose**

PS (%) des groupes 1 à 10								
Opn4 +/+								
	n	T0	SEM	SEM/100	T7	SEM	T7/100	SEM/100
<10 lux	26,00	74,66	1,38	1,85	68,57	2,85	91,85	3,81
150 lux	17,00	75,76	1,03	2,10	76,62	1,46	101,14	4,73
600 lux	21,00	73,04	1,01	1,81	75,60	1,56	102,55	4,27

Opn4 -/-								
	n	T0	SEM	sem/100	T7	SEM	T7/100	sem/100
<10 lux	22,00	72,43	0,95	1,60	72,21	1,26	99,70	1,74
150 lux	10,00	72,01	1,89	3,08	73,13	3,08	101,56	4,27
600 lux	17,00	71,83	0,68	1,67	71,43	1,67	98,98	2,33

**FST**

FST						
	<10 lux		150 lux		600 lux	
	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-
n	26	37	17	12	19	20
Temps d'immobilité (sec)	130,23	130,57	63,53	111,57	52,94	123,34
sem	8,87	7,55	13,19	13,35	5,99	10,42

**TST**



	<b>TST</b>					
	<10lux		150 lux		600 lux	
	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-
n	26	37	17	12	19	20
Temps d'immobilité (sec)	215,61	133,94	103,58	205,49	120,17	163,86
sem	6,32	5,77	9,91	13,99	14,86	11,49

### **E+M**

	<b>E+M</b>					
	<10 lux		150 lux		600 lux	
	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-
n	37	37	19	12	24	20
Temps dans les bras ouverts (sec)	24,97	57,66	57,96	69,68	87,85	76,17
sem	3,83	5,91	10,09	14,54	8,27	8,00

**Préférence sucrose dans le cadre du test pharmacologique à la fluoxétine**

<b>Administration de Fluoxétine en IP pendant 3 jours après exposition en dim light</b>						
	Avant exposition		Après exposition		Après antidépresseur	
	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-
n	10,00	10,00	10,00	10,00	9,00	10,00
PS%	70,76	65,16	56,98	65,71	73,29	63,63
sem	-3,97	3,63	2,93	2,99	2,03	4,11

**Dosages de la corticostérone à ZT2 et à ZT10**

			<b>Dosage de corticostérone</b>					
			<10 lux		150 lux		600 lux	
			Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-	Opn4+/+	Opn4-/-
Base line	ZT2	n	5,00	5,00	5,00	3,00	5,00	5,00
		concentration ng/ml	8,14	14,22	6,46	5,17	6,82	15,19
		sem	2,13	6,77	0,97	0,17	1,45	5,53
	ZT10	n	5,00	5,00	5,00	4,00	5,00	5,00
		concentration ng/ml	56,75	76,93	50,46	51,58	41,11	63,20
		sem	9,40	13,90	9,33	8,40	6,89	10,78
après exposition	ZT2	n	5,00	5,00	5,00	3,00	5,00	5,00
		concentration ng/ml	30,02	45,29	5,00	6,62	5,84	12,17
		sem	30,89	48,91	0,00	1,62	0,84	3,07
	ZT10	n	5,00	5,00	5,00	3,00	5,00	5,00
		concentration ng/ml	32,65	56,16	44,36	47,34	48,15	50,19
		sem	33,53	59,79	4,08	11,76	12,13	9,71

**Activité locomotrice globale**

		<b>Répartition Jour/Nuit de l'activité locomotrice</b>					
		<10 lux		150 lux		600 lux	
		L	D	L	D	L	D
Opn4+/+	n	5		4		4	
	ALG	33,94	66,06	12,09	87,91	15,48	84,52
	Sem	3,81	3,81	2,74	2,74	2,74	2,74
Opn4-/-	n	5		5		4	
	ALG	21,91	78,09	14,83	85,17	24,45	75,55
	Sem	4,23	4,23	1,80	1,80	10,27	10,27

L=jour D=nuit

**L'influence des effets directs, non  
circadiens de la lumière et de la  
phototransduction mélanopsinergique  
sur l'humeur, la veille et le sommeil**

**RESUME**

Les troubles du sommeil et la dépression ont une forte interaction fonctionnelle et constituent un enjeu majeur de santé publique. La lumière influence la physiologie, le comportement, en particulier la locomotion, le sommeil et l'humeur, via des effets, circadiens (entraînement de l'horloge), mais aussi directs non-circadiens. L'objectif de ce travail a été de caractériser les effets directs non circadiens de la lumière sur les comportements, et d'évaluer le rôle des différents photorécepteurs impliqués. Des souris « melanopsin knockout » ont été exposées à différents niveaux de luminance (<10 lux, 150 lux, 600 lux) sans changer la phase du rythme circadien. Nos résultats montrent que l'intensité lumineuse influence positivement l'humeur, le sommeil, et la locomotion, avec à faible intensité lumineuse une altération de l'humeur et de l'homéostasie du sommeil. Ces effets sont principalement mélanopsine dépendants. Enfin, dans une perspective de recherche translationnelle, nous avons validé *Arvicanthis ansorgei* comme modèle d'étude du sommeil chez un rongeur diurne. Si elles sont confirmées chez l'homme, ces observations seront pertinentes pour optimiser l'utilisation de la lumière dans notre société et les indications de la luminothérapie.

Mots clés : lumière, effets directs, mélanopsine, sommeil, dépression

**RÉSUMÉ EN ANGLAIS**

Sleep regulations and mood disorders exert strong functional interactions, representing a major public health challenge. Light greatly influences physiology and behavior, including regulation of locomotion, sleep and mood. These non-visual effects are either, indirect through the phase shifting of circadian rhythms or direct. Our goal was to characterize the direct, non-circadian effects of light on behavior and to assess the contribution of the different photoreceptors involved. To achieve this, melanopsin knockout mice were exposed to different luminance (<10 lux, 150 lux, 600 lux) without changing the phase of circadian rhythm.. Our results indicate that light positively influences mood, locomotion and sleep, with lower light intensity leading to mood and sleep homeostasis alteration. These effects are primarily mediated by melanopsin-based phototransduction. Moreover, from a perspective of translational research, we characterized *Arvicanthis ansorgei* as a model for studying sleep in a diurnal rodent. If confirmed in humans, our observations will have applications for the clinical use of light as well as for societal lighting conditions.

Key words: light, direct and non circadian effects, melanopsin, sleep, depression