



Variation de l'expression génique au cours de l'hibernation du hamster d'Europe : un rôle des récepteurs à la mélatonine ?

Célia Gautier

► To cite this version:

Célia Gautier. Variation de l'expression génique au cours de l'hibernation du hamster d'Europe : un rôle des récepteurs à la mélatonine ?. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ011 . tel-01830074

HAL Id: tel-01830074

<https://theses.hal.science/tel-01830074>

Submitted on 4 Jul 2018

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.

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UPR 3212 - Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

THÈSE présentée par :

Célia GAUTIER

soutenue le **16 Avril 2018**

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

Discipline/S spécialité : Neurosciences

Variation de l'expression génique au cours de l'hibernation du hamster d'Europe : un rôle des récepteurs à la mélatonine ?

THÈSE dirigée par :

Dr Simonneaux Valérie

Directeur de Recherches, CNRS, Université de Strasbourg

Dr Boutin Jean

Directeur de la Prospective, Servier

RAPPORTEURS EXTERNES :

Dr Dardente Hugues

Chargé de Recherches, INRA Val de Loire

Dr Jockers Ralf

Directeur de Recherches, Institut Cochin

EXAMINATEUR INTERNE :

Dr Habold Caroline

Directeur de Recherches, Université de Strasbourg

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Guénin Sophie - Pénélope

Attaché scientifique pharmacologie, Servier



Institut De Recherches Servier
Institut des Neurosciences Cellulaires et
Intégratives

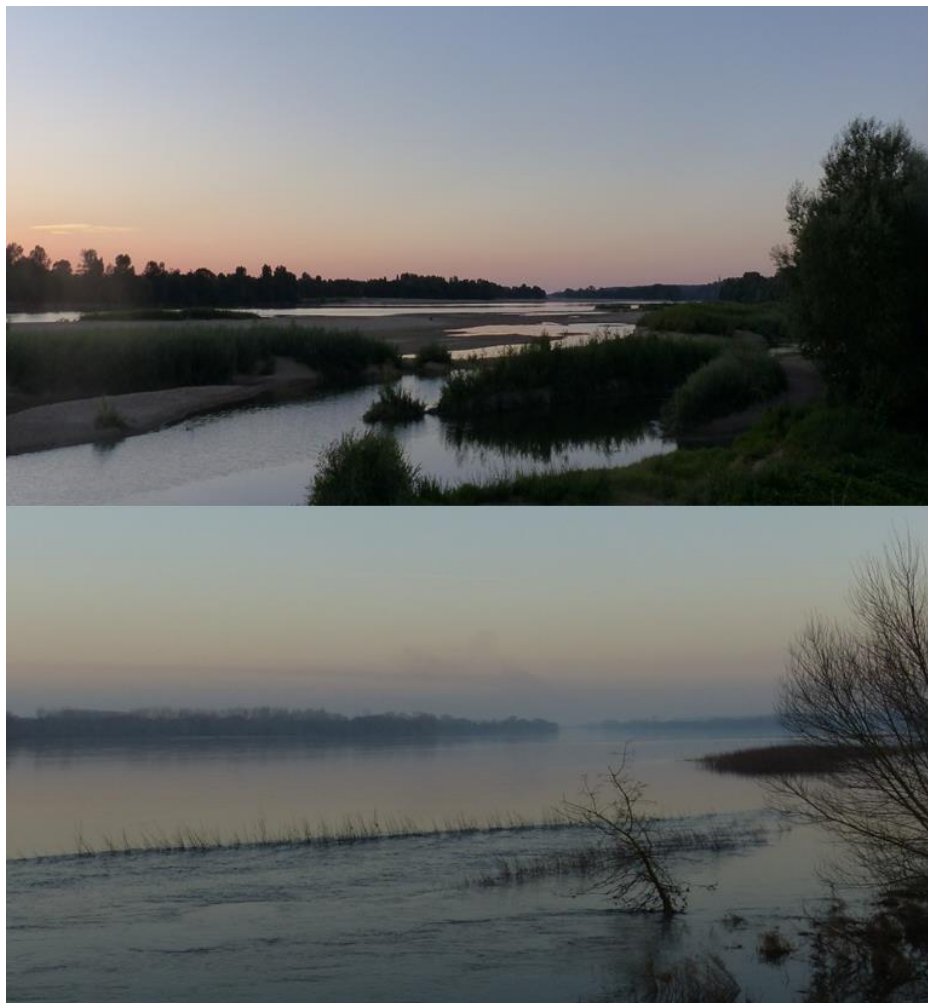


Thèse présentée par Célia GAUTIER pour obtenir le grade de :

Docteur de l'université de Strasbourg.

Dirigée par Jean A. Boutin, Sophie-Pénélope Guénin et Valérie Simonneaux.

**Variation de l'expression génique au cours de l'hibernation du
hamster d'Europe : un rôle des récepteurs à la mélatonine ?**



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury, les rapporteurs, Dr. Hugues Dardente et Dr. Ralf Jockers d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, ainsi que Dr. Caroline Habol pour nos échanges lors de mes soutenances de mi thèse et de thèse.

Un immense merci à mes directeurs de thèse Jean Boutin, Sophie Pénélope Guénin et Valérie Simonneaux pour votre confiance et votre aide précieuse pendant ces 4 années.

Jean, je voudrais sincèrement vous remercier pour vos encouragements, votre bienveillance, vos conseils et le fameux « et la tête !!!?? ». Merci d'avoir fait en sorte qu'il n'y ait jamais de problèmes mais uniquement des solutions ! J'ai cherché la tête, beaucoup, je finirai par la trouver !!

Sophie, un immense merci, pour tout ! Tout à commencer avec un ornithorynque qui liait la mélatonine. Merci de m'avoir guidée dans le monde la biologie moléculaire, des récepteurs à la mélatonine. Merci d'avoir été présente au quotidien, pour les bons moments passés au sein de la plateforme (je ne citerai pas les attaques de post-it ou de scotch, tes schémas que peu de gens comprennent...) et pour nos riches et enflammées discussions scientifiques.

Valérie, merci de m'avoir guidé dans le monde des neurosciences, des rythmes biologiques et de l'hibernation. Merci de m'avoir accueilli dans votre équipe, pour soutien et pour votre aide précieuse lors de la rédaction.

Je voudrais également remercier Olivier Nosjean, Jean-Philippe Stephan, Jean-Pierre Galizy pour votre accueil dans leur équipe et leurs précieux conseils.

Chantal, merci d'avoir toujours été présente au quotidien, merci pour tes encouragements, pour nos longues discussions sur des sujets divers et variés. Nous avons commencé ensemble notre voyage dans le monde de la BM, je te souhaite plein de belles choses pour la suite.

Merci à Isabelle de m'avoir formé aux techniques de biologie moléculaire.

Un grand merci à Sarah, représentante de notre Bretagne adorée, pour ta bonne humeur au bureau et pour ton aide si précieuse lors de mes innombrables transfections !!! Je te souhaite beaucoup de bonheur pour cette année particulière !

Je voudrais également remercier Albane pour ton aide dans un moment fatidique de ma thèse. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite de ta thèse.

Un grand merci à Damien pour ton aide si précieuse dans l'analyse de données, merci pour ton implication dans tout l'aspect statistiques de cette étude et puis on aura beaucoup ri !!

Je voudrais également remercier Céline et Elodie pour m'avoir guidé dans le monde de la radioactivité ! Merci Elo, de m'avoir soutenue quand le compteur me faisait des misères et d'avoir fait en sorte que je ne contamine rien ni personne et surtout pour ta gentillesse et ta bonne humeur !!

I would like to thank Frank Grützner and Tahlia Perry for our very constructive collaboration.

Merci à Catherine Dacquet et Schuster-Klein pour votre aide dans l'analyse des données.

Comment ne pas remercier, Mlle Dupré, d'un point de vue professionnel tout d'abord, merci de m'avoir formé aux joies de la culture cellulaire (vive les multitrays, nan je rigole), merci pour les heures passées à corriger mon manuscrit et à aligner mes diapos !!! Et personnellement évidemment, part quoi commencer, nos discussions interminables sur tout et n'importe quoi durant lesquelles on refaisait le monde souvent dans des lieux improbables... Merci pour nos fous rires en salle de culture (agent 007) et ailleurs !! Merci de m'avoir supporté quand c'était un peu compliqué, bref ILYLYA !!!

Mais également un énorme merci à Céline Ortéga (vive l'UTC !), merci pour nos déjeuners du vendredi si important pour moi ! Merci d'être toi ! Merci pour ta gentillesse, ton soutien, tes encouragements, et de m'avoir fait rire avec toutes tes péripéties !! Hâte de reprendre nos habitudes !!

Preety, merci pour ta bonne humeur (et ton amour pour Ed Sheeran), pour nos fous rires (c'est réservé au plus de 40 ans !!), merci d'avoir toujours répondu présente. Je te souhaite le meilleur pour ta fin de thèse !!!!

Merci à Marie d'avoir été présente pendant la dernière ligne droite, tes conseils ont été précieux !!

Merci à Véronique, Nadège et Christine pour les bons moments passés ensemble.

Ma Servane, merci de ton soutien indéfectible malgré les 16 738km qui nous ont séparé pendant ces 3 ans. Merci d'être un de mes piliers depuis plus de 10 ans !! Le plus beau arrive pour toi cette année !

Docteur Carine, merci pour ta présence malgré la distance, nos pauses sushis, nos petits verres en terrasse, nos discussions sur la thèse et tout le reste !! We did it !!!

Merci à mes amies de Paris et d'ailleurs pour tous les bons moments ensemble : Sabine, Pauline, Sophie ; mes girls de Jussieu : Angéline, Charlotte et Joanna. Un grand merci à la team ICM, Agnès, Caro, Delphine, Elodie, Léna, Tom pour nos bières frites qui m'ont fait découvrir Paris, enfin surtout le périph ! Merci à la team Alsacienne, Marion, nos pauses goûter m'ont manquées, Edith, Jo et Stéphanie. Thank you Jitka ! Et tous les autres !!

Merci à toutes les personnes de l'IdRS que j'ai pu croiser pendant ces trois ans : Patricia, Isabelle, Anne, Sylvie, Olivier, Séverine, Chantal, Coralie, Marie, Nicole, Alain, Thierry, Laurent, Anne Cécile, Eric, Alicia, Benjamin, Lisa, Sofia, Xavier, Sylvie, Sandra, William, Bopha, Jean, Xavier M.

Merci infiniment à ma famille (A., M., AS., O., JM., A, MF, J), mes parents, mon frère pour votre soutien, vous êtes mes piliers.

Le dernier mot que j'écirais de ce manuscrit sera : MERCI !!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

RESUME

La synchronisation des fonctions biologiques avec l'environnement est un élément indispensable à la survie d'un individu et à la pérennité des espèces. Cette synchronisation nécessite d'anticiper les périodes durant lesquelles les conditions environnementales seront défavorables, en particulier lors d'une disponibilité en nourriture réduite. Dans un contexte saisonnier, certains animaux vont montrer des phases annuelles de migration quittant leurs zones de reproduction vers des zones d'hivernage où les conditions environnementales sont plus propices, d'autres restent sur place mais réduisent leur activité métabolique par de longues phases de torpeur hivernale, un phénomène appelé hibernation. Mon projet de thèse consistait à étudier les mécanismes génétiques associés au comportement saisonnier de l'hibernation.

Lorsque les conditions environnementales sont difficiles, les hibernants cessent toute activité pendant une période définie et entrent dans un état de vie ralentie durant lequel toutes leurs fonctions physiologiques sont considérablement réduites. Les changements physiologiques associés à ce comportement sont extrêmement profonds que ce soit au niveau de la régulation de la température corporelle, du métabolisme mais également dans la préservation des organes. L'ensemble des processus régulateurs impliqués sont encore mal connus. Nous avons choisi d'étudier les variations de l'expression d'une sélection de gènes pendant les différentes phases d'hibernation chez un rongeur vivant en Alsace, le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*), lorsqu'il est soumis en laboratoire à une photopériode courte et une température basse, mimant des conditions hivernales.

De façon générale, les rythmes saisonniers dépendent des changements annuels de la production nocturne de la mélatonine, une neurohormone synthétisée par la glande pinéale. Le rythme à la fois journalier et saisonnier de la mélatonine lui confère un rôle primordial dans la synchronisation de nombreuses fonctions biologiques, le rythme veille/sommeil, l'activité métabolique, la reproduction, les sécrétions hormonales. Chez les mammifères, elle agit via deux récepteurs MT1 et MT2. Le récepteur MT1 est le plus étudié et considéré comme le principal acteur de la régulation des rythmes circadiens et saisonniers. Il est en particulier impliqué dans la transmission de l'information photopériodique qui conditionne les phénotypes hivernaux tels que la torpeur ou la restriction métabolique. Le rôle du récepteur MT2 est moins connu car chez certains hamsters saisonniers, ce dernier est non fonctionnel et considéré comme Knockout (KO) naturel. Des travaux préliminaires de notre laboratoire indiquent que le récepteur MT2 du hamster d'Europe est fonctionnel compte tenu de l'absence de codon stop prématuré dans l'exon 2. Nous avons donc réalisé sa caractérisation pharmacologique.

Mes travaux de thèse comportent deux parties, la première consiste en l'étude des variations de l'expression de 21 gènes associés à plusieurs fonctions (horloge, métabolisme, hormones thyroïdiennes, action de la mélatonine) durant les différentes phases de l'hibernation du hamster d'Europe ; la deuxième partie comprend le clonage et la caractérisation pharmacologique des récepteurs MT1 et MT2 du hamster d'Europe (Figure 1).

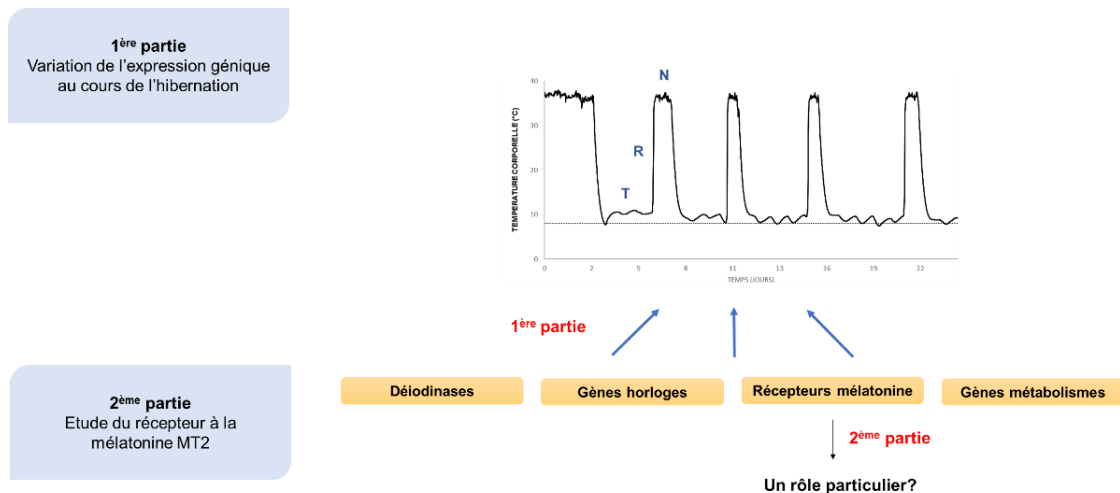


Figure 1 : Organisation du projet de thèse.

Chez les mammifères vivipares, un troisième type de récepteur à la mélatonine a été mis en évidence, le récepteur orphelin GPR50. Ce récepteur est homologue au récepteur Mel1c exprimé chez des animaux ovipares (xénopes, poissons et oiseaux). Parallèlement aux deux sujets principaux de ma thèse, j'ai caractérisé le GPR50 de l'ornithorynque, seul mammifère avec l'échidné à pondre des œufs, afin d'évaluer son degré de similarité avec le Mel1c.

1ère partie : Etude des variations de l'expression génique pendant les différentes phases d'hibernation du hamster d'Europe

L'hibernation est une stratégie physiologique mise en place par de nombreux animaux afin de faire face à des conditions environnementales très défavorables. L'entrée en hibernation est conditionnée par une augmentation de la production nocturne de mélatonine, reflet d'une diminution de la photopériode, d'un abaissement important de la température extérieure et d'une horloge circannuelle. Pendant les phases de torpeur, les hibernants, comme le hamster d'Europe, limitent sévèrement leur consommation d'énergie en diminuant de manière drastique à la fois leur température corporelle et leur métabolisme. Ces phases de torpeur sont systématiquement interrompues par de courtes périodes d'éveil, extrêmement couteuses en énergie mais indispensables à leur survie.

L'objectif de mon projet était de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de ce phénomène physiologique en analysant les variations de l'expression génique au cours de l'hibernation chez le hamster d'Europe. Dans cette optique, nous avons mis en place les conditions environnementales permettant l'hibernation du hamster d'Europe (photopériode courte avec 8 h de lumière et 16 h d'obscurité, température extérieure de 8°C) et suivi sur plusieurs semaines leur comportement caractérisé par des cycles réguliers de plusieurs jours de torpeur (animal inactif avec une température corporelle autour de 8°C) et de normothermie (animal actif entre les épisodes de torpeur, avec une température corporelle autour de 36°C). Nous avons prélevé 8 organes (cortex cérébral, hypothalamus, hypophyse, rétine, foie, cœur, tissu adipeux brun, glandes surrénales) à trois stades d'hibernation : normothermie, torpeur et éveil (sortie de torpeur avec une température corporelle entre 15 et 20°C). Grâce aux éléments de la littérature, nous avons déterminés 21 gènes potentiellement impliqués dans l'hibernation

que nous avons cloné et dont la séquence a été déposée dans la banque de données GenBank. Les variations d'expression de ces gènes ont été analysées par la technique de digital droplet PCR (ddPCR) sur chacun des organes prélevés. La ddPCR repose sur le partitionnement de l'échantillon en 20 000 gouttes, constituant ainsi autant de réactions de PCR indépendantes. Cette technique permet une quantification absolue de l'ARNm d'intérêt de manière précise et fiable, tout en s'affranchissant des courbes standards. Nous avons également prélevé le sang de ces animaux pour analyser les éventuelles variations hormonales (leptine, glucose, mélatonine, hormones thyroïdiennes et insuline) au cours des différentes phases de l'hibernation. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence des variations d'expression génique spécifiques des différentes phases de l'hibernation.

Les gènes impliqués dans l'horloge circadienne, particulièrement les gènes *Period*, sont surexprimés pendant l'éveil dans l'ensemble des organes. L'horloge circadienne étant « arrêtée » pendant l'hibernation, ces résultats suggèrent que ces gènes ont un rôle majeur dans l'entraînement de l'horloge circadienne au moment de la phase d'éveil. L'étude de la variation des gènes codant pour les récepteurs à la mélatonine a montré que l'expression de MT2 varie en fonction des différentes phases de l'hibernation alors que l'expression du récepteur MT1 reste constante. L'expression de MT2 augmente dans les structures centrales lors de l'éveil mais diminue dans les organes périphériques lors de la torpeur et l'éveil suggérant un rôle différent selon les organes centraux ou périphériques du récepteur MT2 dans le processus d'hibernation.

Les hormones thyroïdiennes sont largement impliquées dans les variations physiologiques et comportementales dépendantes des saisons, en particulier via la régulation des déiodinases hypothalamiques. De manière générale, la diminution de la production de mélatonine au printemps entraîne une activation la déiodinase 2 qui convertit l'hormone thyroïdienne T4 (thyroxine) inactive en T3 (triiodothyronine) active, et une inhibition de la déiodinase 3 qui dégrade les hormones thyroïdiennes. Cette régulation des déiodinases entraîne une augmentation de la synthèse de T3 hypothalamique induisant ainsi un phénotype printemps/été. Chez le hamster sibérien, une augmentation de T3 hypothalamique entraîne une diminution de l'occurrence des épisodes de torpeur. Chez le hamster d'Europe, nous avons observé une diminution générale (excepté pour la rétine et le foie) de l'expression de la déiodinase 2, pendant les phases de torpeur/arousal indiquant une diminution de la synthèse de T3. De plus, dans le tissu adipeux brun et le cœur l'expression de la déiodinase 3 est augmentée pendant l'éveil, suggérant une inhibition plus forte de la synthèse T3. Au niveau plasmatique néanmoins, aucune variation du taux d'hormones thyroïdiennes n'a été mise en évidence, suggérant un rôle très local de ces hormones.

Concernant les gènes du métabolisme, des variations d'expression différentielles ont été observées entre les trois phases de l'hibernation pour les différents organes, suggérant des stratégies métaboliques différentes selon les organes. Néanmoins, nos données indiquent que l'expression des gènes du métabolisme est généralement diminuée pendant la torpeur dans l'hypothalamus et la rétine, et que dans le tissu adipeux brun l'expression de ces gènes, notamment ceux impliqués dans la thermogenèse sont augmentés lors de l'éveil, probablement en réponse à une demande calorifique importante.

Dans l'ensemble, mes résultats ont permis de mettre en évidence la signature moléculaire de chacune des phases de l'hibernation et apportent de nouveaux éléments de discussion dans la compréhension du phénomène d'hibernation. Cette étude fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis en Février 2018.

2^{ème} partie : Etude des récepteurs à la mélatonine du hamster d'Europe

Les récepteurs à la mélatonine ont été étudiés chez plusieurs espèces dites conventionnelles comme la souris, le rat ou le mouton. Depuis les années 90, il est admis que chez les hamsters, le récepteur MT2 est un KO naturel. En effet, Weaver et ses collaborateurs ont mis en évidence chez le hamster sibérien la présence d'un codon stop prématuré, au niveau du domaine transmembranaire 4, ayant pour conséquence la production d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. Ces éléments ont conduit à l'hypothèse de la non implication du récepteur MT2 dans les fonctions saisonnières chez les hamsters sibériens.

Mon étude précédente sur les variations de l'expression génique pendant les différentes phases d'hibernation suggère un rôle particulier du récepteur MT2 chez le hamster d'Europe. Afin d'explorer la présence ou non d'un codon stop prématuré dans la séquence de ce récepteur, l'exon 2 de ce dernier a été cloné et de manière très surprenante, aucun codon stop prématuré n'a été retrouvé. Nous avons tenté de cloner entièrement ce récepteur, mais seule une séquence partielle de l'exon 1 a pu être obtenue. Grâce à ces premiers résultats et aux séquences publiées dans les banques de données, une séquence chimérique du récepteur MT2 de hamster d'Europe a été construite et exprimée transitoirement dans des cellules COS7. Elle est constituée à 85% de la séquence du récepteur du hamster européen (obtenue par séquençage) et à 15% d'une séquence consensus issue de six espèces : *Marmotta marmotta* (XM_015489993), *Cricetulus griseus* (XM_007636225), *Rattus rattus* (NM_001100641), *Peromyscus maniculatus bairdii* (XM_006990545), *Microtus ochrogaster* (XM_005347416), *Mus musculus* (AB377226). Les expériences de radioliation ont mis en évidence une liaison faible de la mélatonine sur ce récepteur, suggérant que le MT2 du hamster d'Europe est fonctionnel. Cette étude fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis en début 2018.

A la différence des autres espèces de hamster, il semble que le hamster d'Europe possède, au moins d'un point de vue génique, un récepteur MT2 complet avec sept domaines transmembranaires.

Au regard des résultats de ces deux projets, nous pouvons conclure que le hamster d'Europe possède un récepteur MT2 fonctionnel dont l'expression varie de façon différentielle entre les structures centrales et périphériques selon les différentes phases de l'hibernation. Ces observations suggèrent que le récepteur MT2 pourrait jouer un rôle spécifique dans l'hibernation du hamster d'Europe.

Projet satellite : Etude du récepteur Mel1c de l'ornithorynque

En complément des deux projets précédents, j'ai étudié un récepteur particulier associé à la mélatonine, le récepteur GPR50 de l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*).

Chez les mammifères, le récepteur GPR50 a une séquence peptidique proche de celles des récepteurs MT1 et MT2, mais a perdu sa capacité à lier la mélatonine et reste donc à ce jour toujours orphelin (sans ligand naturel identifié). Son orthologue, le récepteur Mel1c, exprimé chez les amphibiens, poissons et oiseaux, lie la mélatonine avec une affinité proche du nanomolaire. Les causes de la perte de fonctionnalité du récepteur GPR50 sont encore inconnues. L'évolution génique, quand elle est rapide, est souvent liée à des modifications des processus de la reproduction. Ainsi, le passage de l'oviparité à la viviparité a impliqué de profonds bouleversements dont l'évolution de Mel1c en GPR50 pourrait en faire partie. Dans l'arbre phylogénique, l'ornithorynque a une place particulière, car cet animal est, avec l'échidné, le seul mammifère à pondre des œufs. Les monotrèmes se seraient séparés de la branche principale des mammifères il y a 180 millions d'années.

Le récepteur GPR50 de l'ornithorynque a été cloné et son profil pharmacologique, en particulier sa capacité à lier la mélatonine, a été déterminé afin d'évaluer s'il présentait des similitudes pharmacologiques avec les récepteurs MT1 ou MT2. Ces expériences ont permis de mettre en évidence la capacité du récepteur GPR50 de l'ornithorynque à lier la mélatonine d'une manière comparable au récepteur Mel1c du xénope lisse (*Xenopus laevis*) et de la poule (*Gallus gallus*). Nous avons comparé les profils pharmacologiques de ces 3 espèces en utilisant un ensemble d'une dizaine de ligands. Ces 3 profils originaux démontrent pour la première fois qu'un mammifère ovipare, l'ornithorynque, possède un récepteur GPR50 liant la mélatonine avec un profil pharmacologique semblable au récepteur MT1 humain. Ce travail, publié dans le journal Plos One, apporte de nouveaux éléments dans la compréhension du lien complexe entre le récepteur orphelin GPR50 et son orthologue Mel1c ainsi que sur l'évolution des mammifères monotrèmes.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles

Gene expression profiling during hibernation in the european hamster - *Article soumis en Février 2018 dans le journal Scientific Reports (en révision).*

Célia Gautier, Béatrice Bothorel, Dominique Ciocca, Albane Gaudeau, Clémence Dupré, Giulia Lizzo, Chantal Brasseur, Isabelle Riest-Fery, Jean-Philippe Stephan, Damien Valour, Jean A. Boutin, Sophie-Pénélope Guenin, Valérie Simonneaux

“The molecular path” for cloning the european hamster melatonin receptors 1 and 2- *En préparation.*

Célia Gautier, Emilie Dufour, Clémence Dupré, Giulia Lizzo, Céline Legros, Sarah Caignard, Isabelle Riest-Fery, Chantal Brasseur, Philippe Delagrangé, Olivier Nosjean, Valérie Simonneaux, Jean A. Boutin, Sophie-Pénélope Guenin.

Characterization of the Mel1C melatoninergetic receptor in platypus (Ornithorhynchus anatinus) - *Publié dans le journal Plos One Février 2018.*

Célia Gautier, Sophie-Pénélope Guenin, Isabelle Riest-Fery, Tahlia Jade Perry, Céline Legros, Olivier Nosjean, Valérie Simonneaux, Frank Grützner, Jean A. Boutin.

Posters

Characterization of the platypus receptor Mel1C. Célia Gautier, Sophie-Pénélope Guenin, Isabelle Riest-Fery, Valérie Simonneaux, Olivier Nosjean, Jean A. Boutin.

44^{ème} Congrès de la société Francophone de Chronobiologie. Octobre 2014. Paris, France.

Journée thématique de la Société de Neuroendocrinologie. Septembre 2014. Paris, France.

Gene expression profiling during European hamster's hibernation. Gautier C, Bothorel B, Ciocca D, Ducrot P, Gaudeau A, Riest-Féry I, Brasseur C, Stephan J-P, Nosjean O, Simonneaux V, Boutin J.A., Guénin S-P.

45^{ème} Congrès de la société Francophone de Chronobiologie. Septembre 2016. Strasbourg, France.

Séquences publiées dans la banque de données GenBank

Les numéros d'accès des séquences soumises pour publication dans les banques de données sont donnés dans la Table 1. Les détails de ces séquences sont quant à eux regroupés dans l'Annexe 1.

Numéros d'accèsion GenBank	Gènes	Auteurs
MG598307	[<i>Cricetus cricetus</i>] Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2) mRNA,partial CDS	Gautier,C. , Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.
MG598308	[<i>Cricetus cricetus</i>] Leptin receptor (Lepr) mRNA,partial CDS	
MG598309	[<i>Cricetus cricetus</i>] Fibroblast growth factor 21 (Fgf21) mRNA,partial CDS	
MG598310	[<i>Cricetus cricetus</i>] Thioredoxin interacting protein (Txnip) mRNA,partial CDS.	
MG598311	[<i>Cricetus cricetus</i>] Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (Ppargc1a) mRNA,partial CDS.	
MG598312	[<i>Cricetus cricetus</i>] Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara) mRNA,partial CDS	
MG598313	[<i>Cricetus cricetus</i>] Uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA,partial CDS	
MG598314	[<i>Cricetus cricetus</i>] sirtuin 1 (Sirt1) mRNA,partial CDS	
MG598315	[<i>Cricetus cricetus</i>] circadian locomotor output cycles protein kaput (Clock) mRNA,partial CDS	
MG598316	[<i>Cricetus cricetus</i>] Period circadian protein 2 (Per2) mRNA,partial CDS	
KT992792	[<i>Cricetus cricetus</i>] NAD(P)H dehydrogenase quinone 2 mRNA, partial CDS	Dupre,C. , Gautier,C. , Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.
MG598317	[<i>Cricetus cricetus</i>] G protein-coupled receptor 50 (Gpr50) mRNA,partial CDS	
MG598318	[<i>Cricetus cricetus</i>] period circadian clock 1 (Per1) mRNA,partial CDS	
MG598319	[<i>Cricetus cricetus</i>] actin beta (Actb) mRNA,partial CDS	Lizzo,G. , Gautier,C. , Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.
MG598320	[<i>Cricetus cricetus</i>] BmalI aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like (Arlt1) mRNA,partial CDS	
MG598321	[<i>Cricetus cricetus</i>] tubulin alpha 1B (Tuba1b) mRNA,partial CDS	
MG598322	[<i>Cricetus cricetus</i>] Melatonin receptor 1A (Mtnr1a) mRNA, complete CDS	Gautier,C. , Dupre,C., Dufour,E., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.
MG598323	[<i>Cricetus cricetus</i>] Melatonin receptor 1B (Mtnr1b) mRNA, partial CDS	
MG784343	[<i>Ornithorhynchus anatinus</i>] Melatonin receptor type 1C (Mel-1c) mRNA, complete CDS	Gautier,C. , Riest-Fery,I., Nosjean,O., Simonneaux,V., Grutzner,F., Boutin,J.A. and Guenin,S.-P.

Table 1 : Liste des numéros d'accèsion GenBank de l'ensemble des séquences soumises à publication.

AVANT PROPOS

Cette thèse CIFRE est le fruit d'une collaboration entre les laboratoires Servier et l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives de Strasbourg (INCI). Ce dernier possède une plateforme d'hébergement et d'exploration fonctionnelle de rongeurs permettant l'étude des rythmes biologiques : le Chronobiotron. Les conditions environnementales (photopériode, température...) sont finement contrôlées pour mimer les conditions naturelles dans le but d'étudier les rythmes biologiques journaliers et saisonniers tels que l'hibernation. L'équipe « Mélatonine et Rythmes Saisonniers », dirigée par Valérie Simonneaux, s'intéresse aux relations entre la mélatonine et les rythmes saisonniers, en particulier la reproduction [pour revue (Hazlerigg and Simonneaux, 2015b)]. Toutes les expériences sur les animaux ont été réalisées au Chronobiotron par Béatrice Bothorel, Dominique Ciocca et Valérie Simonneaux.

La mélatonine et ses récepteurs sont depuis longtemps un sujet d'étude très important pour les laboratoires Servier, comme en témoignent les nombreux articles publiés sur ce sujet (Audinot et al., 2008; Boutin et al., 2005, 2017; Cogé et al., 2009; Devavry et al., 2012; Nosjean et al., 2000). Ces études ont abouti à la mise sur le marché d'une nouvelle classe d'anxiolytique et d'antidépresseurs, le Valdoxan® (Agomelatine) un agoniste aux récepteurs mélatoninergiques (Buoli et al., 2017; Medvedev, 2017).

Mon projet de thèse en collaboration entre ces deux laboratoires est né de la découverte d'un exon 2 du récepteur MT2 sans codon stop prématuré chez le hamster d'Europe, conduisant à l'hypothèse de l'implication éventuelle du récepteur MT2 dans le phénomène d'hibernation. Ce projet s'est ensuite entendu à l'étude des variations de l'expression de plusieurs gènes clés possiblement impliqués dans les différentes phases de l'hibernation.

La majorité des travaux décrits dans ce manuscrit a été réalisée à l'Institut de Recherches Servier au sein de la plateforme de Biologie Moléculaire de Sophie-Pénélope Guénin (Pôle d'expertise Biotechnologie, Chimie, Biologie dirigé par Jean A. Boutin). Cette plateforme apporte son expertise et son soutien technologique lors de toutes les phases d'un projet. De nombreuses technologies y sont développées comme le *genome editing*, puis en partie grâce au présent travail, la ddPCR.

A travers notre problématique portant sur la compréhension du processus d'hibernation et de l'implication éventuelle des récepteurs à la mélatonine, un autre objectif de cette thèse était de mettre en place et d'optimiser une plateforme de ddPCR permettant de traiter un grand nombre d'échantillons et adaptée aux enjeux de ce type de plateforme. En effet, l'étude de l'expression génique par ddPCR se confronte à plusieurs problématiques. La première est la précision des résultats rendus : plus qu'une autre, ces techniques nécessitent que le traitement des matrices soit la plus précise possible afin de minimiser le biais induit par l'expérimentateur. La seconde concerne la disponibilité des échantillons à étudier qui sont souvent en quantité limitée. Il est donc indispensable de mettre en place un protocole global limitant les pertes de matériel mais surtout de déterminer les conditions expérimentales permettant d'allier précision, fiabilité et préservation de l'échantillon. Un dernier point, et non des moindres, est la gestion d'un grand

nombre d'échantillons, en particulier les ARN qui demandent un traitement particulier afin d'éviter toute dégradation. L'étude que nous avons menée sur l'hibernation du hamster d'Europe cumule toutes ces difficultés et m'a donné l'occasion de mettre en place les conditions permettant de traiter un maximum d'échantillons dans un laps de temps limité en réduisant tant que faire se peut le biais lié à l'expérimentateur.

Une première étude réalisée avec un nombre un peu plus réduit d'animaux (6 animaux par condition) et d'organes a été réalisée afin de valider la plateforme de ddPCR mise en place. Cette première expérience dont les résultats ne seront pas présentés ici, a permis d'ajuster d'une part les conditions techniques propres à la plateforme de ddPCR mais également celles de la mise en hibernation des animaux. Nous avons également pu ajuster les organes et gènes étudiés en fonction des premiers résultats obtenus. La deuxième étude a été réalisée sur un plus grand nombre d'animaux afin d'augmenter la puissance statistique de nos résultats (Gautier et al., 2018a).

Parallèlement à ces deux projets, j'ai développé de nombreuses techniques afin de cloner le récepteur MT2 du hamster d'Europe en entier. Le clonage du gène codant pour le récepteur MT2, en particulier l'exon 1 extrêmement riche en GC, a été un réel défi. J'ai finalement réussi à cloner une partie de l'exon 1, me permettant de créer artificiellement une séquence que j'ai fait exprimer dans un système cellulaire afin d'en évaluer l'éventuelle affinité pour la mélatonine.

L'étude sur le récepteur Mel1c de l'ornithorynque a été initiée lors de mon projet de fin d'études et a été finalisée au cours de ma thèse.

Ce manuscrit retranscrit à la fois les résultats de mon étude sur les variations de l'expression génique pendant les différentes phases de l'hibernation et le clonage du récepteur MT2 mais également les aspects techniques développés et utilisés lors de ces études. La première partie de mon manuscrit consiste en un résumé de connaissances sur les différents sujets abordés. Dans la seconde partie « matériels et méthodes » sont décrites les techniques non détaillées dans les articles, en particulier la mise en place de la plateforme de ddPCR, qui a constitué une grande partie de mon travail de thèse. Ensuite les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'articles soumis ou prêts à l'être. Finalement, l'ensemble de ces travaux est discuté de manière globale avec des perspectives d'études ultérieures pour compléter ces recherches.

TABLE DES MATIERES

Chapitre I : Introduction	31
I. Les rythmes biologiques chez les mammifères	33
A. Un environnement en perpétuel changement	33
B. Caractérisation des rythmes biologiques.....	34
C. Horloges circadiennes et rythmes journaliers.....	35
1. Mise en évidence des rythmes circadiens et définitions	35
2. Les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus siège de l'horloge centrale...	37
3. Les fondements moléculaires de la rythmicité circadienne endogène	40
4. Synchronisation de l'horloge principale des NSC avec l'extérieur	42
5. Transmission du message journalier des NSC par les voies efférentes	46
6. Les horloges secondaires	47
7. Lien entre les horloges circadiennes et le métabolisme	50
8. Bilan et dérèglement de l'horloge	57
D. Rythmes saisonniers	57
1. Rythmes saisonniers, phénomène de photoréfraction et horloge circannuelle	57
2. La durée du pic nocturne de mélatonine est indispensable à la synchronisation des fonctions saisonnières avec l'environnement.....	62
3. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la transmission du message photopériodique	64
II. La mélatonine et ses récepteurs	68
A. Physiologie de la mélatonine	68
1. La glande pinéale : principal lieu de synthèse de la mélatonine.....	68
2. Métabolisme de la mélatonine	69
3. Rôles de la mélatonine	77
B. Récepteurs à la mélatonine	85
1. Présentation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	85
2. Récepteurs à la mélatonine, un exemple de RCPG.....	89
3. Voies de signalisation des récepteurs MT1 et MT2.....	95
4. Pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques	97
5. Hétérodimérisation.....	99
6. Régulation des récepteurs	100

III. Winter is coming-Hibernation	102
A. Hibernation et torpeur journalière : généralités	102
1. Définitions.....	102
2. Différentes phases du cycle d'hibernation	103
3. Contrôle temporel des cycles de torpeur et de normothermie : un rôle des gènes horloge ?	105
B. Régulations endocrines, métaboliques et génétique de l'hibernation	106
1. Contrôle endocrine de l'hibernation	106
2. Adaptations métaboliques et thermiques	108
3. Variation de l'expression génique	116
C. Applications biomédicales de l'hibernation	117
IV. Objectifs	119
Chapitre II : Matériels et méthodes	120
I. Modèle d'étude : hamster d'Europe Cricetus cricetus	121
II. Suivi de l'hibernation	122
III. Dosages des hormones et des métabolites	125
IV. Mise en place d'une plateforme de digital droplet PCR pour l'analyse de l'expression génique au cours du cycle d'hibernation	125
A. Préparation des échantillons.....	126
B. Quantification absolue par ddPCR.....	127
1. Principe	127
2. Clonage des gènes d'intérêts et conception des amorces et sondes	128
3. Mise au point de la ddPCR et préparation des plaques d'ARN	128
4. Réaction de ddPCR	130
V. Expériences de radiolisation	131
A. Expériences de saturation	131
B. Expériences de compétition	132
Chapitre III : Résultats	135
Gene expression profiling during hibernation in the European hamster	139
I. Introduction	141
II. Results.....	143
A. Organ-dependent gene profiling during hibernation cycles.....	143
B. Profiles of functional groups of genes during hibernation cycles	145

1. Clock genes	145
2. Melatonin receptors encoding genes.....	145
3. Deiodinase genes	145
4. Genes involved in general metabolism	146
5. Housekeeping genes.....	146
C. Circulating hormones during the hibernation cycles.....	146
III. Discussion	148
IV. Material and methods	152
A. Animals.....	152
B. RNA extraction	153
C. Cloning of genes of interest.....	153
D. Digital droplet PCR.....	157
E. Hormone analysis	160
F. Data and statistical analysis.....	160
“The molecular path” for cloning the European hamster melatonin receptors 1 and 2	165
I. Introduction	167
II. Materials and Methods	168
A. Animals, tissue collection	168
1. European hamster.....	168
2. Siberian hamster.....	169
B. RNA extraction	169
C. Cloning of Phodopus sungorus MT₂ receptor.....	169
D. Cloning of Cricetus cricetus MT₁ receptor.....	170
E. Cloning of Cricetus cricetus MT₂ receptor	170
1. Cloning of a partial fragment of Cricetus cricetus exon 1 MT ₂ receptor.....	170
2. 5’RACE cloning of Cricetus cricetus MT ₂ receptor	171
3. Further attempts to clone Cricetus cricetus exon 1 MT ₂ receptor	172
4. Cloning of Cricetus cricetus MT ₂ receptor Exon 2 and 3’UTR.....	174
F. Subcloning and sequencing.....	174
G. Establishment of transient CHO-FlpIN MT₁ cell lines	175
H. Membrane preparations	175
I. Establishment of transient COS7 chimeric MT₂ cell lines.....	175

1.	Design Chimeric MT ₂ receptor	175
2.	Establishment of the transient COS7 chimeric MT ₂ cell line	178
J.	Whole cell and membrane 2-[¹²⁵ I] -Iodomelatonin Binding Assay	178
III.	Results.....	179
A.	The European hamster Receptor Gene MT ₁ encodes a functional Receptor ..	179
B.	Cloning of Phodopus sungorus exon 1 MT ₂ receptor.....	181
C.	The Cricetus cricetus MT ₂ receptor seems to be functional.....	183
1.	Cloning of Cricetus cricetus exon 2 MT ₂ receptor	183
2.	Cloning of Cricetus cricetus exon 1 MT ₂ receptor	184
3.	Molecular pharmacology	186
IV.	Discussion	187
	Characterization of the Mel1c melatonineric receptor in platypus (Ornithorhynchus anatinus)	189
I.	Introduction	191
II.	Materials and Methods	192
A.	Reagents and ligands.....	192
B.	RNA extraction and cDNA synthesis	192
C.	Cloning of platypus Mel1c receptor.....	192
D.	Phylogenetic analysis.....	193
E.	Establishment of the transient COS7/3HA-Mel1c cell line.....	194
F.	Indirect immunofluorescence	194
G.	Establishment of stable CHO-FlpIn Mel1c cell lines	195
H.	Membrane preparation.....	195
I.	2-[¹²⁵ I] -melatonin binding assay	195
III.	Results.....	196
A.	Cloning of platypus Mel1c receptor	196
B.	Gene organization and phylogenetic analysis	196
C.	Expression and subcellular localization of recombinant platypus, clawed frog and chicken Mel1c receptors in COS7 cells.....	200
D.	Melatonin binding.....	201
E.	Molecular pharmacology	202

IV.	Discussion	208
V.	References	211
Chapitre IV : Discussion et perspectives.....		217
I.	Variation de l'expression génique pendant les différentes phases de l'hibernation du hamster d'Europe	219
II.	Un rôle des récepteurs à la mélatonine pendant l'hibernation ?	225
III.	Conclusion générale	228
Bibliographie.....		229
Annexes.....		261

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation du projet de thèse	8
Figure 2 : (A) Mouvement de rotation de la Terre autour du soleil responsable du rythme des saisons (NASA, 2017). (B) Variations annuelles de la photopériode (durée du jour) aux latitudes Nord : 70° (extrême nord de la Suède), 60° (Stockholm), 50° (Paris), 30° (Le Caire) et Equateur au cours de l'année (Physicalgeography.net, 2017).....	33
Figure 3 : Paramètres caractéristiques des rythmes biologiques d'après (Touitou and Haus, 1992).	34
Figure 4 : Actogramme mettant en évidence les propriétés fondamentales de l'horloge centrale d'après (Dardente and Cermakian, 2005).	35
Figure 5 : Composants de l'horloge biologique.	36
Figure 6 : Effet de la lésion des NSC sur l'activité locomotrice et la prise de boisson chez le rat (Stephan and Zucker, 1972).	37
Figure 7 : Actogramme reflétant les expériences de lésions et de transplantations des NSC (Ralph et al., 1990).....	38
Figure 8 : Localisation des NSC sur une coupe coronale de cerveau de hamster doré (Morin and Wood, 2001).	39
Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation des NSC chez les rongeurs (Dardente and Cermakian, 2005).	39
Figure 10 : Machinerie moléculaire de l'horloge circadienne des mammifères (Nader et al., 2010).	40
Figure 11 : Variation du niveau d'expression des ARNm des principaux constituants de l'horloge au cours d'un cycle circadien (Guilding and Piggins, 2007).	41
Figure 12 : Représentation schématique de l'influence d'un créneau lumineux sur l'organisation de l'activité locomotrice chez un rongeur nocturne placé en obscurité constante (Dardente and Cermakian, 2005).	42
Figure 13 : Représentation schématique des principales voies afférentes des NSC d'après (Dibner et al., 2010).....	44
Figure 14 : Transmission de l'information photique de la rétine aux NSC par la voie RHT d'après (Reppert and Weaver, 2002).	45
Figure 15 : Principales voies efférentes projetant des NSC vers l'hypothalamus et le thalamus (Dibner et al., 2010).	47
Figure 16 : Mise en évidence de la persistance d'oscillations circadiennes dans les tissus périphériques (Yoo et al., 2004)...	48
Figure 17 : Synchronisation des horloges secondaires par les NSC (Dibner et al., 2010).	49
Figure 18 : Variations journalières des fonctions métaboliques (Marcheva et al., 2010).	50
Figure 19 : Couplage des mécanismes de l'horloge circadienne avec le métabolisme (Bass and Takahashi, 2010).....	52
Figure 20 : Mécanisme d'action de la protéine déacétylase SIRT1 (Li, 2013; Oka et al., 2012).....	53
Figure 21 : Régulation des composants de l'horloge par SIRT1 (Belden and Dunlap, 2008).	53
Figure 22 : Différents rôles de Rev-Erba (Everett and Lazar, 2014).....	54
Figure 23 : Mode d'action du corépresseur HDAC3/NCOR (Feng et al., 2011).....	55
Figure 24 : Relation entre le statut énergétique et les mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne (Duez et al., 2013)	56
Figure 25 : La période de reproduction dépend de la durée de gestation (Hazlerigg and Simonneaux, 2015b).	58
Figure 26 : Evolution de la masse corporelle et de la taille testiculaire au cours des mois de plusieurs hamsters d'Europe d'après (Masson-Pévet et al., 1994).	59
Figure 27 : Effet de la photopériode sur une fonction saisonnière, la reproduction chez une espèce non circannuelle, le hamster syrien (Goldman, 2001).....	60
Figure 28 : Représentation schématique de la glande pituitaire (Nakayama and Yoshimura, 2017).	61
Figure 29 : La photopériode et la mélatonine contrôlent l'activité de reproduction chez le hamster syrien (Revel et al., 2007a).	62
Figure 30 : Effet de la mélatonine sur l'expression du cycle reproducteur de la brebis durant 70 jours (Arendt, 1998; Woodfill et al., 1994).....	63
Figure 31 : L'action du signal mélatoninergique sur la fonction reproductive est espèce dépendante (Reiter et al., 2010).	64
Figure 32 : Métabolisme des hormones thyroïdiennes par différentes déiodinases (D1,D2,D3) (Bianco et al., 2002).....	65
Figure 33 : Axe thyroïdienne (Nakayama and Yoshimura, 2017).....	65
Figure 34 : Effet d'implants intra-hypothalamiques de T3 sur l'activité testiculaire du hamster sibérien (Barrett et al., 2007a; Dardente et al., 2014; Murphy et al., 2012).....	67

Figure 35 : Structure de la mélatonine (IUPHAR).	68
Figure 36 : Coupe parasagittale d'un cerveau de rat montrant les différentes parties de la glande pinéale marquée par une enzyme de synthèse de la mélatonine (Ribelayga et al., 1998).	69
Figure 37 : Voie de synthèse de la mélatonine. (Touitou, 2001).	70
Figure 38 : Profil journalier de la mélatonine plasmatique et de l'ARNm codant pour le TPH de type 1 dans la glande pinéale de rat (Sugden, 2003).	71
Figure 39 : Rythmes journaliers des principales enzymes et métabolites impliqués dans la biosynthèse de la mélatonine (A), d'après (Klein, 2007) ; (B) Rôle des enzymes AA-NAT et HIOMT sur la durée et le pic de mélatonine.	71
Figure 40 : Profil journalier de l'activité de HIOMT dans la glande pinéale chez des hamsters sibériens gardés en SP ou LP (Ribelayga et al., 2000).	72
Figure 41 : Schématisation de la voie polyneuronal rétinohypothalamo-pinéale d'après (Revel et al., 2009).	73
Figure 42 : Représentation schématique de l'impact du signal adrénergique sur la synthèse de mélatonine (MLT).	74
Figure 43 : Représentation schématique des processus impliqués dans la synthèse de la mélatonine (Reiter et al., 2010).	76
Figure 44 : Troubles du rythme circadien pour lesquels l'administration de mélatonine pourrait être bénéfique (Arendt and Skene, 2005).	78
Figure 45 : Expression du récepteur MT1 dans la pars tubéris de rat et du hamster d'Europe d'après (Dardente et al., 2003; Klosin et al., 2002).	79
Figure 46 : Caractérisation immunochimique de la pars tubéris du hamster d'Europe en PL (Dardente et al., 2003).	79
Figure 47 : Activation et inactivation des gènes codant pour les déiodinases dans le MBH de caillies transférées de PC en PL (Yasuo et al., 2005)	80
Figure 48 : Représentation schématique des noyaux constituant l'hypothalamus médial de part et d'autre du 3ème ventricule, tapissé de cellules épendymaires et différents types de tanocytes (Rizzoti and Lovell-Badge, 2017).	81
Figure 49 : Variation d'expression des déiodinases par la photopériode courte dans les tanocytes : ↓ régulées négativement ; ↑ régulée positivement d'après (Ebling, 2014).	81
Figure 50 : Modèle d'induction photopériodique de l'expression d'Eya3 dans la pars tubéris (Dardente et al., 2010).	82
Figure 51 : Contrôle photopériodique de la TSH dans la pars tubéris chez les mammifères (Dardente et al., 2014).	82
Figure 52 : Lien entre la sécrétion de TSH et la disponibilité en TH dans le MBH (Barrett and Bolborea, 2012).	83
Figure 53 : Implication de la mélatonine et les hormones thyroïdiennes dans le contrôle de la reproduction du hamster mâle (Klosin et al., 2013).	84
Figure 54 : Différentes actions de la mélatonine (Pandi-Perumal et al., 2006).	85
Figure 55 : Transmission d'un signal extracellulaire au niveau intracellulaire par l'intermédiaire d'un RCPG (Bockaert and Pin, 1999).	86
Figure 56 : Représentation schématique de la structure bidimensionnelle des RCPG d'après (Deupi and Kobilka, 2007).	87
Figure 57 : Représentation schématique des contacts entre les domaines transmembranaires (Venkatakrishnan et al., 2013).	87
Figure 58 : Représentation schématique de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (Hanlon and Andrew, 2015).	88
Figure 59 : Rôle de la β -arrestine dans l'inactivation des RCPG (Pierce et al., 2002).	89
Figure 60 : Représentation schématique du récepteur humain MT1 (hMT1) (Dubocovich et al., 2010).	90
Figure 61 : Mise en évidence des motifs DRY et NXXY dans la rhodopsine (Fritze et al., 2003).	90
Figure 62 : Localisation du récepteur GPR50 dans le diencephale de rat. (Batailler et al., 2012).	94
Figure 63 : Voies de signalisation des récepteurs MT1 et MT2 (Cecon et al., 2017).	96
Figure 64 : Différentes actions de ligands sur un récepteur ayant une activité basale (Deupi and Kobilka, 2007).	97
Figure 65 : Ligands non sélectifs MT1/MT2 (Jockers et al., 2016).	99
Figure 66 : Représentation schématique de l'impact de l'homodimérisation du récepteur MT1 et de son hétérodimérisation avec GPR50 sur les voies de signalisation (Levoye et al., 2006b).	100
Figure 67 : Les comportements d'hibernation et de torpeur journalière sont observés dans de nombreuses espèces de mammifères (Heldmaier et al., 2004).	103
Figure 68 : Modèle à deux cycles (Grabek et al., 2015).	104
Figure 69 : Graphique représentant les variations du métabolisme et de la température corporelle au cours des différentes phases de l'hibernation de la marmotte Alpine (<i>Marmota marmota</i>) (Heldmaier et al., 2004).	104

Figure 70 : Expression journalière des gènes horloges Per1, Per2 et Bmal1 analysée par hybridation in situ dans les NSC de hamsters d'Europe pendant les phases d'hibernation ou d'euthermie (Revel et al., 2007b).	106
Figure 71 : Implication des hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon dans le métabolisme du glucide (Ruud et al., 2017).	110
Figure 72 : Représentation schématique des différentes étapes métaboliques de l'état post prandial (I) au jeûne prolongé (V) (Cahill, 2006).	111
Figure 73 : Régulations métaboliques en fonction des états nourri et de jeûne dans différents organes d'après (Patterson et al., 2015) et bilan simplifié des adaptations métaboliques liées au jeûne	112
Figure 74 : Régulation de la thermogenèse dans le BAT par la NE et les TH (López et al., 2013).	114
Figure 75 : Représentation schématique des facteurs contrôlant l'expression du gène ucp1 (Cannon and Nedergaard, 2004).	114
Figure 76 : Action centrale de l'hormone thyroïdienne T3 dans la thermogenèse (López et al., 2010).	115
Figure 77 : Variation du gène UCP1 dans le BAT de spermophile arctique à différentes périodes de l'année (Hampton et al., 2013).	116
Figure 78 : Chez les hibernants, les grandes fonctions physiologiques sont précisément réparties tout au long de l'année (Sáenz de Miera et al., 2015).	122
Figure 79 : Enregistrements de la température corporelle en fonction du temps reflétant les différentes phases du cycle d'hibernation.	123
Figure 80 : Hamster d'Europe se réveillant d'une phase de torpeur (Images Chronobiotron).	124
Figure 81 : Organisation du processus global de l'étude de l'expression génique par ddPCR.	125
Figure 82 : Electrophorèse d'ARN intègre (RIN 10) à dégradé (RIN 2) (genomics.agilent.com).	126
Figure 83 : Différentes étapes de la ddPCR.	127
Figure 84 : Représentation de l'intensité de fluorescence de chaque gouttes : résultats d'un gradient de température (Biorad).	128
Figure 85 : Structure chimique de la 2-[¹²⁵ I]-mélatonine.	131
Figure 86 : Courbe de saturation représentant la liaison de la mélatonine iodée en fonction d'une concentration croissante de radioligand.	132
Figure 87 : Représentation du pourcentage de liaison totale en fonction du log de la concentration de ligand froid.	132
Figure 88 : Changes in the expression of functional families of genes in various tissues of the European hamster according to hibernation stage.	144
Figure 89 : Changes in the expression of individual genes in various tissues of the European hamster according to hibernation stage.	147
Figure 90 : Typical hibernation pattern of a male European hamster.	152
Figure 91 : Typical example of digital droplet PCR (ddPCR) mRNA quantification.	158
Figure 92 : Alignment of the Rattus norvegicus (NM_001100641.1), Mus musculus (AB377276.1) and Cricetulus griseus (XM_007636225.1) melatonin receptor MT ₂ amino acid sequences.	172
Figure 93 : Sequence of the engineered chimeric melatonin receptor 2.	176
Figure 94 : Alignment comparison of sequence of various mammalian melatonin MT ₂ receptors and our chimeric receptors.	177
Figure 95 : Alignment of the deduced amino acid sequences of the Cricetus cricetus and the Phodopus Sungorus (AAB17722) melatonin receptor 1.	179
Figure 96 : Saturation binding experiments for 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonin.	180
Figure 97 : Alignment comparison of the acid nucleic sequences of the two amplicons amplified using 5'RACE and Phodopus sungorus (A) or Peromyscus maniculatus bairdii (B) MT ₂ sequences.	182
Figure 98 : Alignment of the deduced amino acid sequences of both amplicons A and B and Phodopus sungorus MT ₂ receptor.	183
Figure 99 : Comparison of the deduced amino acid sequences of different rodent species.	184
Figure 100 : Alignment of the exon 1 Cricetus cricetus cloned sequence with the Peromyscus maniculatus bairdii and Phodopus sungorus melatonin receptor 2 sequences.	184
Figure 101 : Fold Peromyscus maniculatus bairdii melatonin receptor 1B sequence: whole sequence (left) - Exon 1 (right). Geneious Pro 5.6.7.	185

Figure 102 : Examples of sequences obtained using 5'RACE experiments in order to obtain the exon 1 sequence of the melatonin receptor 2.....	185
Figure 103 : Saturation binding experiments for 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonin.....	186
Figure 104 : Ornithorynque nageant dans l'aquarium de Sydney. Stefan Kraft (2004).....	190
Figure 105 : Cloning of Mel1c from platypus brain and comparison of the actual and predicted sequences.	196
Figure 106 : Platypus has retained ancestral Mel1c showing that the ortholog GPR50 evolved after the divergence of monotremes from therian mammals.	198
Figure 107 : Expression of Mel1c receptors in COS7 cells.	200
Figure 108 : Saturation binding experiments for 2-[¹²⁵ I]-iodomelatonin.....	201
Figure 109 : Molecular pharmacology of the Mel1c receptors from platypus (A) and clawed frog (B).....	204
Figure 110 : Correlation between the data obtained from platypus Mel1c and those obtained with clawed frog Mel1c.....	206
Figure 111 : Comparison of the correlations between the molecular pharmacology of platypus Mel1c (A) or clawed frog Mel1c (B) and human melatonin receptors MT1 and MT2	207
Figure 112 : Platypus Mel1c gene in comparison with chicken and the clawed frog.	215
Figure 113 : Variation d'expression génique des gènes de ménage dans les huit tissus étudiés selon les différentes phases de l'hibernation du hamster d'Europe.	220
Figure 114 : Représentation schématique de la régulation de la protéine CIRP pendant l'hibernation du hamster syriens (Sano et al., 2015).....	223
Figure 115 : Expression de l'ARNm de CIRP dans le cœur et l'hypothalamus de hamster hibernant et non hibernant.....	224

LISTE DES TABLES

Table 1 : Liste des numéros d'accèsion GenBank de l'ensemble des séquences soumises à publication.	14
Table 2 : L'invalidation des composants de horloge circadienne entraîne de multiples altérations, en particulier en lien avec le métabolisme (Ko and Takahashi, 2006).	51
Table 3 : Gènes cibles de PPAR α impliqués dans le métabolisme (Yoon, 2009).	55
Table 4 : Localisation des sites de liaison de la [125 I] mélatonine (Zlotos et al., 2014)	92
Table 5 : Données expérimentales relatives aux 24 hamsters d'Europe suivis pendant l'expérience.	124
Table 6 : Conditions de réaction de ddPCR pour chacun des gènes analysés, séquences des amorces et sondes, quantité d'ARN et température d'hybridation.	130
Table 7 : Sequences of the forward and reverse primers used to clone European hamster genes of interest	155
Table 8 : Primer/probe sequences, RNA quantity, and annealing temperatures for digital droplet PCR (ddPCR).	159
Table 9 : The 61 genes showing significant differential expression according to hibernation state (Kruskal-Wallis, adjusted P values ≤ 0.05) in an analysed tissue. Genes are ranked by adjusted P values.	161
Table 10 : Plasma hormone levels (means $\pm$ SEM) of European hamster during the hibernation cycle (n=5-8).	162
Table 11 : Primers used to confirm the sequence of the Phodopus sungorus MT ₂ receptor obtained by 5'RACE.	170
Table 12 : Pair of primers used for the amplification of the Cricetus cricetus MT ₁ gene.	170
Table 13 : Primers used in order to amplify the exon 1 of Cricetus cricetus MT ₂ , reverse primers located on exon 1 primers.	171
Table 14 : Primers used in order to amplify exon 1, reverse primers located on the exon 2.	171
Table 15 : Primers designed on the CHO melatonin receptor 2 sequence in order to amplify the exon 1 of the Cricetus cricetus MT ₂ receptor.	173
Table 16 : Primers sequences used for exon 1 amplification on gDNA.	173
Table 17 : Molecular pharmacology of MT ₁ receptors from Cricetus cricetus. Comparison with the human MT ₁ and MT ₂ melatonin receptors.	181
Table 18 : Primers used in order to amplify the platypus Mel1c receptor.	193
Table 19 : Therian mammals used for phylogenetic analysis.	193
Table 20 : Comparison of Mel1c sequences in platypus, xenopus and chicken to the human gpr50.	197
Table 21 : Comparison of the molecular pharmacology of platypus, xenopus and chicken melatonin Mel1c receptors.	202
Table 22 : Molecular pharmacology of Mel1c receptors in platypus and xenopus compared to the human MT ₁ and MT ₂ melatonin receptors.	205

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Détails des séquences soumises à GenBank des gènes clonés pour les trois études de ce manuscrit	263
Annexe 2 : Liste non exhaustive des bénéfices de la mélatonine sur différents modèles animaux et cellulaires (arrêtée au 30/06/2015) (Boutin, 2015).....	291

ABRÉVIATIONS

1

12L/12D : 12h Light / 12h Dark

5

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTP : 5-hydroxy-tryptophane

A

AA-NAT : Arylalkylamine-N-acetyltransférase
AC : Adénylate Cyclase
AG : Acides Gras
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
ARC : ARcuate Nucleus
AVP : Arginine VasoPressine

B

BAT : Brown Adipose Tissue (tissu adipeux brun)
bHLH : basic Helix-Loop-Helix
BMAL1 : Brain and Muscle ARNt Like Protein 1
BNST : Bed Nucleus of the Stria Terminalis

C

CCGs : Clock Controlled Genes (Gènes contrôlés par l'horloge)
CGR : Cellules Ganglionnaires de la Rétine
CIRP : Cold-Inducible RNA-Binding Protein
CLC : Cardiotrophin-Like Cytokine
CLOCK : Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CREB : cAMP Response Element Binding
CRH : Corticotropin-Releasing Hormone

D

DD : Dark : Dark (Obscurité totale)
DMH : Dorso Medial Hypothalamus
DP : Deep Pineal

E

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2

F

FGF21 : Fibroblast Growth Factor 21

FSH : Follicle Stimulating Hormone

G

GABA : g-AminoButyric Acid
GDP : Guanosine DiphosPhosphate
GHT : Geniculo-Hypothalamic Tractus
GnRH : Gonadotropin-Releasing Hormone
GRP : Gastrin Releasing Peptide

H

HB : HaBenula
HDAC3 : Histone DeAcetylase 3
HFD : High Fat Diet
HIOMT : HydroxyIndol-O-Methyl Transférase

I

IGL : Intergeniculate Leaflet (Feuillets intergénéculés)
INCI : Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

K

K_D : Constante de dissociation
Kiss : Kisspeptides

L

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LH : Luteinizing Hormone
LS : Lateral septum

M

MBH : Medio-Basal Hypothalamus
MESOR : Midline Estimating Statistic Of Rhythm

N

NA : NorAdrénaline
NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NAMPT : NicotinAMide PhosphoribosylTransférase
NAS : N-AcetylSérotonine
NCoR : Nuclear Corepressor 1
NE : NorEpinéphrine
NIML : Noyau InterMédioLatéral de la moelle épinière
NPV : Noyaux Para-Ventriculaires
NPY : Neuropeptide Y
NSC : Noyaux SupraChiasmiques

P

PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein
PAF : Platelet-Activating Factor
PAS : Period-Arnt-Single-minded
PC : Photopériode Courte
PK2 : ProKineticin 2
PKA : Protéine kinase AMPc dépendante
PKC : Protéine Kinase C
PL : Photopériode Longue
POA : PreOptic Area
PPRE : PPAR Responsive Element
PS : Pineal Stalk
PVN : ParaVentricular Nucleus
PVT : ParaVentricular nucleus of the Thalamus

Q

QR : Quotient Respiratoire
QR2 : Quinone Réductase 2

R

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
RFRP : RF (Arg-Phe) amide-related peptides
RHT : Retino-Hypothalamic Tractus
RIA : RadioImmunoAssays
RIN : RNA Integrity Number
ROR : Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptors
ROREs : Retinoic acid-related Orphan Receptor response Elements
RXR : Retinoid X Receptor

S

SP : Superficial Pineal

SP8A : Short Photoperiod Ta= 8°C Arousal
SP8H : Short Photoperiod Ta= 8°C Hibernation
SP8N : Short Photoperiod Ta= 8°C Normothermia
sPVZ : sub-ParaVentriculaire Zone

T

Ta : Température ambiante
Tb : Température corporelle
TEF : Thyrotroph Embryonic Factor
TG : TriGlycérides
TG α : Transforming Growth Factor α
TPH : TryPtophane-Hydroxylase
TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone
Trp : Tryptophane
TSH : Thyroid Stimulating Hormone

U

UCP1 : UnCoupling Protein 1

V

VIP : Vasoactive Intestinal Polypeptide

W

WAT : White adipose Tissue (tissu adipeux blanc)
WT : Wild Type

B

β Arr : β -arrestine

Le commencement de toutes les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses sont
ce qu'elles sont.

Aristote

CHAPITRE I : INTRODUCTION



I. Les rythmes biologiques chez les mammifères

A. Un environnement en perpétuel changement

Depuis la Révolution Copernicienne (XVI^{ème} siècle) et les travaux de Galilée et Newton, la compréhension des mouvements de la Terre a bien évolué. L'alternance jour/nuit est la conséquence du mouvement de révolution de la Terre sur elle-même avec une période de 24 heures. Le mouvement de révolution de la Terre autour du Soleil (en 365 jours) et l'inclinaison de l'axe de rotation de la Terre (23,5°) par rapport à son plan orbital sont à l'origine des variations saisonnières du climat (Figure 2 A). La différence de rayonnement solaire au cours d'une année induit des changements prévisibles de la durée du jour (ou photopériode), de la température, de l'hygrométrie. Les variations annuelles de la photopériode sont très reproductibles d'une année sur l'autre (Figure 2 B).

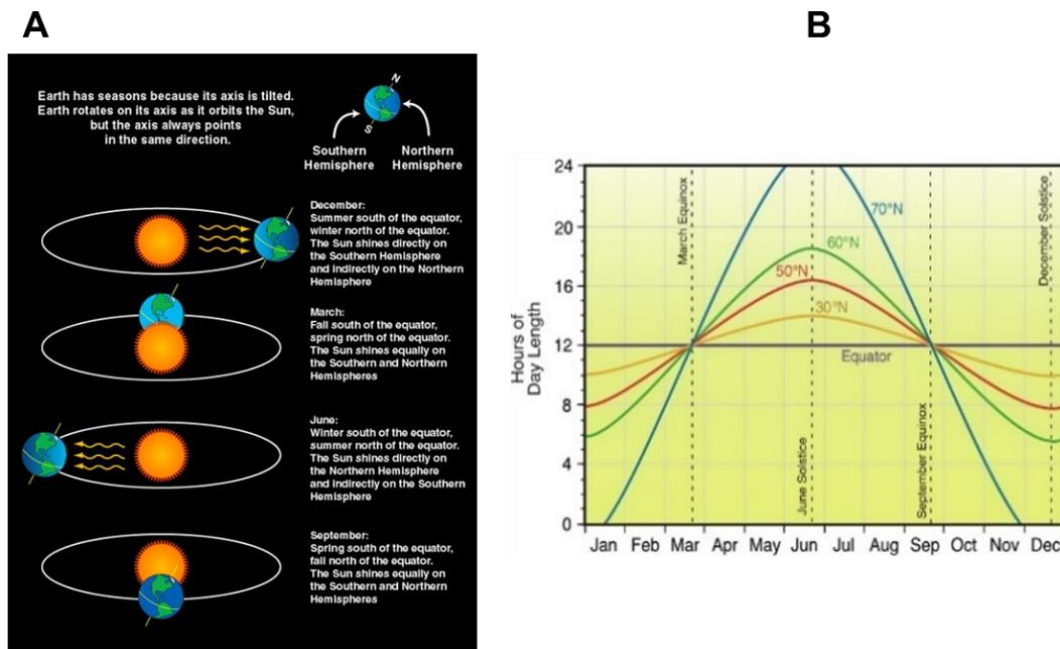


Figure 2 : (A) Mouvement de rotation de la Terre autour du soleil responsable du rythme des saisons (NASA, 2017). (B) Variations annuelles de la photopériode (durée du jour) aux latitudes Nord : 70° (extrême nord de la Suède), 60° (Stockholm), 50° (Paris), 30° (Le Caire) et Equateur au cours de l'année (Physicalgeography.net, 2017).

Les animaux vivants sur Terre sont soumis à de nombreuses contraintes, comme celles induites par les différentes saisons. En réponse aux variations de la photopériode, de la disponibilité en nourriture, nombreuses sont les espèces à avoir adapté, d'un point de vue temporel, différents aspects de leur biologie (comportement, physiologique...). La synchronisation des fonctions biologiques avec l'environnement est un élément indispensable à la survie d'un individu, de sa progéniture et plus largement à la pérennité de l'espèce.

B. Caractérisation des rythmes biologiques

Un rythme biologique peut être défini comme « *une suite de variations physiologiques statistiquement significatives, déterminant en fonction du temps des oscillations de forme reproductible* » (Challamel et al., 2001). Ces rythmes sont observés à tous les niveaux d'organisation, de la cellule à l'écosystème entier. Ils peuvent être caractérisés par quatre paramètres (Figure 3) :

- MESOR (Midline Estimating Statistic Of Rhythm) qui correspond au niveau moyen autour duquel la variable oscille
- Amplitude qui correspond à la différence entre la valeur maximale et le MESOR
- Acrophase et bathyphase qui correspondent respectivement aux temps pour lesquels les valeurs maximale et minimale sont observées
- Période (τ) qui est définie comme la durée d'un cycle complet, c'est-à-dire le temps pour observer une oscillation complète

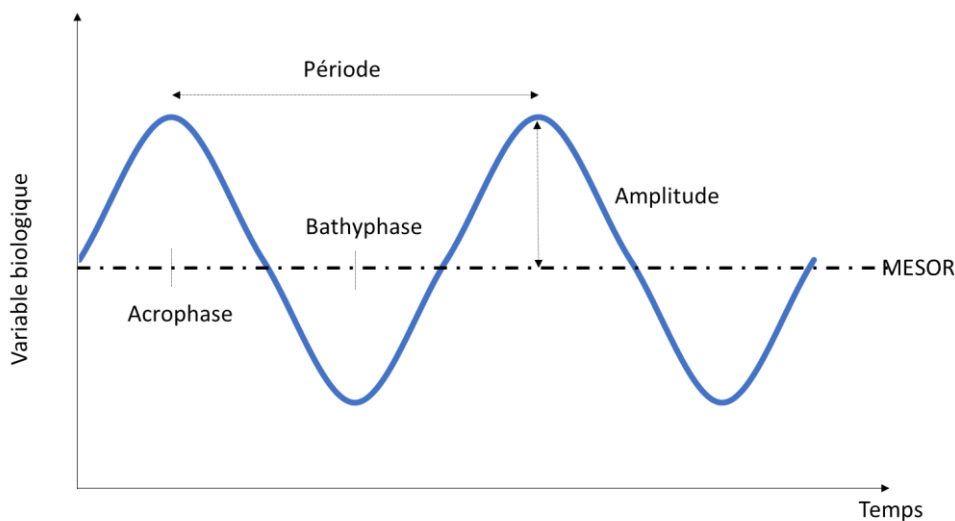


Figure 3 : Paramètres caractéristiques des rythmes biologiques d'après (Touitou and Haus, 1992).

Selon la durée de la période, plusieurs types de rythmes sont définis : les rythmes circadiens (du latin *circa diem*: autour du jour) dont la durée est d'environ 24 heures (24 ± 4 heures) ; les rythmes ultradiens dont la période varie de quelques heures à 20 heures ; et les rythmes infradiens avec une période supérieure à 28 heures dont les rythmes circannuels (du latin *circa* : environ et *annus* : an) représentent un extrême avec une période d'environ une année (Sechter et al., 2006).

C. Horloges circadiennes et rythmes journaliers

1. Mise en évidence des rythmes circadiens et définitions

La mise en évidence d'une horloge biologique endogène chez un être vivant, le mimosa (*Mimosa pudica*), date du début du dix-huitième siècle. Après avoir placé des plants en obscurité constante (DD), Jacques d'Ortous de Mairan, physicien français, observa que les feuilles se dressaient et tombaient comme pendant un cycle jour/nuit normal. Le botaniste Augustin de Candolle montra, un siècle plus tard, que le cycle suivi par les feuilles avait une durée égale à 22 heures. Ces expériences révèlent l'existence d'une horloge biologique interne permettant la mesure du temps malgré l'absence de repère temporel (McClung, 2006). La mise en évidence de rythmes circadiens dans le règne animal, a été rendu possible grâce à des expériences de *free running* ou « libre cours » durant lesquels les animaux sont totalement isolés des repères extérieurs. Chez les rongeurs, l'activité circadienne peut facilement être visualisée par l'observation de leur activité locomotrice (actogramme) en condition d'obscurité totale.

La Figure 4 représente l'activité locomotrice d'un rongeur nocturne pendant deux périodes. Dans la première période, l'animal, soumis à un cycle de 12 h lumière/12 h obscurité (12L/12D), présente une activité locomotrice exclusivement nocturne synchronisée par l'alternance lumière/obscurité avec une période de 24 h exactement (rythme journalier ou nyctéméral).

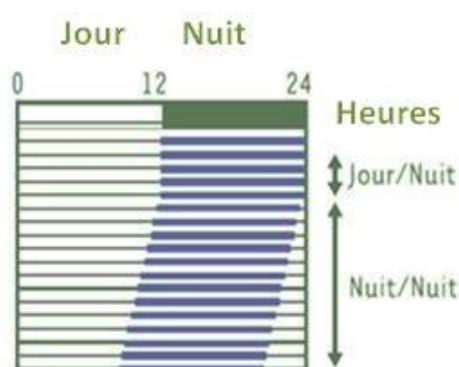


Figure 4 : Actogramme mettant en évidence les propriétés fondamentales de l'horloge centrale d'après (Dardente and Cermakian, 2005).

La première partie de l'actogramme représente l'activité locomotrice (barre bleue) d'un rongeur nocturne placé en cycle jour (0h à 12h) dont l'activité locomotrice commence à l'arrivée de l'obscurité (12h à 24h) ; dans la deuxième partie de l'actogramme, le rongeur est placé obscurité constante (nuit/nuit), son activité locomotrice commence un peu plus tôt chaque jour illustrant un rythme circadien endogène inférieur à 24h.

Dans ce système l'information temporelle est donnée par la lumière (*Zeitgeber* ou ZT ; de l'allemand *Zeit* : temps et *Geber* : donneur.). Par convention, le début de la période lumineuse est noté ZT0 et celui de la période obscure ZT12. Dans la deuxième période, l'animal est placé en obscurité constante (nuit/nuit ou D : D). Privé de repère temporel, son activité locomotrice reste rythmique avec une période différente d'environ 24 h (rythme circadien). Dans ce système, l'information temporelle circadienne (CT) est donnée par le rythme de l'activité

locomotrice, par convention le début de la période de repos est noté CT0 et celui de la période d'activité CT12. Chez les rongeurs nocturnes la période de repos (CT0-CT12) est appelée jour subjectif et la période d'activité (CT12-CT24), nuit subjective. Dans l'exemple de la Figure 4, l'activité locomotrice en DD commence de plus en tôt chaque jour illustrant une période circadienne endogène inférieure à 24 h.

Les rythmes biologiques sont donc sous la dépendance de facteurs extérieurs qui permettent une synchronisation précise avec l'environnement. Les facteurs exogènes qui entraînent et modulent l'horloge interne sont appelés *Zeitgebers* et peuvent être définis comme « tout facteur cyclique de l'environnement capable de modifier un ou plusieurs paramètres d'un rythme biologique » (Reinberg, 1991). Chez les mammifères, l'information photique est le principal donneur de temps mais on peut également citer la disponibilité alimentaire, les facteurs sociaux, l'activité locomotrice, mais également certaines drogues dites chronobiotiques.

Chez les mammifères les rythmes circadiens dépendent essentiellement d'une horloge biologique « principale » logée dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus qui font l'interface entre l'environnement extérieur et l'organisme. Néanmoins il existe d'autres horloges circadiennes « secondaires » situées dans d'autres structures centrales (comme le bulbe olfactif) et également périphériques (comme le foie). Alors que la grande majorité des réactions biologiques sont dépendantes de la température, le fonctionnement des horloges et donc leur période sont indépendants de la température. Mais dans des conditions exceptionnelles de température, comme lors de l'hibernation où la T_b diminue drastiquement, cette compensation thermique n'est pas conservée, en effet il a été démontré que l'horloge centrale des hamsters hibernants était temporairement arrêtée (Revel et al., 2009).

Une horloge est constituée de trois composantes principales (Figure 5) : les voies d'entrée qui relient l'horloge à l'environnement ; l'horloge en elle-même qui fonctionne de manière auto-entretenu avec une période propre ; et les voies de sorties qui permettent la transmission des informations rythmiques.

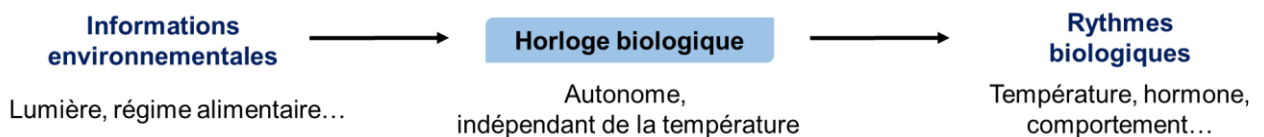


Figure 5 : Composants de l'horloge biologique.

2. Les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus siège de l'horloge centrale

a) Mise en évidence de l'horloge centrale dans les noyaux suprachiasmatiques.

En 1972, après avoir réalisé une lésion bilatérale des NSC, Stephan et Zucker (Stephan and Zucker, 1972) ont observé la suppression des rythmes de l'activité locomotrice et de la prise de boisson chez le rat (Figure 6).

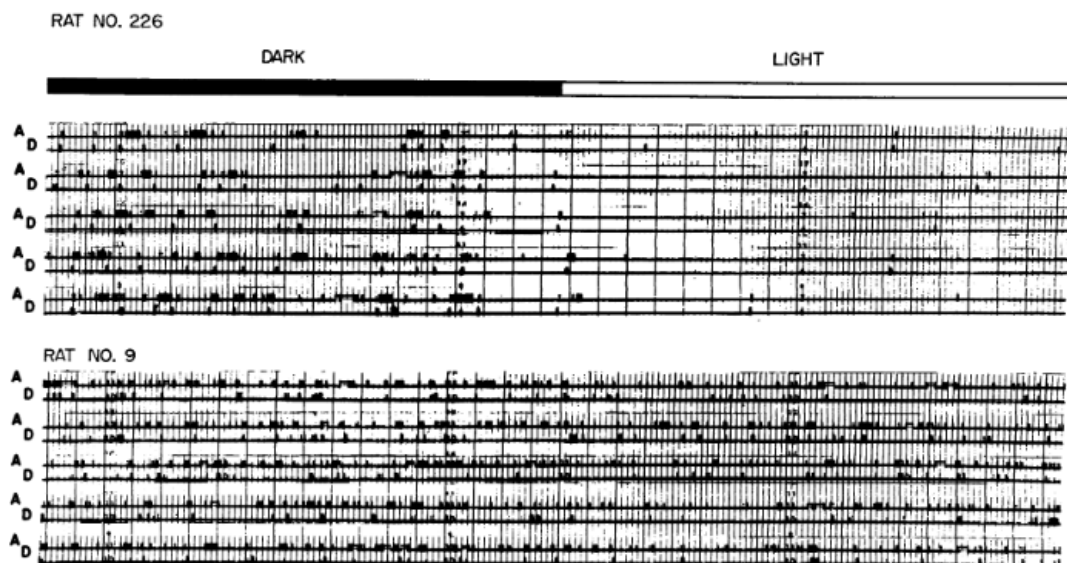


Figure 6 : Effet de la lésion des NSC sur l'activité locomotrice et la prise de boisson chez le rat (Stephan and Zucker, 1972).

Enregistrements sur 5 jours consécutifs de l'activité locomotrice (A) et de la prise de boisson (D) chez un rat contrôle (Rat N°226) et un rat (Rat N°9) dont les NSC ont été lésés. Chez le rat contrôle, l'activité locomotrice et la prise de boisson suivent un rythme jour/nuit, alors que ces deux fonctions sont arrhythmiques chez le rat N°9.

Par la suite, les travaux de Ralph et Menaker ont permis de mieux comprendre le rôle des NSC dans la genèse des rythmes circadiens grâce à l'utilisation de hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*) portant une mutation tau (τ) qui engendre une période plus courte des rythmes circadiens (Ralph and Menaker, 1988). Les animaux hétérozygotes pour cette mutation ont une période d'environ 22 h alors que les homozygotes ont une période de 20 h. Ces auteurs ont transplanté des NSC provenant de fœtus possédant la mutation τ chez des animaux sauvages non mutés (Wild Type ; WT) dont les NSC avaient été préalablement lésés bilatéralement. Cette transplantation a permis de restaurer le rythme de l'activité locomotrice chez l'animal hôte avec une période égale à celle du donneur (Ralph et al., 1990). Un résultat similaire a été obtenu en inversant le donneur et le receveur (Figure 7).

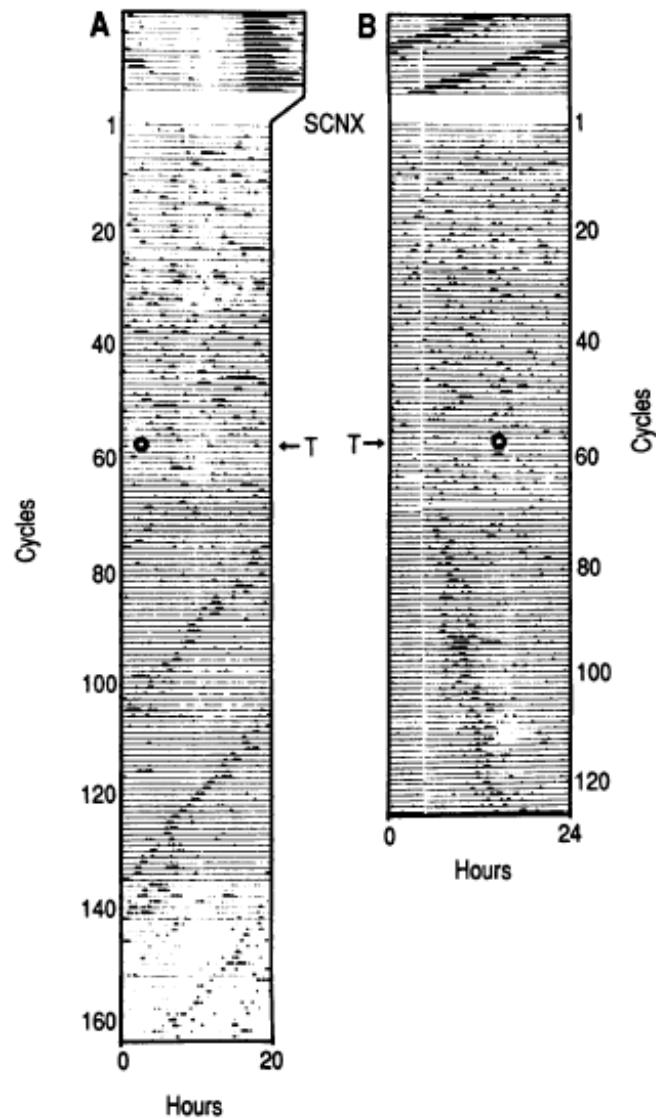


Figure 7 : Actogramme reflétant les expériences de lésions et de transplantations des NSC (Ralph et al., 1990).

[A] La première partie de l'actogramme (avant le 1^{er} cycle) représente le rythme endogène de l'activité locomotrice d'un animal hôte contrôlé (WT) dont la période est légèrement supérieure à 24 h. La lésion des NSC (SCNX), entre 1 et 60 cycles, entraîne une perte de la rythmicité. La transplantation de NSC fœtaux (T) de hamsters portants une mutation avec une période d'environ 20 h permet de restaurer chez l'hôte une rythmicité circadienne dont la période est égale à celle du donneur. [B] Dans ce cas, l'opération inverse est réalisée : des NSC d'animaux WT ont été transplantés chez un animal hôte mutant dont les NSC ont été préalablement lésés.

b) Localisation et organisation des noyaux suprachiasmatiques

Les NSC de l'hypothalamus sont une structure paire située de part et d'autre du troisième ventricule et au-dessus du chiasma optique (Figure 8). Ils sont composés d'environ 20 000 neurones chez les rongeurs.

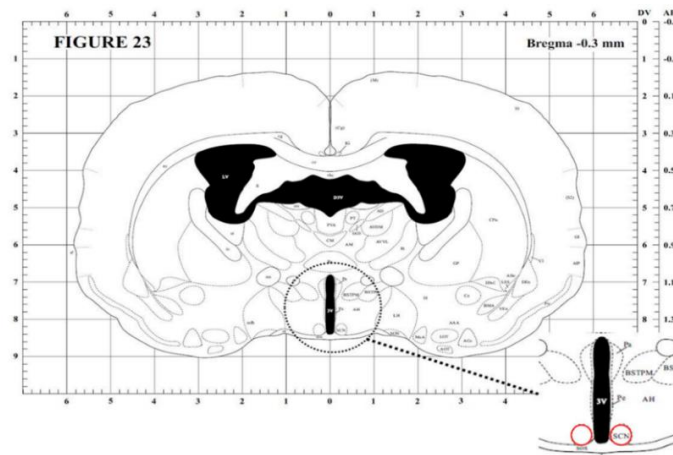


Figure 8 : Localisation des NSC sur une coupe coronale de cerveau de hamster doré (Morin and Wood, 2001).

D'un point de vue anatomique et fonctionnel, deux parties peuvent être distinguées : le noyau (*core*) et la coquille (*shell*) avec pour chaque partie un phénotype neuropeptidique différent (Abrahamson and Moore, 2001; Welsh et al., 2010) (Figure 9) :

- **Le noyau, dans la partie ventrolatérale** reçoit les afférences essentiellement photiques mais également et non photiques. Les afférences photiques proviennent directement de la rétine via le tractus rétino-hypothalamique (RHT) et permettent aux NSC d'être synchronisés avec le cycle jour/nuit imposé par la lumière. Cette partie ventrolatérale contient majoritairement des neurones exprimant le peptide intestinal vasoactif (VIP) et également des neurones à calrétinine, neurotensine et Gastrin Releasing Peptide (GRP) mais de manière plus minoritaire (Figure 9).
- **La coquille, dans la partie dorsomédiane** envoie des efférences nerveuses essentiellement à partir de neurones exprimant l'arginine vasopressine (AVP) qui sont majoritaires, mais d'autres neurones contenant de l'angiotensine II et de la met-enképhaline envoient également des efférences.

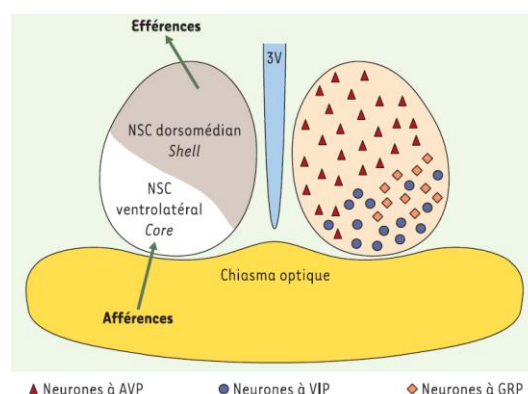


Figure 9 : Représentation schématique de l'organisation des NSC chez les rongeurs (Dardente and Cermakian, 2005).

3. Les fondements moléculaires de la rythmicité circadienne endogène

Le fonctionnement de l'horloge circadienne dépend d'une machinerie moléculaire composée de boucles, l'une principale et l'autre auxiliaire, de régulation transcriptionnelle/traductionnelle, entraînant une expression rythmique d'environ 24 heures des composants principaux de l'horloge (Ko and Takahashi, 2006; Nader et al., 2010)(Figure 10).

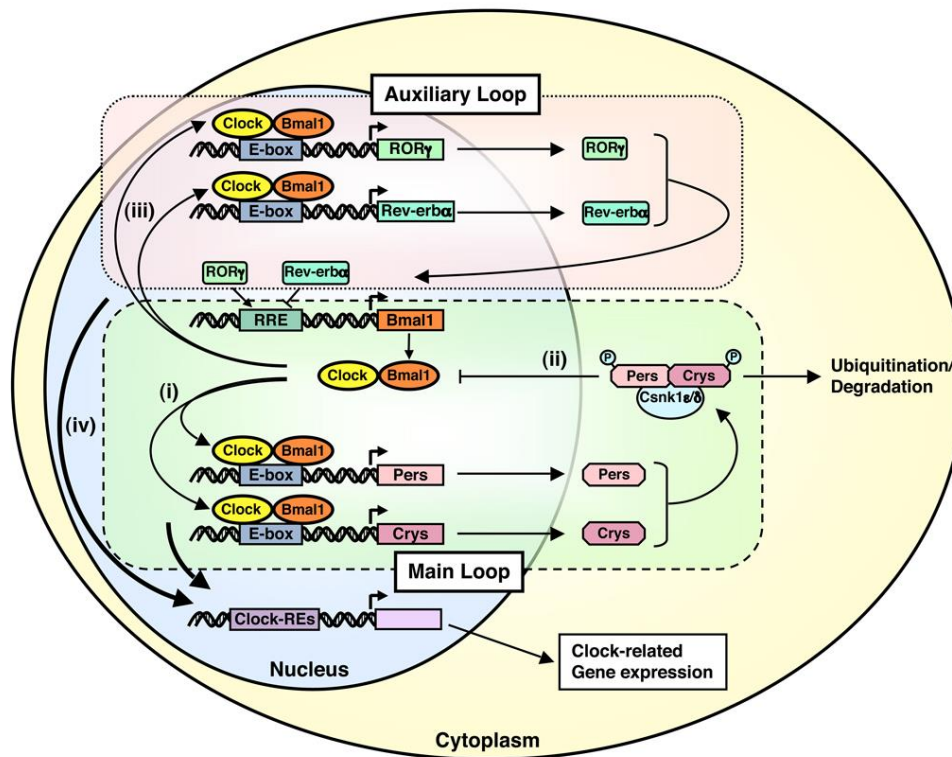


Figure 10 : Machinerie moléculaire de l'horloge circadienne des mammifères (Nader et al., 2010).

La principale boucle de régulation est composée des protéines CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) et BMAL1 (Brain and Muscle ARNt Like protein 1), des facteurs de transcription de la famille basic Helix-Loop-Helix (bHLH) - PAS (Period-Arnt-Single-minded). Après leur hétérodimérisation dans le noyau, les protéines CLOCK et BMAL1 initient la transcription des gènes *Périodes* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) et *Cryptochromes* (*Cry1*, *Cry2*) en se fixant sur des séquences particulières appelées « E-box cis-regulatory enhancer » (i). Ils constituent les régulateurs positifs du système d'horlogerie moléculaire.

Les protéines PER et CRY s'hétérodimérisent dans le cytoplasme, puis après phosphorylation par des caséines kinases 1ε/δ le dimère est transloqué dans le noyau où il va interagir négativement avec CLOCK : BMAL1, inhibant ainsi leur propre transcription (ii).

La boucle auxiliaire (iii) fait également intervenir l'hétérodimère CLOCK : BMAL1 qui active la transcription des gènes *Rev-Erba* et *ROR* (Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptors). Les protéines *Rev-Erba* et *ROR* entrent en compétition dans le but de réguler la transcription

de *Bmal1* grâce à leur capacité de liaison sur une région spécifique de son promoteur, la région ROREs (Retinoic acid-related Orphan Receptor response Elements). Alors que Rev-Erba régule négativement la transcription de *Bmal1*, ROR favorisera sa transcription. Cette boucle auxiliaire a pour rôle de renforcer la boucle principale.

Cette horloge moléculaire contrôle également l'expression de nombreux gènes « de sortie » appelés CCGs (Clock Controlled Genes), entraînant une synthèse rythmique de ces gènes (iv).

Au cours d'un cycle circadien, les niveaux d'expression de ces gènes horloges varient au cours du temps avec une période d'environ 24 heures (Figure 11). Dans les NSC, le niveau d'expression maximum de *Per1* et *Rev-Erba* est atteint rapidement au début du jour subjectif et celui de *Per2* et *Cry1* est atteint plus tard mais toujours durant le jour subjectif. Le niveau maximum d'expression de *Bmal1* est atteint pendant la nuit subjective et le gène *Clock* est exprimé de manière constitutive au cours du temps (Guilding and Piggins, 2007).

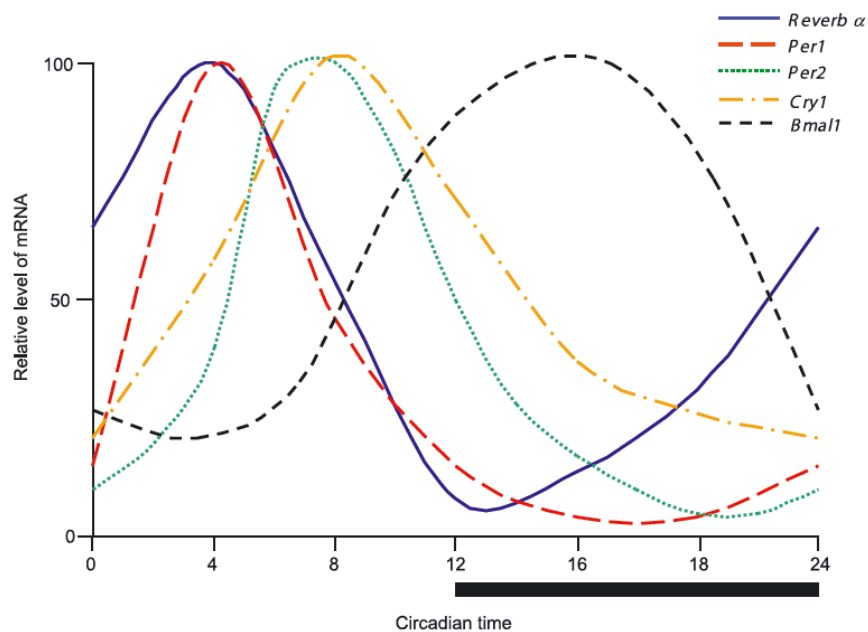


Figure 11 : Variation du niveau d'expression des ARNm des principaux constituants de l'horloge au cours d'un cycle circadien (Guilding and Piggins, 2007).

Les valeurs d'ARNm sont données en niveau relatif (pourcentage du maximum). La nuit subjective est représentée par la barre noire.

L'expression circadienne des composants de l'horloge peut être régulée par des modifications de la chromatine. Un des composants de l'horloge, la protéine CLOCK possède une activité d'histone acetyltransférase favorisant le remodelage de la chromatine et par conséquent l'expression de gènes horloge. CLOCK désacétyle les histones H3 et H4 mais également BMAL1. La désacétylation de BMAL1 prévient le recrutement de CRY1 par l'hétérodimères CLOCK : BMAL1 (Doi et al., 2006; Hirayama et al., 2007).

4. Synchronisation de l'horloge principale des NSC avec l'extérieur

Comme décrit précédemment, l'horloge circadienne des NSC possède une période endogène légèrement différente de 24 heures. Des synchroniseurs externes sont nécessaires à l'établissement d'une période précisément égale à 24 heures de façon à permettre à l'organisme de rester en phase avec l'environnement extérieur.

a) Synchronisateur photique

La lumière est le principal synchronisateur de l'horloge centrale qui peut donc être considérée comme un système « photo-entraîné » permettant d'ajuster sa période endogène à celle du cycle jour/nuit de 24 h (Hannibal, 2002).

Le stimulus lumineux n'aura pas le même impact sur la phase selon le moment de la journée durant lequel il est appliqué. La Figure 12 montre l'effet de la lumière à différents moments du jour et de la nuit subjectifs chez des rongeurs nocturnes placés en condition DD et présentant une période inférieure à 24 h (Figure 12).

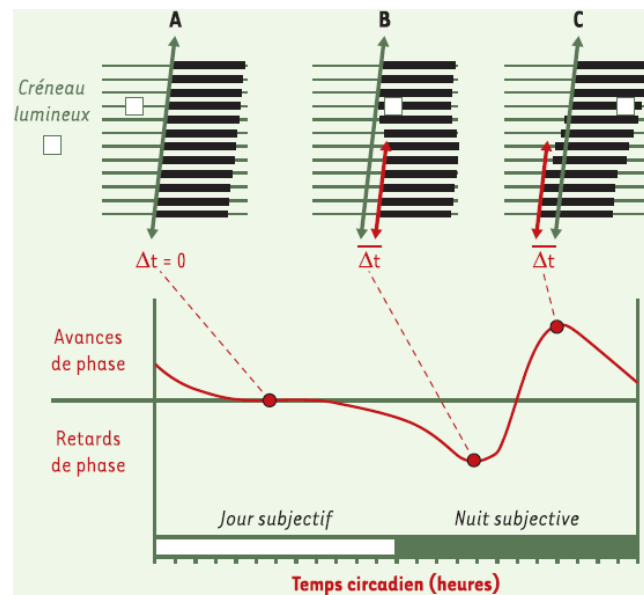


Figure 12 : Représentation schématique de l'influence d'un créneau lumineux sur l'organisation de l'activité locomotrice chez un rongeur nocturne placé en obscurité constante (Dardente and Cermakian, 2005).

La phase de l'activité locomotrice de rongeurs en libre cours (placés en DD) peut être modifiée grâce à l'application d'un signal lumineux à certains moments de la journée. En libre cours, le début de l'activité locomotrice se décale petit à petit dans le temps (flèche verte). L'application d'un créneau lumineux (carré blanc) à différents moments impacte ou non la phase du rythme biologique. Lorsque celui-ci engendre un décalage (avance ou retard) de phase (flèche rouge), une différence temporelle Δt peut être mesurée et reportée afin de reconstruire une courbe de réponse de phase.

Dans cet exemple, si un créneau lumineux est appliqué durant le jour subjectif (A), la phase de l'activité locomotrice n'est pas modifiée. Si le créneau lumineux est appliqué au début de la nuit subjective (B), l'activité locomotrice commence plus tard que prévu les jours suivants, entraînant un retard de phase. En fin de nuit subjective, le créneau lumineux entraîne une avance

de phase (C). En réalisant des créneaux lumineux à plusieurs moments de la journée, une courbe de réponse de phase peut être reconstruite. Elle permet de mettre en évidence l'impact d'un stimulus lumineux sur les rythmes biologiques en fonction du moment où il est appliqué. Les propriétés intrinsèques du créneau lumineux, comme la durée ou l'intensité, vont également jouer un rôle sur le décalage de phase induit par la lumière (Nelson and Takahashi, 1991). La courbe de réponse de phase à un stimulus lumineux varie selon les espèces, en particulier entre les espèces nocturnes et diurnes.

Dans les NSC, l'exposition nocturne à un créneau lumineux induit l'expression des gènes *Per1* et *Per2*. La sensibilité à la lumière de ces gènes n'est pas la même car l'expression de *Per1* est induite par un créneau lumineux en début et fin de nuit alors que seul le créneau de début de nuit induira l'expression de *Per2* (Challet and Pévet, 2003; Shearman et al., 1997 ; Shigeyoshi et al., 1997).

b) Synchronisateurs non photiques

Bien que la lumière soit le principal *Zeitgeber*, d'autres facteurs non photiques ont la capacité de synchroniser l'horloge principale. Ces facteurs sont de natures très diverses : comportementaux (activité physique), chimiques (morphine, mélatonine) ou alimentaires. Alors que la lumière active l'expression de *Per1* et *Per2*, les facteurs non photiques induisent une diminution de ces gènes quand ils sont présentés pendant le jour subjectif entraînant généralement des avances de phases (Challet and Pévet, 2003; Mrosovsky, 1996).

La transmission des facteurs environnementaux aux NSC se fait par l'intermédiaire de plusieurs voies afférentes qui agissent sur la machinerie moléculaire de l'horloge, permettant ainsi de synchroniser précisément l'horloge avec l'environnement. Ce message temporel généré dans les NSC est ensuite transmis à l'ensemble de l'organisme par l'intermédiaire de voies efférentes. Le NSC sert ainsi de relai entre le monde extérieur et l'ensemble de l'organisme.

c) Voies afférentes : transmission des informations extérieures aux NSC

Les informations environnementales parviennent aux NSC via des voies nerveuses et hormonales. Il existe trois principales voies nerveuses (Figure 13). La principale est constituée du tractus rétino-hypothalamique (RHT) et est impliquée dans la synchronisation lumineuse de l'horloge centrale. Une autre voie, le tractus géniculo-hypothalamique (GHT), joue un rôle indirect dans cette synchronisation et est également impliquée dans une synchronisation non photique dépendante de l'état d'éveil. La troisième voie, le tractus sérotoninergique, projette des informations exclusivement non photiques. Ces différentes voies permettent la remise à l'heure de l'horloge centrale par des informations environnementales.

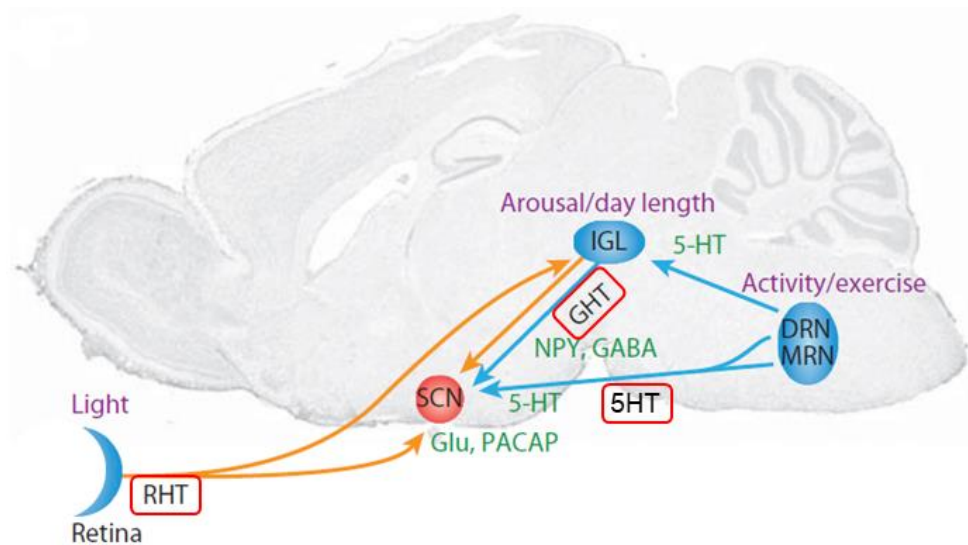


Figure 13 : Représentation schématique des principales voies afférentes des NSC d'après (Dibner et al., 2010).

Les principales afférences nerveuses arrivant aux NSC transmettent des informations photiques (flèches orange) ou non photiques (flèches bleu). Les neurotransmetteurs de ces voies sont indiqués en vert. 5-HT : sérotonine ; DRN : noyau raphé dorsal ; IGL : feuillets intergénéculés ; GABA : acide gamma-aminobutyric ; GHT : tractus géniculo-hypothalamique ; Glu : glutamate ; MRN : noyau raphé médian ; NPY : neuropeptide Y ; PACAP : Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide ; RHT : tractus rétino-hypothalamique ; SCN : noyaux supra chiasmatiques

i. Tractus rétino-hypothalamique (RHT)

Le RHT est une voie monosynaptique impliquée dans la transmission des informations photiques provenant directement de la rétine aux NSC (Moore and Lenn, 1972).

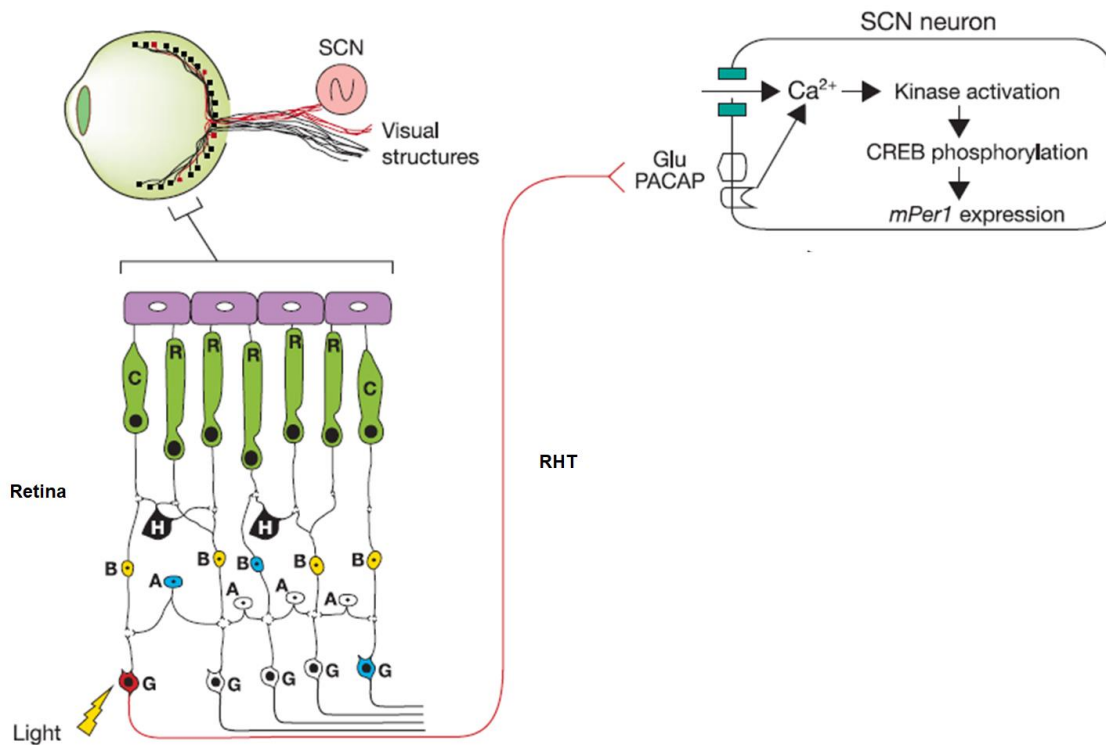


Figure 14 : Transmission de l'information photique de la rétine aux NSC par la voie RHT d'après (Reppert and Weaver, 2002).

Les Cellules Ganglionnaires de la Rétine (CGR) (G, en rouge) reçoivent directement l'information photique et la transmettent aux NSC via une voie monosynaptique qui libère deux neurotransmetteurs, le glutamate (Glu) et le Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) qui, en aval, induisent l'expression du gène horloge *Per1*. Les CGR peuvent également recevoir des afférences des cônes et bâtonnets par l'intermédiaire de cellules bipolaires (B) et amacrines (A).

La lumière est perçue par la rétine, tissu neurosensoriel qui tapisse le fond l'œil. La voie impliquée dans le traitement de l'information photique pour la vision (constitution d'images) et celle impliquée dans le photo-entraînement sont anatomiquement et fonctionnellement différentes. En effet, des lésions spécifiques des fibres constituant de la RHT n'entraînent pas de cécité mais une perte de la capacité de photo-entraînement (Johnson et al., 1988). L'information de photo-entraînement est perçue par des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) intrinsèquement photosensibles (IpCGR) grâce au photopigment mélanopsine (Hannibal et al., 2002 ; Lucas et al., 2012 ; Provencio et al., 2000). Ce photopigment est activé par des longueurs d'ondes comprises entre 460 et 480 nm, correspondant à la couleur bleue (Kumbalasiri and Provencio, 2005). Les axones des IpCGR, constituant les fibres du RHT, projettent directement sur des neurones de la partie ventro-latérale des NSC (Tanaka et al., 1993). Les deux neurotransmetteurs libérés, le glutamate et le neuropeptide Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Protein (PACAP) (Castel et al., 1993 ; Hannibal et al., 1997) entraînent l'activation de la transcription des gènes *Per1* et *Per2* (Shearman et al., 1997; Shigeyoshi et al.,

1997). En effet, la liaison des neurotransmetteurs entraîne une phosphorylation calcium dépendant de CREB (cAMP Response Element Binding) qui induit la transcription des gènes *Per1* et *Per2* indépendamment du dimère CLOCK :BMAL1 (Reppert and Weaver, 2002; Travnickova-Bendova et al., 2002) (Travnickova-Bendova et al., 2002). Ce système permet à la lumière de « réinitialiser » l'horloge via une activation des gènes *Per1* et *Per2*.

En plus de sa projection sur les NSC, le RHT projette sur d'autres structures dont les feuillets intergéniculés (IGL) (Pickard, 1985) (Figure 13).

ii. Tractus géniculo-hypothalamique (GHT)

Le GHT transmet l'information photique de manière indirecte (Figure 13). En effet, il est constitué de neurones des IGL contenant du neuropeptide Y (NPY), du GABA (γ -aminobutyric acid) et de l'enképhaline (Moore and Card, 1994) qui projettent sur les NSC. Ainsi, l'information lumineuse parvient aux NSC par l'intermédiaire de deux voies, une directe via le RHT et l'autre indirecte via le GHT. Ce double contrôle permet aux NSC de moduler leurs réponses après une détection photique rétinienne (Dibner et al., 2010).

iii. Tractus sérotoninergique

La troisième voie qui parvient aux NSC est une voie impliquant la sérotonine. Les neurones sérotoninergiques du noyau du raphé projettent sur la partie ventrale des NSC (Malek et al., 2004). Ces fibres peuvent également projeter sur les IGL. La voie sérotoninergique est impliquée dans la transmission des informations non photiques comme la prise alimentaire par exemple [pour revue (Challet and Pévet, 2003)].

5. Transmission du message journalier des NSC par les voies efférentes

L'alternance des phases d'activité et de veille, mais également le rythme de certaines hormones comme la corticostérone et la mélatonine sont les résultantes de la transmission du message temporel issu des NSC au reste de l'organisme (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972). Ce message est transmis via des efférences neurales et hormonales à de nombreuses structures du cerveau mais également vers des organes périphériques.

Le détail des structures thalamiques et hypothalamiques recevant des efférences des NSC est représenté sur la Figure 15. Ces projections neuronales ont été mises en évidence grâce à des traçages antéro- et rétrogrades. Dans l'hypothalamus, les connexions entre les NSC et la zone sub-paraventriculaire (sPVZ) sont les plus denses (Morin et al., 1994). D'autres efférences sont retrouvées dans l'aire préoptique (POA), dans le noyau du lit de la strie terminale (BNST), le septum latéral (LS), hypothalamus dorso médial (DMH), les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus (PVN) et le noyau arqué (ARC). Dans le thalamus, les structures recevant des efférences sont les noyaux paraventriculaires du thalamus (PVT), les IGL et possiblement habenula (HB). L'existence de projections sur l'amygdale est à confirmer (Dibner et al., 2010 ; Watts and Swanson, 1987 ; Watts et al., 1987).

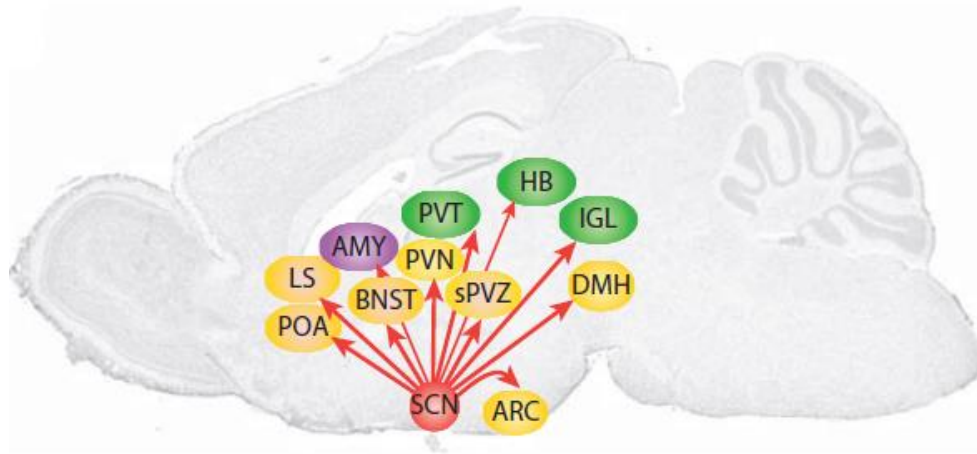


Figure 15 : Principales voies efférentes projetant des NSC vers l'hypothalamus et le thalamus (Dibner et al., 2010).

Les structures de l'hypothalamus sont représentées en jaune et celles du thalamus en vert. AMY : amygdale ; ARC : noyaux arqués ; BNST : noyau du lit de la strie terminale ; DMH : hypothalamus dorso médial ; HB : habenula ; IGL : feuillets intergénéculés ; LS : septum latéral ; POA : aire pré-optique ; PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; PVT : noyau paraventriculaire du thalamus ; SCN : noyaux suprachiasmatiques ; sPVZ : zone sub-paraventriculaire.

L'AVP, le VIP et le GABA sont libérés par les différentes efférences neuronales précédemment décrites (Guilding and Piggins, 2007). Des facteurs diffusibles $TGF\alpha$ (Transforming Growth Factor α), PK2 (Prokineticin 2), CLC (Cardiotrophin-Like Cytokine) sont également exprimés de manière circadienne dans les NSC et sont impliqués dans l'établissement des rythmes de l'activité locomotrice (Cheng et al., 2002; Kramer et al., 2001; Kraves and Weitz, 2006).

Dans l'hypothalamus médian (ARC, DMH et VMH), trois types de neurones cibles ont été décrits dont des neurones endocrines : neurones à CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), à TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) et à GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), des neurones autonomes et des neurones intermédiaires (Kalsbeek and Buijs, 2002). L'ensemble de ces efférences permet aux NSC de transmettre le message temporel directement ou indirectement à un très grand nombre de structures centrales et périphériques pour synchroniser les fonctions biologiques avec l'alternance jour/nuit.

6. Les horloges secondaires

Les NSC ne sont pas les seules structures à posséder une rythmicité circadienne. En effet de nombreux organes, ainsi que d'autres structures centrales, présentent des oscillations circadiennes robustes, tels que le pancréas, les muscles squelettiques, le foie, la rétine, le bulbe olfactif, le cervelet ... La découverte des gènes horloges a permis de mettre en évidence que ces structures possèdent la même machinerie moléculaire circadienne que les NSC, appelée horloge secondaire (Yagita et al., 2001). La création de souris transgéniques dont le gène *Per2* a été fusionné à celui codant pour la luciférase a permis de mettre en évidence la persistance d'oscillations circadiennes dans les tissus périphériques gardés isolés en culture (Figure 16). Des cellules isolées d'organes de ces souris, notamment les fibroblastes, ont permis de montrer qu'en réalité, la très grande majorité des cellules possède une machinerie moléculaire

circadienne conduisant à des rythmes autoentretenus propres à chaque entité cellulaire (Nagoshi et al., 2004; Welsh et al., 2004). Les périodes et phases observées sont tissus spécifiques. Bien qu'une lésion des NSC n'abolisse pas les rythmes circadiens dans les organes périphériques, une désynchronisation des phases a été observée (Yoo et al., 2004).

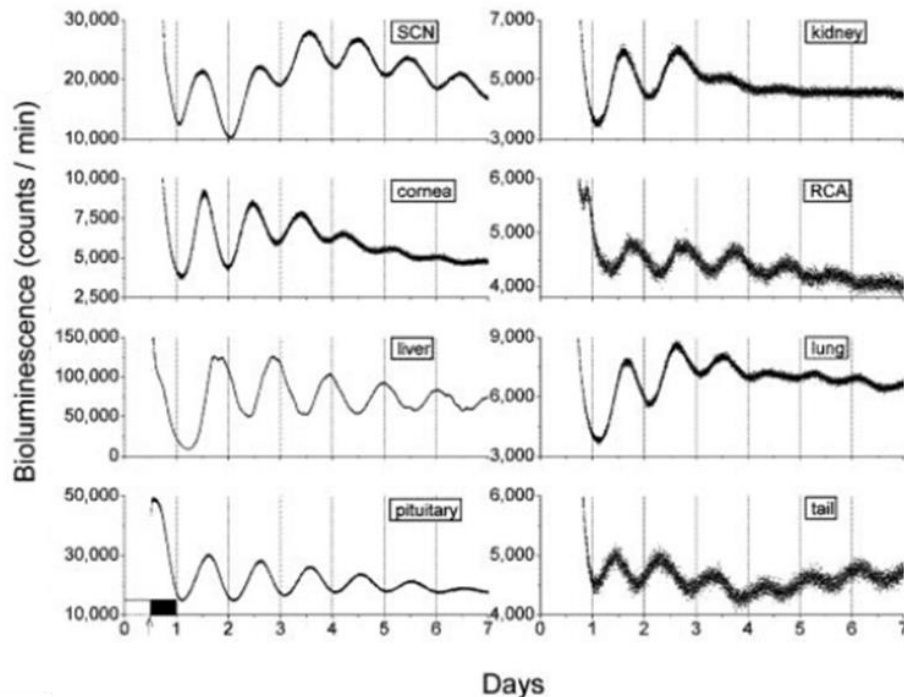


Figure 16 : Mise en évidence de la persistance d'oscillations circadiennes dans les tissus périphériques (Yoo et al., 2004).

Mise en évidence de l'expression circadienne de la protéine PER2 couplée à la luciférase grâce à l'enregistrement de la bioluminescence. Les tissus, provenant des souris transgéniques PER2::LUC, ont été prélevés avant l'obscurité (flèche). L'ensemble des tissus montrent un rythme persistant qui s'amortit peu à peu pour certains tissus. SCN : noyaux suprachiasmatiques ; RCA : Aire retrochiasmatique.

Ces horloges secondaires autonomes sont entrainables par l'horloge centrale via des signaux neuronaux, hormonaux directement issus des NSC mais également par des métabolites dont la synthèse est elle-même régulée par ces organes périphériques. Le rythme veille/sommeil ainsi que le rythme jeûne-prise de nourriture sont des éléments de synchronisation importants. La rythmicité endogène de ces horloges peut être différente de celle des NSC, permettant ainsi à la fois de réguler finement les fonctions associées et une certaine flexibilité au système (Figure 17).

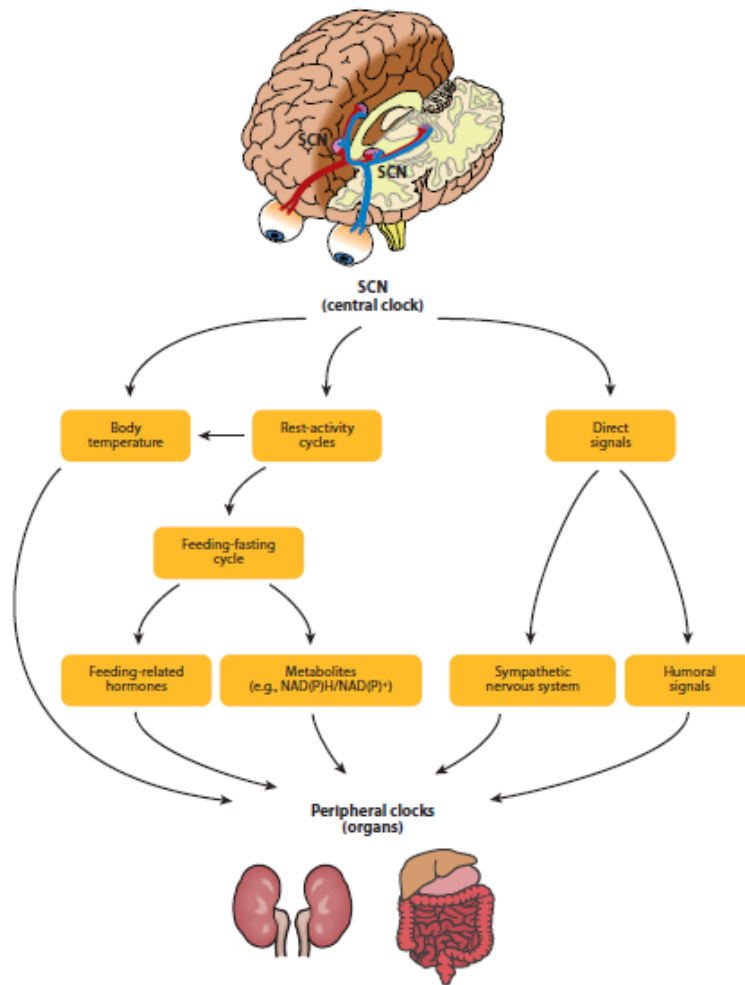


Figure 17 : Synchronisation des horloges secondaires par les NSC (Dibner et al., 2010).

Tout comme l'horloge principale, les horloges secondaires sont compensées thermiquement. En effet, les oscillations circadiennes de l'expression des gènes de l'horloge sont conservées dans une gamme de température relativement importante, de 33°C à 42°C, dans des fibroblastes de souris maintenus en culture (Tsuchiya et al., 2003).

De nombreuses fonctions biologiques présentent un rythme journalier, la plus évidente est la régulation du cycle veille/sommeil mais également la prise alimentaire, le métabolisme des lipides et des carbohydrates ; la régulation de la pression sanguine, les battements cardiaques, la température corporelle (Tb). L'étude du transcriptome du foie a mis en évidence que 5 à 10% des ARNm sont exprimés selon un rythme journalier robuste (Akhtar et al., 2002; Panda et al., 2002; Stratmann and Schibler, 2006). Ces rythmes journaliers n'ont pas tous la même acrophase mais ils sont néanmoins coordonnés pour assurer la meilleure adaptation de l'organisme à son environnement via des phénomènes d'anticipation. Par exemple chez l'Homme, au début de la nuit la Tb diminue et la sécrétion de mélatonine augmente afin de favoriser le sommeil alors qu'en fin de nuit, la sécrétion de cortisol, les battements du cœur et la pression sanguine augmentent en prévision du réveil. D'un point de vue métabolique, les fonctions cataboliques sont privilégiées pendant la période de jeûne (sommeil) et les fonctions anaboliques pendant la phase d'éveil. Cette exclusion temporelle de fonctions, comme la lipogenèse et l'oxydation des

acides gras dans le foie, permet à l'organisme d'optimiser le fonctionnement de chaque organe en fonction des stimuli exogènes (Figure 18) (Dibner et al., 2010; Gachon et al., 2004).

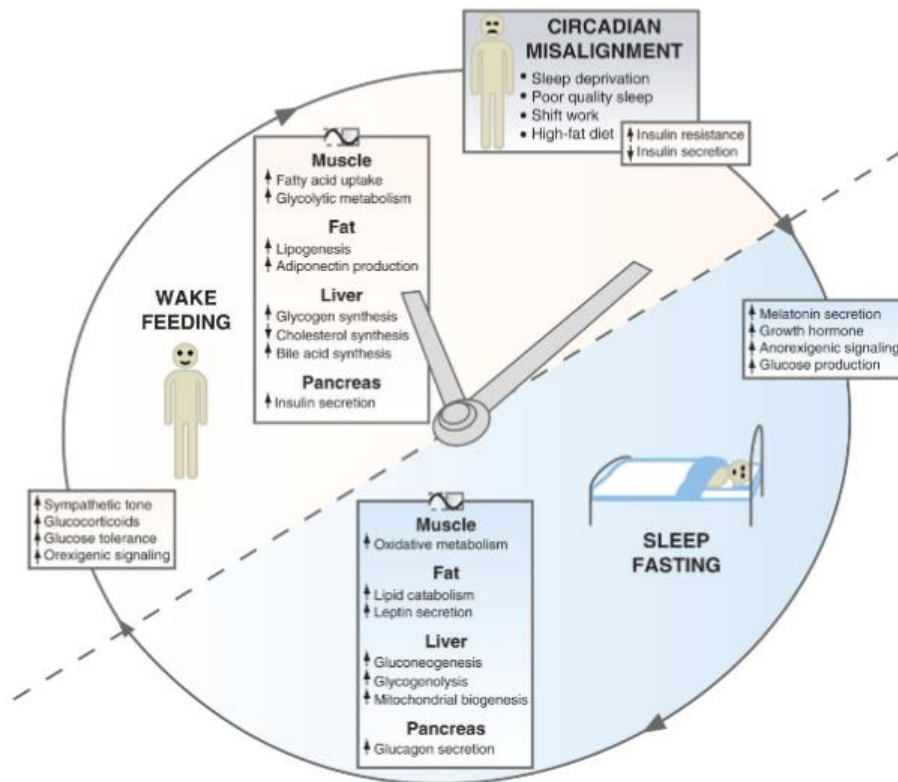


Figure 18 : Variations journalières des fonctions métaboliques (Marcheva et al., 2010).

Dans les organes périphériques les grandes fonctions métaboliques varient au cours de la journée en fonction de l'alternance jour/nuit. Cette séparation temporelle des réactions cataboliques et anaboliques permet à l'organisme de s'adapter, d'anticiper les variations de l'environnement. Une altération répétée de la coordination entre l'horloge centrale et le métabolisme, comme lors d'un travail posté, peut entraîner de profonds dérèglements.

7. Lien entre les horloges circadiennes et le métabolisme

a) Mise en évidence du couplage horloge-métabolisme

L'alternance des phases de jeûne et de prise alimentaire est un synchronisateur puissant pour un grand nombre d'horloges secondaires comme le foie ou le pancréas. Il existe un couplage fort entre le statut métabolique et les mécanismes d'horloge. En effet, un dérèglement des horloges favorise la survenue de certaines pathologies métaboliques (diabète, obésité). Des animaux KO pour certains composants de l'horloge présentent de nombreuses altérations métaboliques (Table 2). Les souris possédant une délétion dans l'exon 19 du gène *Clock* (*Clock*^{Δ19/Δ19}) présentent une altération du rythme de prise de nourriture mais également des troubles du métabolisme du glucose et des lipides. Ces souris sont hyperphagiques et prédisposées au diabète (King et al., 1997; Marcheva et al., 2010; Turek et al., 2005; Vitaterna et al., 1994).

Disrupted gene	Physiological effects
<i>Bmal1</i>	Infertility Progressive arthropathy Abnormal gluconeogenesis Abnormal lipogenesis Altered sleep pattern
<i>Clock</i> ^a	Metabolic syndrome Abnormal gluconeogenesis Abnormal behavioral sensitization to psychostimulant Altered sleep pattern
<i>Per1</i>	Abnormal apoptosis/cancer development Abnormal behavioral sensitization to psychostimulant
<i>Per2</i>	Improper cell division/cancer development Abnormal behavioral sensitization to psychostimulant Improper alcohol intake FASPS(80)
<i>Per3</i>	Associated with DSPS (80)
<i>Cry1;Cry2</i>	Altered sleep pattern
<i>Rora</i>	Cerebellar ataxia Abnormal bone metabolism
<i>Rorb</i>	Locomotor difficulties Retinal degeneration/blind Male reproductive abnormality during first 6 months of age
<i>Rory</i>	Lack of lymphoid organ development Abnormal lymphocyte homeostasis
<i>NPAS2</i>	Altered sleep pattern Impaired memory
<i>CK1α/CK1β</i>	FASPS (80)

^a*Clock*^{Δ19/Δ19} mutation.

Table 2 : L'invalidation des composants de horloge circadienne entraine de multiples altérations, en particulier en lien avec le métabolisme (Ko and Takahashi, 2006).

Les composants de l'horloge ont donc un rôle majeur dans les fonctions métaboliques. De la même manière, certains éléments du métabolisme peuvent agir directement sur l'horloge, en particulier la prise de nourriture. En effet, il a été montré chez la souris, qu'un régime alimentaire riche en graisse (HFD : High Fat Diet) durant la période de repos habituel entraine une prise de poids plus importante que chez les animaux nourris durant la période d'activité (Arble et al., 2009). Chez des souris placées en obscurité constante un régime HFD entraine une altération de la période de l'activité locomotrice et une désorganisation du rythme de la prise de nourriture. Les souris sous HFD ont tendance à manger plus pendant la phase de veille. Cette altération de la rythmicité circadienne se reflète à la fois au niveau du comportement mais également à l'échelle moléculaire car l'expression des principaux composants de l'horloge est altérée (Kohsaka et al., 2007).

Ces études mettent en évidence un lien direct et réciproque entre le métabolisme et l'horloge. Plusieurs facteurs, de diverses natures, interviennent dans ce couplage.

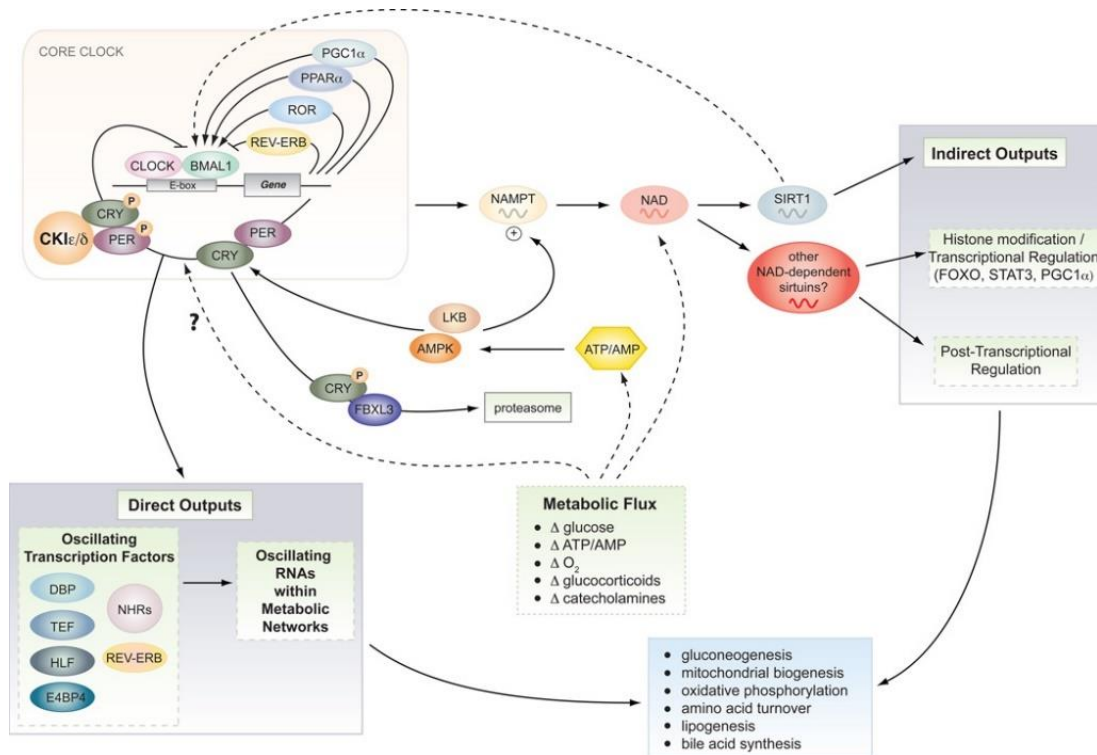


Figure 19 : Couplage des mécanismes de l'horloge circadienne avec le métabolisme (Bass and Takahashi, 2010).

Le couplage entre les mécanismes moléculaires de l'horloge et le métabolisme est réciproque. L'horloge centrale synchronise directement et indirectement des processus métaboliques. A son tour l'horloge va recevoir des informations provenant directement de la dégradation des nutriments mais également de récepteurs nucléaires. PPARα : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α ; PGC1α : PPARγ coactivator-1 ; NAMPT : nicotinamide phosphoribosyltransférase ; NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; SIRT1 : Sirtuine 1 ; LKB : Liver Kinase B1 ; FBXL3 : F-box/LRR-repeat protein 3 ; DBP : site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein ; TEF : Thyrotrophic Embryonic Factor ; HLF : Hepatic Leukemia Factor ; E4BP4 : nuclear factor, interleukin 3 regulated ; FOXO : Forkhead box O3 ; STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3 ; NHR : Nuclear Hormone Receptor .

b) Couplage par des métabolites

Le niveau intracellulaire de NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide) est un indicateur du statut énergétique de la cellule. Deux voies de biosynthèse sont impliquées dans la production du NAD⁺, il peut être synthétisé *de novo* à partir du tryptophane ou via une voie de recyclage impliquant une enzyme, la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) (Rongvaux et al., 2003). Le NAD⁺ et la NAMPT présentent une expression circadienne sous le contrôle de l'horloge dans certains organes périphériques comme le foie et le tissu adipeux. L'hétérodimère CLOCK:BMAL1 régule l'expression de la NAMPT (Nakahata et al., 2009 ; Ramsey et al., 2009). A son tour, l'activité de l'horloge peut être modulée par le NAD⁺ par l'intermédiaire de SIRT1. SIRT1 module l'activité de ces protéines cibles par déacétylation

dont le NAD⁺ est un cofacteur (Figure 20). L'activité de cette enzyme est sous le contrôle de nombreux facteurs dont le jeûne.

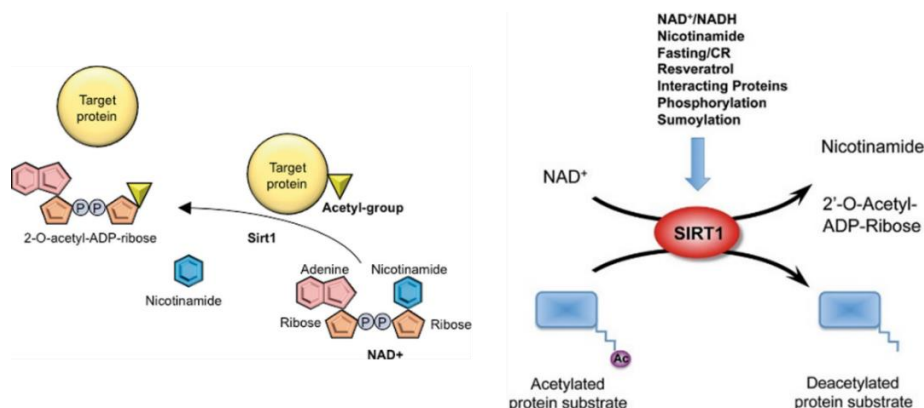


Figure 20 : Mécanisme d'action de la protéine déacétylase SIRT1 (Li, 2013; Oka et al., 2012).

La protéine SIRT1 module l'activité de protéines cibles via son activité de déacétylation. Le NAD⁺ est hydrolysé en nicotinamide et le groupe acétyl est transféré en position 2'-OH de l'ADP-ribose. Son activité peut être modulée par des facteurs environnementaux, nutritionnels (comme la restriction calorique CR) et hormonaux par l'intermédiaire de la disponibilité en NAD⁺.

SIRT1 active la déacétylation de BMAL1, des histones mais également de PER2 modulant ainsi la transcription des gènes de l'horloge (Figure 21). De ce fait le statut énergétique de la cellule peut influencer directement les composants de l'horloge.

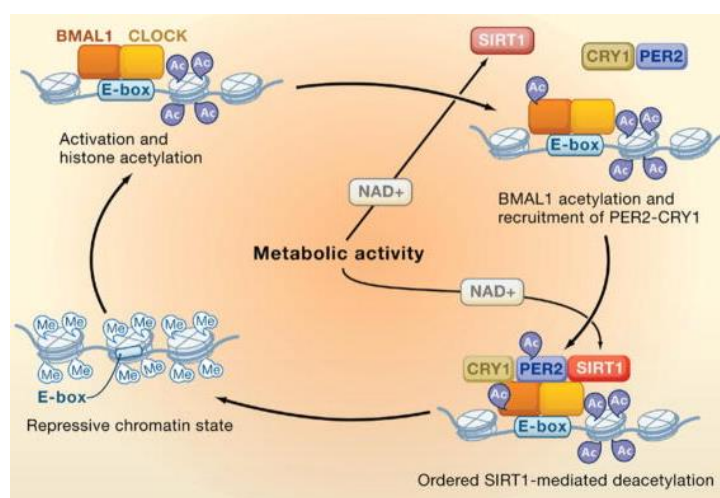


Figure 21 : Régulation des composants de l'horloge par SIRT1 (Belden and Dunlap, 2008).

Lorsque que l'hétérodimère BMAL1 : CLOCK est lié à l'ADN, l'acétylation de BMAL1 et des histones par CLOCK favorise le recrutement de CRY1 et PER2. A son tour PER2 est acétylée. SIRT1 désacétyle les histones, BMAL1, et finalement PER2 engendrant un état de la chromatine défavorable à la transcription. L'activité de SIRT1 est contrôlée par l'activité métabolique.

Dans les fibroblastes de souris, CRY1 est phosphorylée par l'AMP-activated protein kinase (AMPK) entraînant sa déstabilisation (Lamia et al., 2009). L'AMPK est sensible au ratio intracellulaire AMP/ATP faible reflétant une balance énergétique cellulaire négative. L'AMPK

peut être activée par le stress métabolique comme le manque de glucose (Foretz et al., 2006; Hardie, 2007). L'activation de l'AMPK par des signaux nutritionnels entraîne une altération de l'horloge circadienne dans les organes périphériques.

c) Couplage par des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires forment une grande famille de facteurs de transcription. Certains sont induits par leur ligand alors que d'autres sont orphelins. Ils sont impliqués dans un très grand nombre de fonctions biologiques comme la reproduction, le métabolisme, l'immunité mais également le système de l'horloge (Teboul et al., 2008). L'expression de nombreux récepteurs nucléaires varie de manière circadienne (Yang et al., 2006). Deux récepteurs orphelins sont directement impliqués dans le mécanisme de l'horloge, Rev-Erb α et ROR, qui sont à la fois des éléments régulés et régulateurs. Les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) sont également des facteurs nucléaires impliqués dans de nombreux processus physiologiques en particulier le métabolisme.

i. Rev-Erb α

Rev-Erb α est exprimé de manière circadienne dans un grand nombre d'organes et joue un rôle central dans l'homéostasie métabolique (Figure 22). Il est en particulier impliqué dans la régulation circadienne de la lipogenèse, la thermorégulation et l'adipogenèse. L'hème est probablement le ligand endogène du récepteur nucléaire Rev-Erb α (Raghuram et al., 2007; Yin et al., 2007).

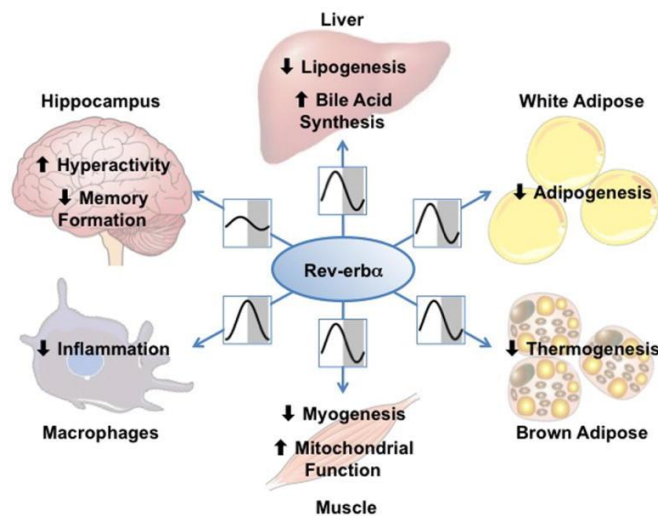


Figure 22 : Différents rôles de Rev-Erb α (Everett and Lazar, 2014).

Dans le foie de souris, Rev-Erb α se lie au promoteur de *Bmal1* pour recruter le complexe corépresseur composé de NCoR (Nuclear Corepressor 1) et HDAC3 (Histone Deacetylase 3) (Yin and Lazar, 2005). Cette dernière désacétyle les histones entraînant un environnement chromatique défavorable à la transcription des gènes cibles. Quand les animaux sont actifs, Rev-Erb α est peu exprimé engendrant une diminution de l'association avec HDAC3 permettant ainsi la synthèse des lipides. En période de jeûne, la lipogenèse est réprimée grâce à la liaison

du corépresseur HDAC3/NCoR (Figure 23). Une délétion hépatique de Rev-Erb α ou de HDAC3 entraîne une accumulation de graisse ou stéatose (Feng et al., 2011).

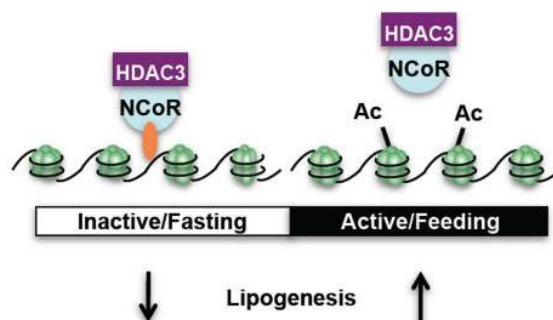


Figure 23 : Mode d'action du corépresseur HDAC3/NCoR (Feng et al., 2011).

ii. PPARs

Les PPARs sont des facteurs de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. Ils s'hétérodimérisent avec le RXR (retinoid X receptor) avant de se lier au PPRE (PPAR responsive element) présent dans les régions régulatrices de leurs gènes cibles. Les acides gras sont des ligands naturels des PPARs, qui sont impliqués, en autres, dans le métabolisme des lipides (Table 3).

Target genes	Gene expression
Fatty acid uptake, binding, and activation	
Fatty acid transport protein (FATP)	Increase
Fatty acid translocase (FAT/CD36)	Increase
Liver cytosolic fatty acid-binding protein (L-FABP)	Increase
Acyl-CoA synthetase (ACS)	Increase
Carnitine palmitoyltransferase I and II (CPT-I and CPT-II)	Increase
Mitochondrial β -oxidation	
Very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)	Increase
Long chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD)	Increase
Medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)	Increase
Short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD)	Increase
Peroxisomal β -oxidation	
Acyl-CoA oxidase (ACOX)	Increase
Bifunctional enzyme (HFD)	Increase
3-Ketoacyl thiolase (Thiolase)	Increase
Microsomal ω -hydroxylation	
Cytochrome P450 4A1 and 4A6 (CYP4A1 and CYP4A6)	Increase
Hydrolysis of plasma triglycerides	
lipoprotein lipase (LPL)	Increase
Apolipoprotein C-III (ApoC-III)	Decrease
Fatty acid synthesis	
Acetyl-CoA carboxylase (ACC)	Decrease
Fatty acid synthase (FAS)	Decrease
Liver ketogenesis	
HMG-CoA synthase (HMGCS)	Increase
Fatty acid interconversion	
Stearoyl-CoA desaturase (SCD)	Increase
HDL metabolism	
Apolipoprotein A-I and A-II (ApoA-I and ApoA-II)	Increase
ATP-binding cassette transporter 1 (ABCA1)	Increase
Electron transport chain	
Uncoupling protein 1, 2, and 3 (UCP1, UCP2, and UCP3)	Increase

Table 3 : Gènes cibles de PPAR α impliqués dans le métabolisme (Yoon, 2009).

Trois isoformes ont été décrites PPAR α , β/δ , et γ , elles sont différemment exprimées au sein des tissus. PPAR α , principalement retrouvé dans le foie, le tissu adipeux brun (BAT), le cœur et le rein. (Chen and Yang, 2014; Desvergne and Wahli, 1999), est impliqué dans l'adaptation au jeûne, en stimulant l'oxydation des acides gras hépatiques. Pendant le jeûne, les acides gras

sont libérés dans la circulation sanguine afin de rejoindre le foie où ils sont oxydés. Des souris *PPARα* $-/-$ soumises à un régime riche en graisses présentent une accumulation lipidique dans le foie. Chez les souris WT, *PPARα* est induit pendant le jeûne (Kersten et al., 1999). Il existe un lien réciproque entre *PPARα* et l'horloge circadienne. En effet, l'expression circadienne de *PPARα* dans les horloges secondaires est sous le contrôle de CLOCK (Oishi et al., 2005). A son tour, *PPARα* régule l'expression de BMAL1 et PER2 en se liant sur leur région PPRE présente sur la région promotrice. Les oscillations de BMAL1 et PER3 dans le foie sont altérées chez les souris *PPARα* $-/-$ alors qu'aucune altération de l'expression des gènes horloges n'est observée dans les NSC (Canaple et al., 2006; Oishi et al., 2005; Schmutz et al., 2010).

iii. Bilan

Les horloges principales et secondaires sont régulées par de nombreux facteurs dont les signaux métaboliques. Ce couplage se fait par l'intermédiaire de métabolites et de récepteurs nucléaires qui modulent à la fois la transcription des principaux composants de l'horloge mais également leur activité par des modifications post traductionnelles. Cette modulation est réciproque car les composants de l'horloge régulent aussi ces différents facteurs. Ce couplage va permettre l'ajustement de la période en fonction des informations métaboliques reçues dans les horloges principale et secondaires (Figure 24).

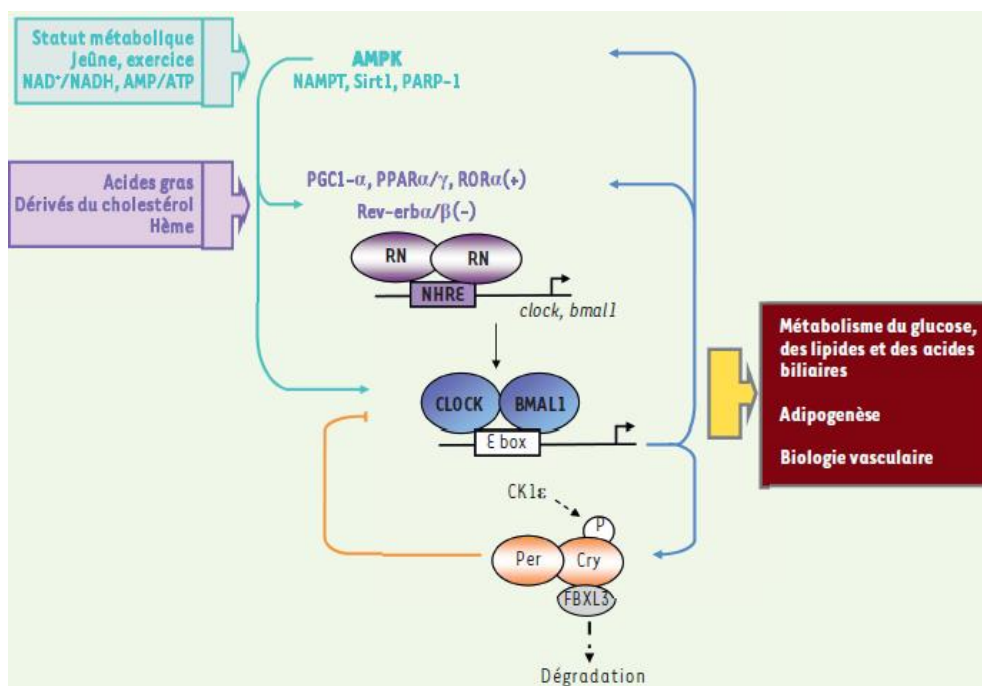


Figure 24 : Relation entre le statut énergétique et les mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne (Duez et al., 2013) .

Les activateurs CLOCK et BMAL1 favorisent la transcription des répresseurs Per et Cry qui vont entrer dans le noyau pour réprimer CLOCK/BMAL1. Une deuxième boucle transcriptionnelle se superpose à la première. CLOCK/BMAL1 favorise l'expression de Rev-Erba et ROR qui vont alors réguler CLOCK et BMAL1. De nombreux signaux métaboliques peuvent moduler le fonctionnement de l'horloge par l'intermédiaire entre autres de récepteurs nucléaires. NHRE : élément de réponse à un récepteur nucléaire ; FBXL3 : F-box and leucine-rich repeat protein 3 (cette protéine dégrade le cryptochrome quand il est phosphorylé) ; CK1ε : caséines kinases

8. Bilan et dérèglement de l'horloge

Le contrôle journalier des fonctions biologiques résulte de l'intégration de facteurs exogènes, en particulier la lumière, mais aussi endogènes (métabolites) au sein des neurones des NSC où ils régulent la machinerie moléculaire de l'horloge circadienne. Les NSC transmettent leur message temporel par l'intermédiaire de différentes voies nerveuses et hormonales vers l'ensemble de l'organisme. Le système circadien hiérarchique est modulé par l'existence d'horloges secondaires qui peuvent être synchronisées de façon indépendante des NSC. De nombreuses fonctions biologiques présentent un rythme circadien (la prise de nourriture, le sommeil, la régulation du glucose...) mais peuvent être altérées par des perturbateurs circadiens (travail posté de nuit, déséquilibre alimentaire...). Ces dysfonctionnements peuvent entraîner des troubles du sommeil et du métabolisme, voir favoriser l'apparition de cancers. En effet, l'Homme est un mammifère diurne, physiologiquement adapté à une période d'activité et de prises alimentaires diurnes et une période nocturne de jeûne et de repos. L'industrialisation de la société a entraîné de grands bouleversements dans les modes de vie et dans le rapport à l'environnement : l'introduction exponentielle de lumière artificielle, le travail posté ou le décalage horaire qui agissent directement sur le fonctionnement des horloges internes. Ceci entraîne des perturbations de la rythmicité journalière, qui sont associées à des troubles métaboliques comme la résistance à l'insuline, la sécrétion anormale de leptine ou de glucose (Challet, 2009, 2013; Maury et al., 2010). Un dérèglement des rythmes circadiens pourrait également être associé à un vieillissement cellulaire prématuré (Grosbellet et al., 2015). La compréhension des mécanismes contrôlant les rythmes circadiens est fondamentale, preuve de cette importance, les travaux de Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash and Michael W. Young ont été récompensés par un prix Nobel en 2017.

D. Rythmes saisonniers

1. Rythmes saisonniers, phénomène de photoréfraction et horloge circannuelle

Sous les latitudes hautes et tempérées, les saisons sont caractérisées par des changements annuels importants de la durée et de l'intensité de la lumière, de la température et de la disponibilité en nourriture. A l'exception des animaux de laboratoire (rat, souris) et des humains qui se sont affranchis des variations annuelles de leur environnement, la plupart des espèces adaptent leurs fonctions biologiques avec les saisons. Cette adaptation est particulièrement critique pour la fonction de reproduction et la régulation du métabolisme. En effet, il est primordial que les petits naissent durant la saison favorable (typiquement le printemps et l'été) afin de maximiser leur chance de survie. Pour cela, les espèces saisonnières ont adapté leur période de reproduction en fonction à la fois des saisons mais également de leur durée de gestation. Les espèces dont la durée de gestation est courte se reproduisent durant les jours longs (reproducteurs de jour long comme le hamster d'Europe), alors que les espèces présentant une durée de gestation longue, se reproduisent durant les jours courts (reproducteurs de jours courts comme le mouton) (Figure 25).

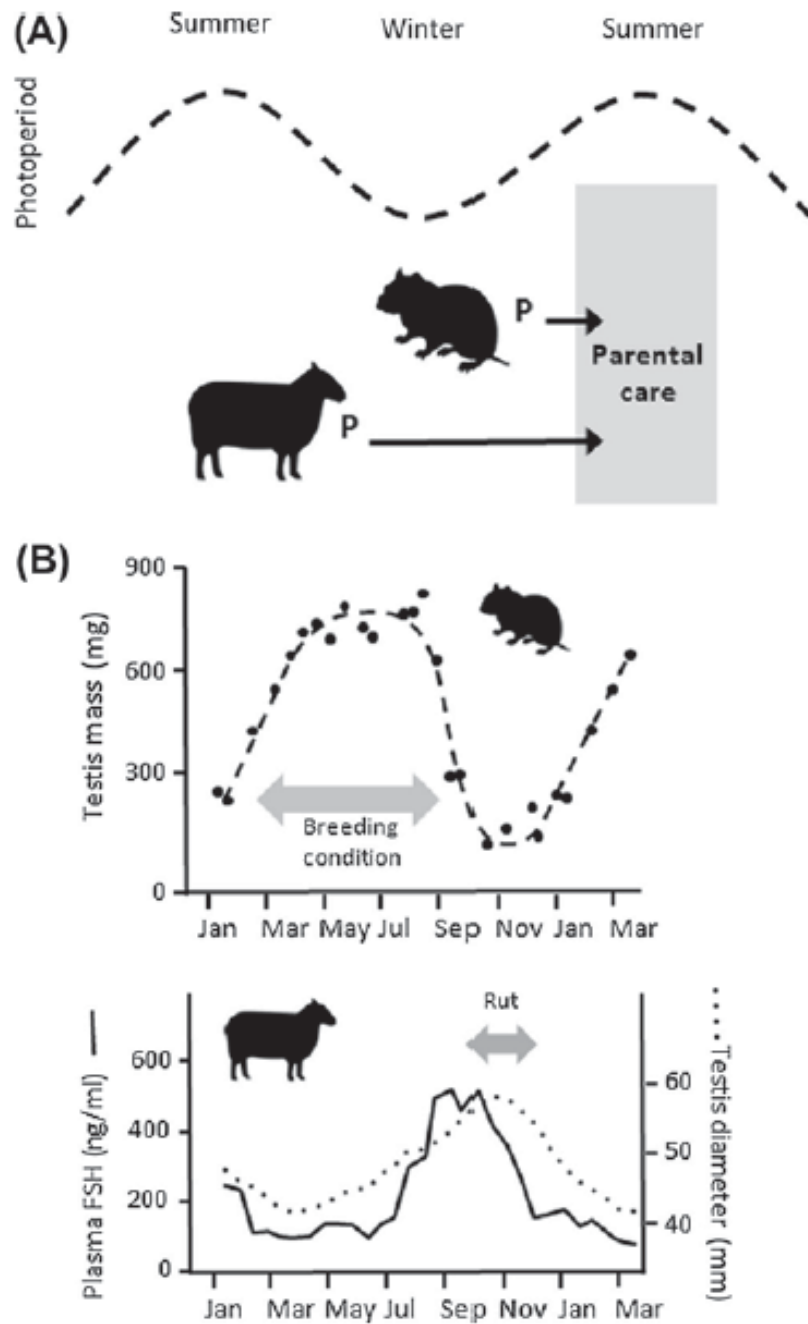


Figure 25 : La période de reproduction dépend de la durée de gestation (Hazlerigg and Simonneaux, 2015b).

(A) Les variations saisonnières de la photopériode se reflètent directement par des variations du pattern de sécrétion de la mélatonine (une photopériode courte (PC) se traduit par une durée de sécrétion de mélatonine longue). La naissance des petits a lieu lors des saisons plus favorables. La durée de gestation détermine donc la période de reproduction. Chez les reproducteurs de jours longs (hamster), l'accouplement (P) est initié durant l'été alors que chez les reproducteurs de jours courts (mouton), il est initié durant l'hiver.

(B) La taille testiculaire reflète parfaitement les variations saisonnières de la fonction reproductive. En condition photopériodique naturelle, une régression testiculaire est observée durant l'hiver chez le hamster. Un profil inverse est observé chez le mouton. La régulation des fonctions saisonnières est donc différente chez ces espèces.

D'autres adaptations saisonnières sont également observées. Certains animaux vont montrer des phases annuelles de migration (Gwinner and Helm, 2003) quittant leurs régions de reproduction vers des régions d'hivernage où les conditions environnementales sont plus propices (hirondelle, cigogne...). D'autres restent sur place mais vont changer la couleur ou la densité de leur pelage (Duncan and Goldman, 1984a, 1984b), adapter leur poids corporel (Figure 26) (Masson-Pévet et al., 1994) ou bien encore réduire drastiquement leur activité métabolique grâce à des comportements tel que la torpeur journalière ou l'hibernation (hamster d'Europe, marmotte...).

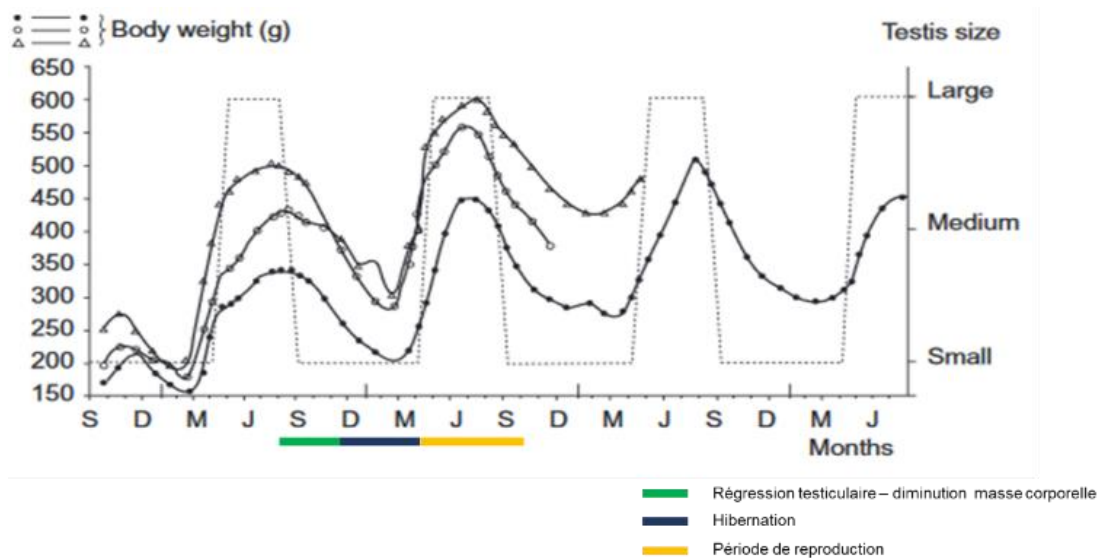


Figure 26 : Evolution de la masse corporelle et de la taille testiculaire au cours des mois de plusieurs hamsters d'Europe d'après (Masson-Pévet et al., 1994).

Au cours de l'année, le poids corporel des hamsters d'Europe évolue. A la fin de l'été, en même temps que la régression testiculaire est initiée, le poids corporel diminue. Cette diminution est maximale à la fin de l'hiver. Le poids corporel ré-augmente après le réveil de l'hibernation, qui devient alors maximale au cours de l'été. Le suivi des animaux sur plusieurs années permet de mettre en évidence une récurrence de cette variation annuelle du poids corporel.

Deux grands systèmes de régulation des fonctions saisonnières peuvent être décrits, l'un est une réponse passive aux changements annuels de la photopériode (éventuellement modulée par la température et des facteurs métaboliques). Ces espèces gardées en conditions constantes de photopériode ne montrent pas de variations de leurs fonctions saisonnières. Le hamster sibérien (*Phodopus sungorus*) et le hamster syrien (*Mesocricetus auratus*) sont des espèces qui ont été largement étudiées dans ce contexte. Ainsi, les hamsters syriens gardés en photopériode longue (PL) soit 14 heures de lumière et 10 heures de nuit, restent sexuellement actifs indéfiniment alors que maintenus en photopériode courte (PC : 10 h de lumière et 14h de nuit) une régression testiculaire est observée. Néanmoins si la PC est maintenue pendant plusieurs mois (entre 22 et 28 semaines), cette période de quiescence sexuelle est spontanément abolie et les hamsters redeviennent sexuellement actifs bien que le profil mélatoninergique soit toujours de type PC inhibiteur (Figure 27) (Turek et al., 1975). Cette réactivation spontanée de la fonction reproductrice est appelée photoréfraction. Les mécanismes impliqués restent encore inconnus bien qu'un travail récent suggère un rôle particulier de la T3 hypothalamique (Milesi

et al., 2017). Une exposition à une PL est nécessaire à l'arrêt de cet état réfractaire et la reprise de l'activité sexuelle (Lincoln et al., 2005).

Il est important de noter que la notion de PL et PC n'est pas universelle mais espèce dépendante. En effet pour chaque espèce, une photopériode critique peut être déterminée, elle correspond à la durée de jour minimale permettant de maintenir une activité reproductrice.

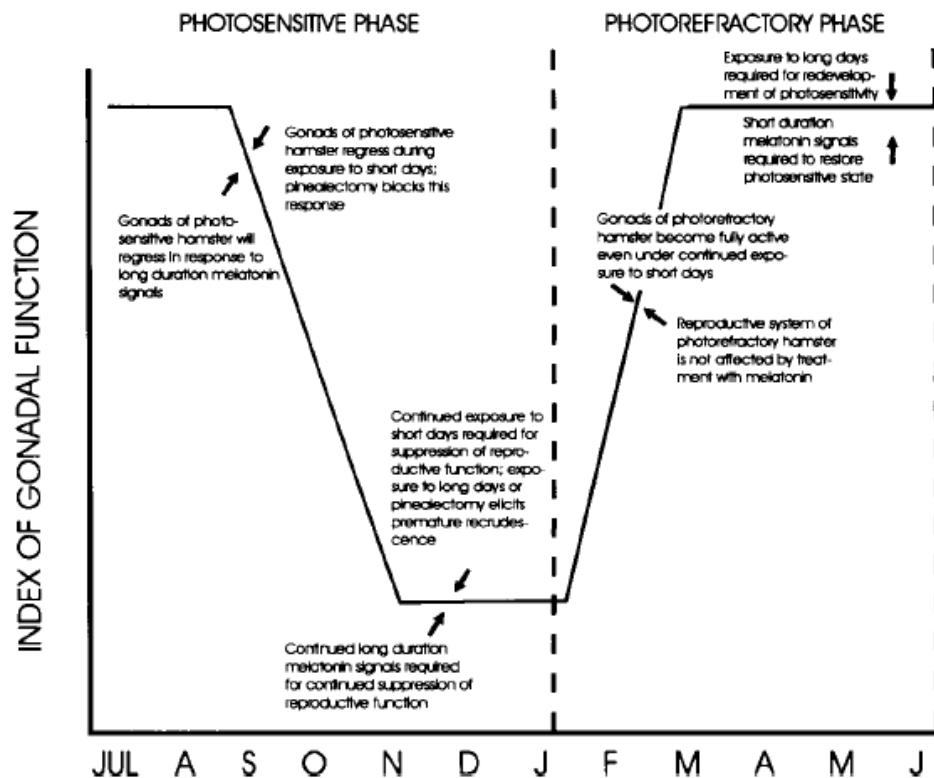


Figure 27 : Effet de la photopériode sur une fonction saisonnière, la reproduction chez une espèce non circannuelle, le hamster syrien (Goldman, 2001).

A la fin de l'été, synonyme de diminution de la photopériode, une régression testiculaire est observée. Après quelques mois, le système reproducteur (recrudescence testiculaire) redevient actif, ce phénomène correspond à la photoréfraction. Après avoir été exposé à une PL, l'animal redevient sensible à la photopériode.

L'autre grand système de régulation est dépendant d'une horloge circannuelle (du latin *circa* : environ et *annus* : an) dont la localisation et les mécanismes de fonctionnement sont encore mal connus. Des expériences menées sur des durées importantes ont permis de mettre en évidence les propriétés de cette horloge. Gardés en conditions constantes pendant plusieurs années, les animaux, comme le mouton ou le hamster d'Europe, montrent inéluctablement des variations de leurs physiologies sur une période d'environ dix mois (Boissin and Canguilhem, 1988; Lincoln et al., 2006; Masson-Pévet et al., 1994). L'existence d'une telle horloge n'est observée que chez les espèces dont la durée de vie s'étend sur plusieurs années. Des études menées chez le mouton (Lincoln et al., 2006) et le hamster d'Europe, (Sáenz de Miera et al., 2014, 2015) suggèrent que l'horloge circannuelle serait localisée dans une région spécifique de l'hypophyse, la *pars tubéralis* (Figure 28). Cette région, très riche en récepteur à la mélatonine,

joue un rôle essentiel dans le contrôle des fonctions saisonnières (sa fonction sera discutée plus largement dans la partie : Mélatonine et fonctions saisonnières II.A.3.b).

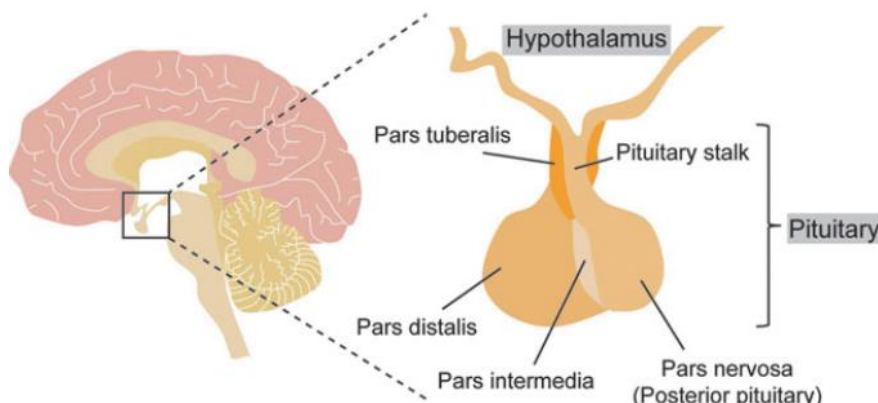


Figure 28 : Représentation schématique de la glande pituitaire (Nakayama and Yoshimura, 2017).

Chez l'Homme, l'hypophyse ou glande pituitaire est formée de deux lobes, le lobe antérieur ou antéhypophyse et le lobe postérieur ou post- hypophyse. Un troisième lobe intermédiaire est retrouvé chez un grand nombre de mammifères, ce lobe est situé entre les deux premiers.

La neurohypophyse (post hypophyse) est formée par du tissu nerveux elle correspond à une excroissance de l'hypothalamus. Des groupes d'axones bien définis provenant de l'hypothalamus (noyaux supra-optique et paraventriculaire) passent par la tige pituitaire et se terminent directement sur des capillaires dans la neurohypophyse. A contrario, il n'y a pas de connexion nerveuse importante entre l'hypothalamus et antéhypophyse (adénohypophyse) mais une vascularisation particulière. Des vaisseaux provenant de l'éminence médiane se recombinent pour former les vaisseaux portes hypothalamo- hypophysaire. Ces vaisseaux portes descendent le long de la tige pituitaire et communiquent avec les capillaires de l'antéhypophyse. Grâce à cette circulation particulière, les hormones hypothalamiques ne sont pas diluées dans la circulation générale, seule une petite quantité d'hormone doit être synthétisée pour atteindre une concentration efficace. L'antéhypophyse est composée de trois parties distinctes, la *pars tubérialis*, la *pars intermédia* et la *pars distalis*.

Le message photopériodique est un facteur exogène primordial à la synchronisation des fonctions saisonnières avec l'environnement. La mélatonine, neurohormone sécrétée par la glande pinéale, constitue une représentation endocrine de l'alternance jour/nuit mais également de la durée du jour. De ce fait, elle est essentielle dans le contrôle des fonctions saisonnières. Chez espèces circannuelles, ce rôle est limité à la synchronisation de l'horloge (Arendt, 1998; Vitale et al., 1985; Woodfill et al., 1994). Mais il semblerait qu'une voie indépendante de la mélatonine soit aussi impliquée dans la synchronisation de l'horloge circannuelle chez le hamster d'Europe (Monecke et al., 2013).

Dans le paragraphe suivant, seul le rôle de la mélatonine dans la transmission du message photopériodique nécessaire à la synchronisation de ces fonctions saisonnières sera présenté. La mélatonine, son métabolisme, ses sites d'actions et ses différents rôles seront développés dans la partie II : La mélatonine et ses récepteurs.

2. La durée du pic nocturne de mélatonine est indispensable à la synchronisation des fonctions saisonnières avec l'environnement

En 1965, Hoffman et Reiter ont montré qu'une pinéalectomie (supprimant ainsi le signal mélatoninergique endogène) abolissait la régression testiculaire induite par un transfert en PC chez le hamster syrien (Figure 29) (Hoffman and Reiter, 1965).

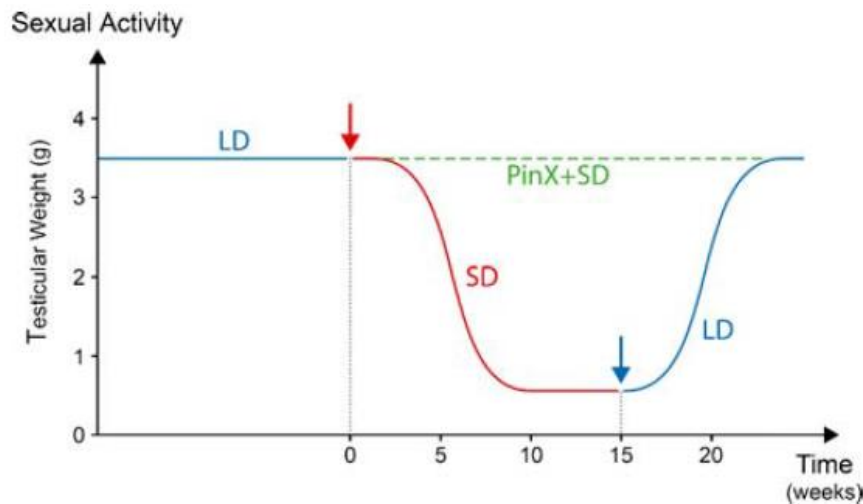


Figure 29 : La photopériode et la mélatonine contrôlent l'activité de reproduction chez le hamster syrien (Revel et al., 2007a).

Le hamster syrien placé en PL (>12.5h de lumière par jour) est sexuellement actif (caractérisé par un poids testiculaire supérieur à 3g). Après avoir été transféré en PC (flèche rouge), une régression testiculaire est observée. Cet état de quiescence sexuelle, d'une durée de 8 à 10 semaines, est réversible après exposition à une PL (flèche bleue). Des animaux sexuellement actifs pinéalectomisés (PinX) transférés en PC ne montrent pas de régression testiculaire et restent sexuellement actifs. LD : long day ; SD : short day.

Chez la brebis (*Ovis aries*), espèce circannuelle qui se reproduit lors des jours courts, une pinéalectomie entraîne une désynchronisation du rythme de l'activité reproductrice (Woodfill et al., 1994) et une infusion de mélatonine permet de rétablir un rythme synchronisé (Figure 30).

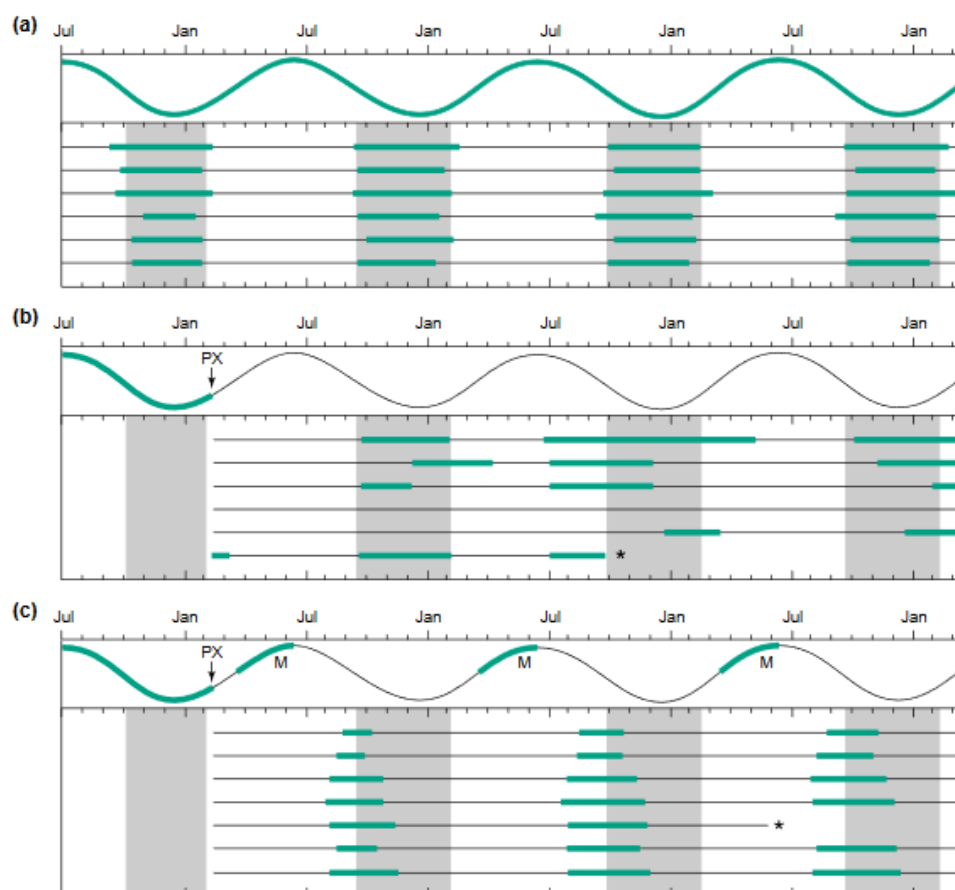


Figure 30 : Effet de la mélatonine sur l'expression du cycle reproducteur de la brebis durant 70 jours (Arendt, 1998; Woodfill et al., 1994).

La courbe verte représente la variation de la photopériode en fonction du temps. Les larges lignes vertes représentent un taux de LH élevé (10-20 ng/ml) reflétant une induction de l'activité de reproduction. Alors que les lignes fines noires représentent un taux de LH faible (< 0.5 ng/ml) indiquant une suppression de l'activité reproductrice. La région grisée correspond à la durée moyenne de taux de LH élevé chez le groupe contrôle. Les astérisques représentent la mort de l'animal. (a) Représentation du taux de LH d'un groupe contrôle de 5 brebis. Les brebis sont des reproducteurs de jours courts où le taux de LH est élevé. L'activité reproductrice suit un rythme circannuel strictement synchronisé avec la photopériode. (b) Une pinéalectomie (PX) entraîne une désynchronisation de l'expression circannuelle de l'activité de reproduction. (c) Infusion de mélatonine (M) chez des brebis pinéalectomisées entraîne une resynchronisation de l'activité de reproduction.

Des expériences d'infusions programmées de mélatonine sous cutanées ont permis de mettre en évidence que la durée du pic de mélatonine, en non pas la quantité totale de mélatonine administrée, est le facteur déterminant permettant d'engendrer une réponse photopériodique adaptée. Chez le hamster syrien non pinéalectomisé et placé en PL, l'infusion de mélatonine, quand elle est suffisamment rapprochée du pic endogène, induit une régression testiculaire caractéristique d'une PC [pour revue (Bartness et al., 1993; Hazlerigg and Simonneaux, 2015b)].

Ainsi de nombreuses expériences ont montré que la mélatonine joue un rôle prépondérant dans le contrôle des fonctions saisonnières, en particulier la reproduction mais

aussi la régulation du poids corporel, la qualité du pelage, l'hibernation. Cette action de synchronisation des fonctions biologiques avec l'environnement s'exerce grâce à la transmission des variations annuelles de la photopériode aux centres hypothalamiques impliqués dans leurs contrôles. Mais le même message mélatoninergique peut induire des effets biologiques différents selon la physiologie des espèces. Ainsi, le signal mélatoninergique court, reflet d'une PL, sera perçu comme un signal activateur de la fonction de reproduction chez les espèces à durée de gestation courte (quelques semaines comme chez les hamsters) alors qu'il sera perçu comme inhibiteur chez celles à durée de gestation longue (quelques mois comme le mouton) (Figure 31).

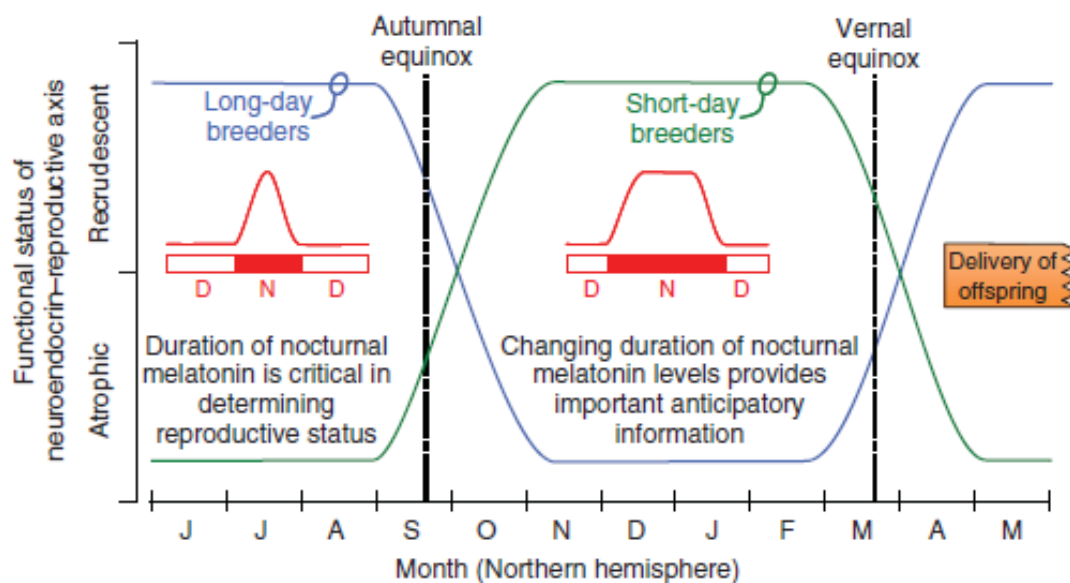


Figure 31 : L'action du signal mélatoninergique sur la fonction reproductive est espèce dépendante (Reiter et al., 2010).

Ces dernières années, le rôle de la *pars tubéralis*, une structure particulièrement riche en récepteurs mélatoninergique (voir le chapitre Mélatonine et fonctions saisonnières II.A.3.b) chez toutes les espèces et son lien avec la synthèse d'hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus ont permis de mieux décrire les voies neuroendocrines impliquées dans la synchronisation des fonctions biologiques avec les changements saisonniers de la durée de sécrétion de mélatonine.

3. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la transmission du message photopériodique

a) Généralités

Les hormones thyroïdiennes (TH) sont impliquées dans un très grand nombre de fonctions biologiques. Elles agissent à la fois au niveau central, en particulier dans la régulation des fonctions saisonnières et au niveau périphérique, en particulier dans le métabolisme.

Les deux principales TH, la thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3) sont synthétisées et sécrétées essentiellement par la glande thyroïde. Ces deux hormones ont une base moléculaire

identique, et diffèrent uniquement par le nombre d'atomes d'iode présents sur le squelette carboné (Figure 32). D'autres formes de TH existent mais leur activité biologique est limitée (Bianco et al., 2002).

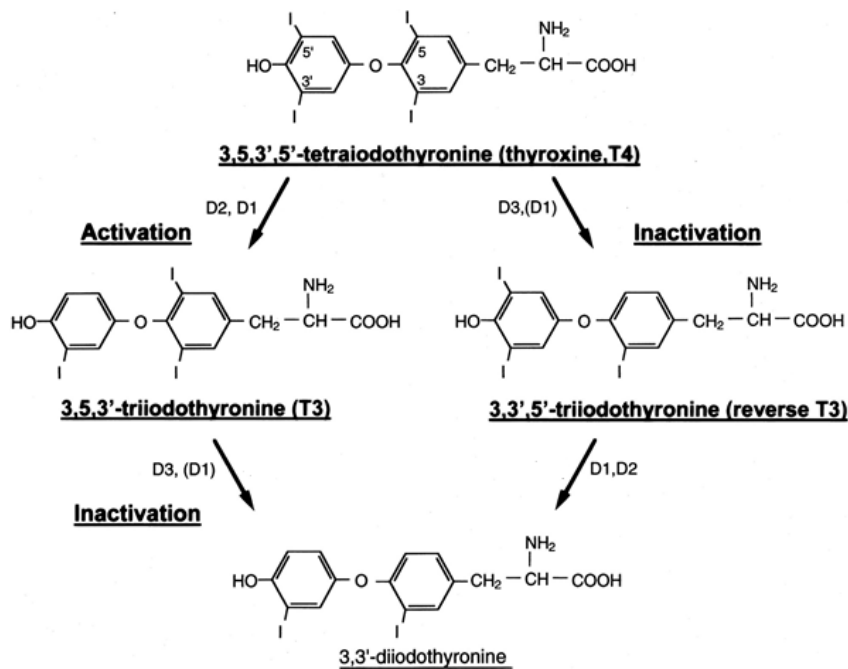


Figure 32 : Métabolisme des hormones thyroïdiennes par différentes déiodinases (D1,D2,D3) (Bianco et al., 2002).

La TRH, un tripeptide synthétisé dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, induit la libération de TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) dans l'antéhypophyse. Cette neurohormone est composée de deux sous unités, TSH α et TSH β , cette dernière est une sous-unité spécifique à la TSH et permet la liaison de l'hormone sur son récepteur. La TSH stimule la sécrétion TH par la thyroïde. Quand le taux de TH est élevé, en particulier le taux de T4 circulant, un rétrocontrôle négatif est mis en place au niveau de l'antéhypophyse et de l'hypothalamus (Figure 33).

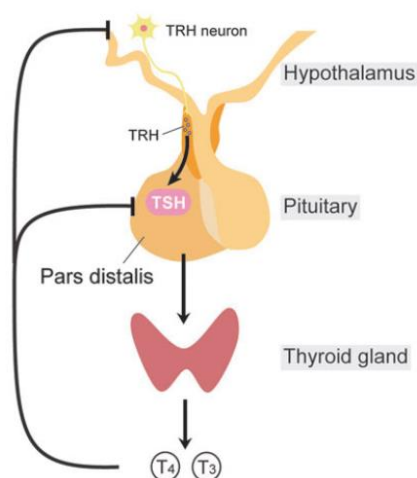


Figure 33 : Axe thyroïdote (Nakayama and Yoshimura, 2017).

Le métabolisme des TH est régulé par une famille d'enzymes spécifiques, les déiodinases (Figure 32). Trois types de déiodinases ont été décrits, Dio1 et Dio2 (activatrices) et Dio3 (inactivatrice). Elles ont des expressions tissulaires et subcellulaires différentes. Dio2 favorise la conversion de T4 biologiquement inactive en T3 active, entraînant l'augmentation du taux de T3 au niveau tissulaire et sanguin. Dio3 est impliquée dans le catabolisme de T4 et T3, aussi son activation se traduit par une réduction des niveaux de T3 tissulaire et sanguin ((Bianco et al., 2002).

Les TH sont des molécules hydrophobes qui peuvent donc traverser la membrane plasmique par simple diffusion. Dans certains tissus, la présence de transporteur est nécessaire, on peut citer par exemple, le transporteur MCT8 (MonoCarboxylate Transporter 8) largement exprimé dans l'hypothalamus, en particulier dans les tanocytes (Mullur et al., 2014).

Les TH agissent, entre autres, par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires TR, codés par deux gènes distincts : TR α et TR β , qui codent pour 7 récepteurs différents, tel, le récepteur TR α 1 qui est principalement exprimé dans le cerveau et le tissu adipeux blanc. L'activité des TH est largement régulée par l'action de co-régulateurs (coactivateurs, corépresseurs...) qui ne seront pas détaillés ici.

b) Rôle des TH dans la transmission du message photopériodique saisonnier

Les premières expériences mettant en évidence l'implication des TH dans le contrôle des fonctions saisonnières ont été faites chez les oiseaux où l'ablation de la thyroïde entraînait des dérèglements dans les fonctions saisonnières induites par la photopériode (Bechtold and Loudon, 2007; Benoit, 1936). Des résultats similaires ont été mis en évidence chez le mouton (Moenter et al., 1991; Nicholls et al., 1988; Webster et al., 1991).

Des études plus récentes ont mis en évidence l'effet de T3 dans l'hypothalamus sur le phénotype saisonnier du hamster sibérien (Figure 34). En effet, des implants délivrant de la T3 placés dans l'hypothalamus médio-basal (MBH) avant le transfert des hamsters de la PL vers la PC préviennent la régression testiculaire normalement induite par le passage en PC inhibitrice. Si l'implantation est réalisée chez des animaux en PC, une réactivation de l'axe gonadotrope est rapidement observée (Barrett et al., 2007a; Dardente et al., 2014; Murphy et al., 2012).

La régulation photopériodique intra-hypothalamique de T3 est essentielle non seulement pour le contrôle saisonnier de la reproduction mais aussi celui du poids corporel et de l'entrée en torpeur (Bank et al., 2017; Barrett et al., 2007a; Murphy et al., 2012). Ce rôle sera détaillé dans la partie : Mélatonine et fonctions saisonnières II.A.3.b).

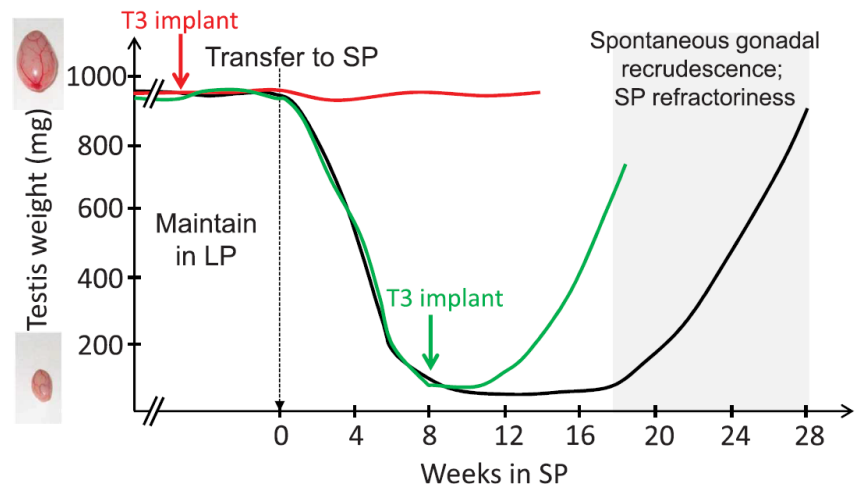


Figure 34 : Effet d'implants intra-hypothalamiques de T3 sur l'activité testiculaire du hamster sibérien (Barrett et al., 2007a; Dardente et al., 2014; Murphy et al., 2012).

Le poids des testicules reflète l'activité de l'axe reproducteur. La courbe noire représente l'évolution de l'axe reproducteur en fonction des différentes conditions photopériodiques. Les courbes rouge et verte représentent respectivement l'évolution de l'appareil reproducteur après délivrance de l'hormone T3 en PL et en PC dans le MBH.

II. La mélatonine et ses récepteurs

A. Physiologie de la mélatonine

En 1917, McCord et Allen rapportèrent qu'une substance contenue dans l'extrait de glande pinéale bovine entraînait un éclaircissement de la peau de grenouille. En 1958, le dermatologue Lerner identifia cette molécule comme étant la mélatonine (N-acetyl-5 methoxytryptamine) (Figure 35) et démontra sa capacité d'induire la contraction des mélanophores (Lerner et al., 1958).

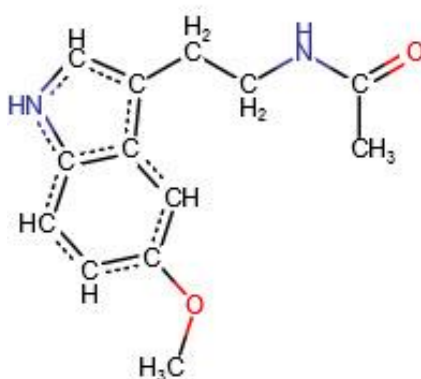


Figure 35 : Structure de la mélatonine (IUPHAR).

Cette neurohormone amphiphile peut être synthétisée dans la rétine et l'intestin mais la principale source de sa concentration circulante vient de la glande pinéale qui la secrète uniquement la nuit (Klein, 1985). La mélatonine a un rôle prépondérant dans un grand nombre de fonctions physiologiques en particulier dans la synchronisation des fonctions biologiques avec les rythmes journaliers et saisonniers de l'environnement. Elle constitue une représentation endocrine du jour et de la nuit mais également de l'été et l'hiver. Par sa diversité d'actions, cette hormone et ses récepteurs sont des cibles pharmacologiques importantes pour de nombreux axes thérapeutiques comme la dépression, les troubles du sommeil et dans une moindre mesure les syndromes métaboliques, mais aussi sur le contrôle de la reproduction saisonnière dans le domaine agronomique.

1. La glande pinéale : principal lieu de synthèse de la mélatonine

La glande pinéale ou épiphyse est une évagination du toit du diencephale. Chez les vertébrés inférieurs, elle est constituée de photorécepteurs comparables à ceux retrouvés dans la rétine, mais chez les mammifères elle a perdu sa sensibilité directe à la lumière et elle est majoritairement constituée de pinéalocytes, cellules endocrines qui produisent la mélatonine. Chez les grands mammifères, comme l'Homme ou le mouton, elle est logée dans la partie dorsale du tronc cérébral alors que chez les rongeurs, une partie profonde reste proche du 3^{ème} ventricule tandis que la majeure partie de la glande a migré de manière dorso-caudale pour former la pinéale superficielle, les deux parties étant reliées entre elles par la tige épiphysaire (Figure 36) [pour revue (Møller and Baeres, 2002)].

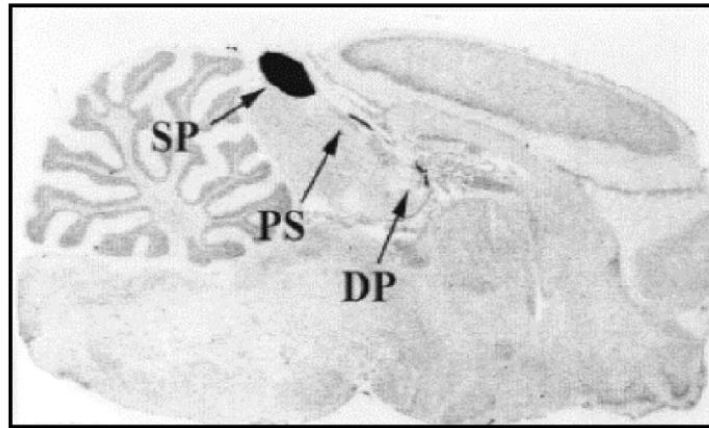


Figure 36 : Coupe parasagittale d'un cerveau de rat montrant les différentes parties de la glande pinéale marquée par une enzyme de synthèse de la mélatonine (Ribelayga et al., 1998).

Cette coupe parasagittale de cerveau de rat a été hybridé avec un ARNc antisens du gène codant pour une enzyme de synthèse de la mélatonine (hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT)), le marquage permet de visualiser les 3 parties de la glande pinéale des rongeurs : Superficial Pineal (SP), Pineal Stalk (PS), Deep Pineal (DP).

Les signaux reçus par la glande pinéale sont nombreux et variés, d'origine neuronale, endocrine ou paracrine [pour revue, voir (Møller and Baeres, 2002; Simonneaux and Ribelayga, 2003)]. La principale afférence fonctionnelle, qui compose le système photo-neuro-endocrine, est constituée d'une voie polysynaptique reliant les NSC à la glande pinéale. De ce fait, l'activité sécrétrice de la glande pinéale est directement sous le contrôle de l'horloge centrale. La glande pinéale est située en dehors de la barrière hémato-encéphalique, son activité peut donc être affectée par des molécules circulantes, en particulier la mélatonine qui peut avoir des effets paracrines.

2. Métabolisme de la mélatonine

a) Voie de biosynthèse de la mélatonine

La mélatonine est principalement synthétisée par la glande pinéale, en effet une ablation de cette glande entraîne une diminution drastique du taux de mélatonine circulante. D'autres structures, comme la rétine (Fujieda et al., 1999), la glande de Harder (Djeridane et al., 1998), le tractus gastro intestinal (Glaser et al., 2014) sont également des lieux de synthèse. Cette mélatonine extra-pinéale agirait principalement au niveau autocrine/paracrine (Acuña-Castroviejo et al., 2014).

i. Voie de biosynthèse

Dans les pinéalocytes, le tryptophane (Trp) circulant est converti en 5-hydroxy-tryptophane (5-HTP) par la tryptophane-hydroxylase mitochondriale (TPH). Le 5-HTP est ensuite transformé par la décarboxylase des acides aminés en sérotonine (5-hydroxytryptamine 5-HT). La conversion de la sérotonine en mélatonine se fait en deux étapes. La sérotonine est d'abord acétylée en N-acétylsérotonine (NAS) par l'arylalkylamine-N-acetyltransférase (AA-NAT) elle-même O-méthylée grâce à l'hydroxyindol-O-méthyl transférase pour former de la

mélatonine (Figure 37). La structure amphiphile de la mélatonine lui permet de traverser aisément les membranes plasmiques, ainsi la mélatonine n'est pas stockée dans les pinéaloctes et diffuse directement dans la circulation sanguine après sa synthèse. Il y a donc une dynamique très similaire entre les variations de la synthèse et les variations des concentrations circulantes de mélatonine. Chez le rat, la quantité de mélatonine maximale dans la glande pinéale est obtenue durant la nuit avec une quantité 10 fois plus importante (comprise entre 1 et 2 ng par glande) que celle retrouvée en période diurne. Ceci se traduit par des concentrations plasmatiques nocturnes égales à 80-100 pg/ml (Simonneaux and Ribelayga, 2003).

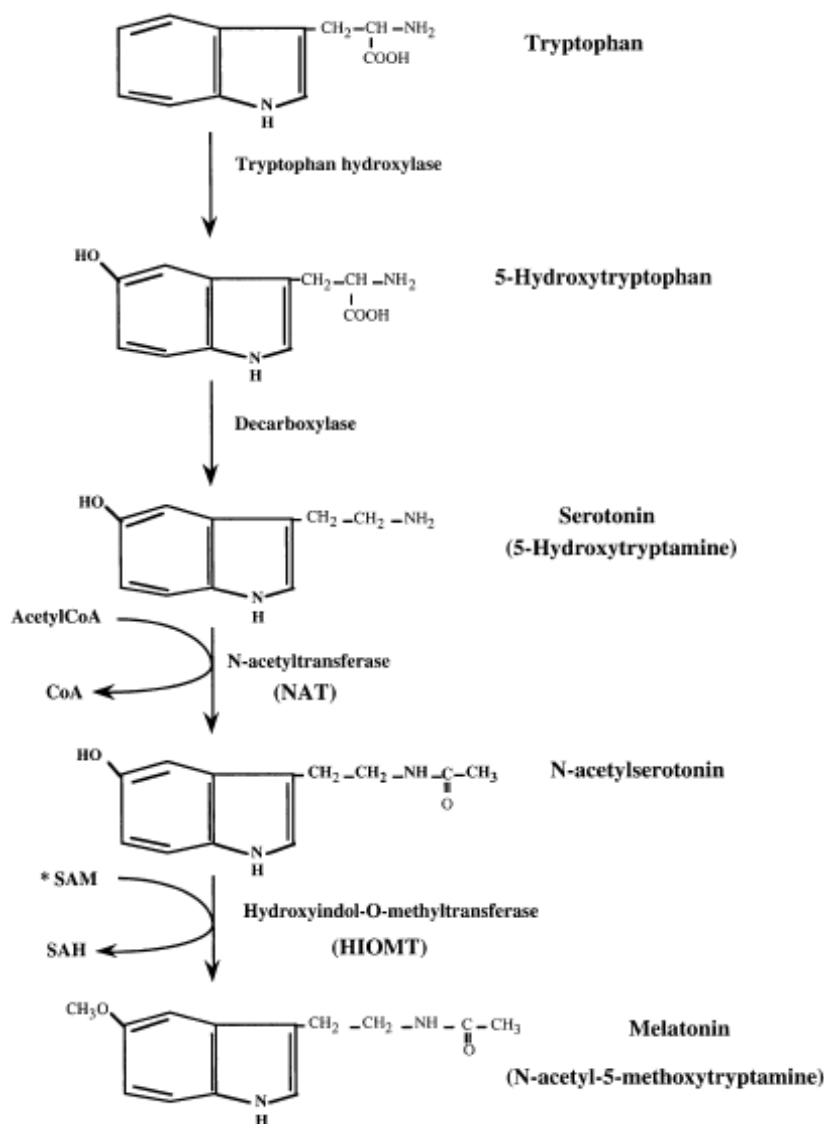


Figure 37 : Voie de synthèse de la mélatonine. (Touitou, 2001).

ii. Enzymes clés

L'activité de la TPH détermine la disponibilité en 5HT dans la glande pinéale. Son expression varie peu en fonction du cycle jour/nuit avec un maximum atteint pendant la nuit en même temps que celui de la mélatonine (Figure 38) (Sugden, 2003).

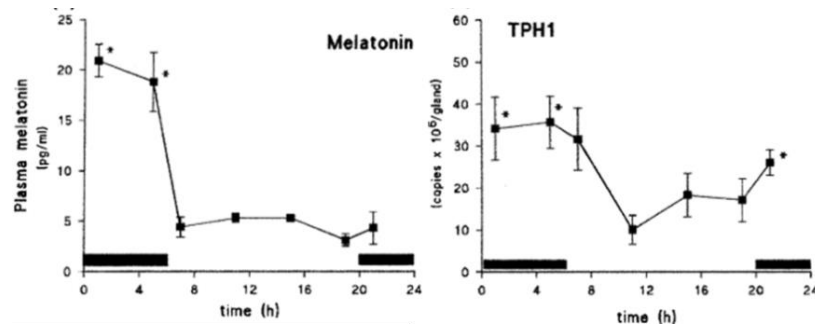


Figure 38 : Profil journalier de la mélatonine plasmatique et de l'ARNm codant pour le TPH de type 1 dans la glande pinéale de rat (Sugden, 2003).

La barre horizontale représente la période de nuit (20.00-06.00 h). Deux isoformes de la TPH ont été mises en évidence (TPH1 et TPH2). La TPH1 est l'isoforme responsable de la génération de 5HT dans la glande pinéale.

Bien que le rôle de la TPH soit important pour la synthèse de sérotonine, il est largement admis que les variations journalières des taux de mélatonine circulante dépendent principalement de deux autres enzymes impliquées dans sa voie de biosynthèse : la AA-NAT et l'HIOMT.

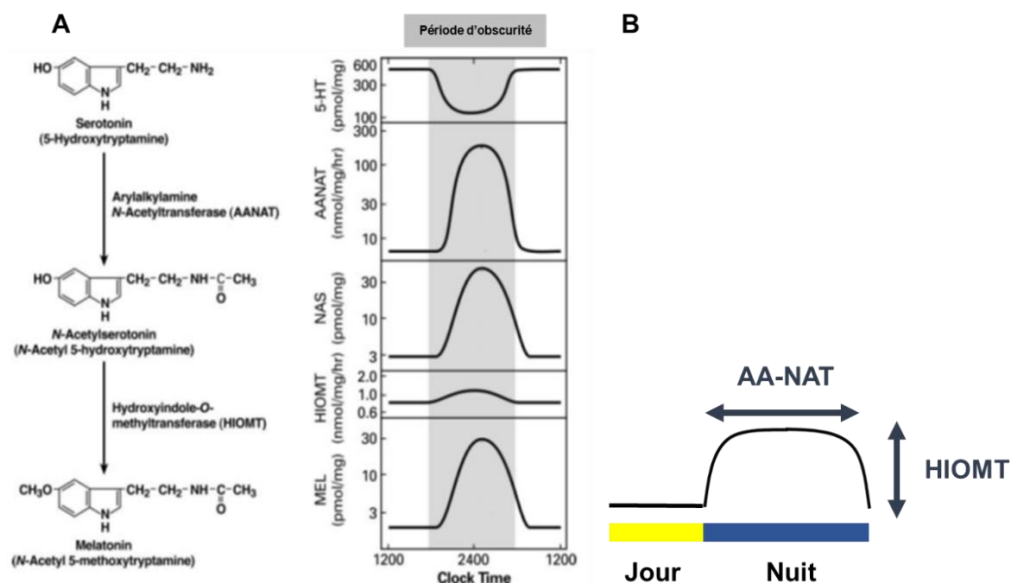


Figure 39 : Rythmes journaliers des principales enzymes et métabolites impliqués dans la biosynthèse de la mélatonine (A), d'après (Klein, 2007) ; (B) Rôle des enzymes AA-NAT et HIOMT sur la durée et le pic de mélatonine.

[A] Durant la période d'obscurité (représentée en gris), le niveau de l'AA-NAT, enzyme clé du métabolisme de la mélatonine, augmente très rapidement engendrant une diminution du taux de sérotonine et une augmentation de la NAS. Le taux de HIOMT, seconde enzyme clé, augmente très légèrement pendant la phase d'obscurité. Cette enzyme catalyse la dernière étape de la synthèse de mélatonine qui est exprimée exclusivement la nuit. [B] L'AA-NAT agirait principalement sur la durée du pic de sécrétion de la mélatonine alors que la HIOMT aurait une influence sur l'amplitude du pic. Sur ce graphe, la période d'obscurité est matérialisée par la barre bleue.

L'AA-NAT est considérée comme l'enzyme clé dans la synthèse rythmique de la mélatonine, elle a été nommée « Timezyme » (Klein, 2007). Son activité suit un rythme journalier et augmente drastiquement (10 à 100 fois) pendant la nuit entraînant une augmentation de la synthèse de la mélatonine (Figure 39 A). En fin de nuit, ou après une exposition à la lumière, son activité diminue très rapidement avec un temps de décroissance de quelques minutes (Klein and Weller, 1972). Elle est principalement régulée par l'augmentation intracellulaire d'AMPc engendrée par l'activation des récepteur β -adrénergiques [pour plus de détails voir Système photo-neuro-endocrine (II.A.2.b)i)]. Cette régulation dépend de mécanismes transcriptionnels et post traductionnels chez les rongeurs et uniquement post traductionnels chez les autres mammifères (Gastel et al., 1998; Roseboom and Klein, 1995). La forme humaine de l'AA-NAT, tout comme la forme ovine (qui a longtemps servi de référence dans l'étude de l'AA-NAT), reconnaît des substrats comme la sérotonine, tryptamine mais a une action acétylante plus importante pour la phényléthylamine comparée à la forme ovine (Ferry et al., 2000).

A la différence de l'AA-NAT, l'activité de la HIOMT varie peu au cours d'une journée car sa demi-vie est supérieure à 24 heures. Par contre, chez certaines espèces comme le hamster sibérien, l'activité journalière de l'HIOMT dépend de la photopériode, étant plus élevée chez les animaux placés en photopériode courte comparée aux animaux gardés en photopériode longue (Figure 40). Il a été proposé que cette régulation photopériodique de la dernière enzyme de la synthèse de la mélatonine conduit à une amplitude plus importante du pic nocturne de mélatonine en photopériode courte (Ceinos et al., 2004; Ribelayga et al., 1999a, 2000).

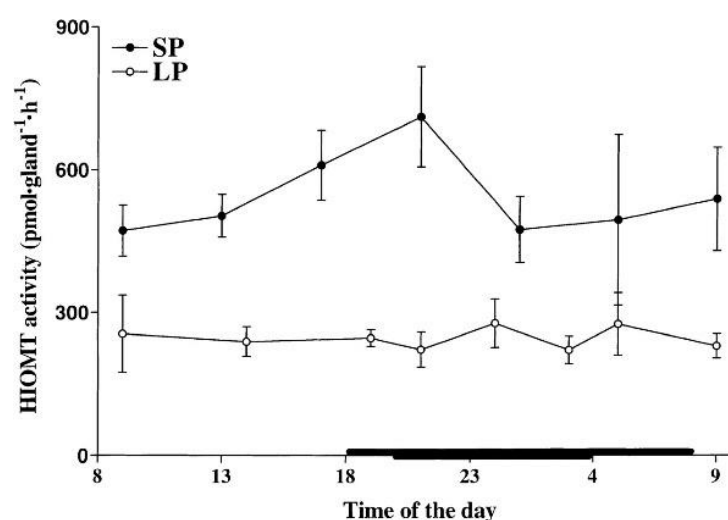


Figure 40 : Profil journalier de l'activité de HIOMT dans la glande pinéale chez des hamsters sibériens gardés en SP ou LP (Ribelayga et al., 2000).

LP (16h de jour et 8 h de nuit), SP (10h de jour et 14h de nuit). La barre noire indique la période nocturne. Les données sont exprimées en picomoles par glande et par heure (moyenne $\pm$ SE).

Ainsi, l'AA-NAT et l'HIOMT avec des caractéristiques distinctes jouent un rôle différent dans le profil rythmique de mélatonine, l'AA-NAT régulant le moment et la durée du pic et la HIOMT régulant l'amplitude du pic nocturne de mélatonine. (Figure 39 B) (Simonneaux and Ribelayga, 2003).

b) Sécrétion de la mélatonine

Chez les mammifères, diurnes ou nocturnes, la sécrétion de la mélatonine est observée exclusivement durant la nuit. La durée de sécrétion de cette neurohormone est proportionnelle à la durée de la nuit (Illnerová and Vaněček, 1980). Sa sécrétion se fait grâce au système photo-neuro-endocrine qui transmet l'information photique aux NSC.

i. Système photo-neuro-endocrine

Le système photo-neuro-endocrine transforme les variations saisonnières et journalières de la photopériode en une sécrétion hormonale rythmée (Figure 41). Cette voie nerveuse polyneuronal connecte l'horloge circadienne située dans les NSC à la glande pinéale, principal lieu de synthèse de la mélatonine.

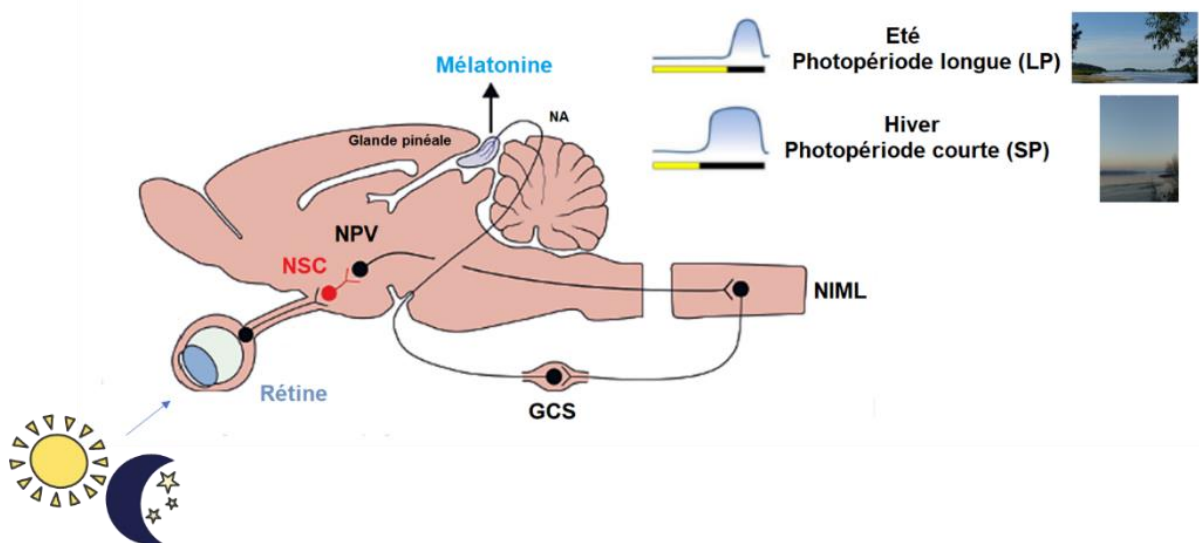


Figure 41 : Schématisation de la voie polyneuronale rétino-hypothalamo-pinéale d'après (Revel et al., 2009).

NSC : noyaux suprachiasmatiques ; NPV : noyaux paraventriculaires ; NIML : noyau intermédiaire latéral de la moelle épinière, GCS : ganglions cervicaux supérieurs ; NA : noradrénaline ; LP : photopériode Longue ; SP : photopériode courte

L'information lumineuse non visuelle est transmise aux NSC via le RHT situé dans le nerf optique. Elle est ensuite transmise via des fibres nerveuses GABAergiques issues des NSC qui projettent sur les neurones autonomes de la partie dorsale des noyaux para-ventriculaires (NPV) de l'hypothalamus. Les neurones du NPV projettent sur des interneurons du noyau intermédiaire latéral de la moelle épinière (NIML) qui eux-mêmes projettent sur les ganglions cervicaux supérieurs (GCS). Des axones de neurones noradrénergiques de ces GCS forment le nerf conarii qui projette sur la glande pinéale où il libère de la noradrénaline (NA) uniquement la nuit sous le contrôle de l'activité journalière des NSC, induisant ainsi une synthèse nocturne de mélatonine.

Dans les pinéaloctes, la NA se lie sur deux types de récepteurs adrénergiques, les récepteurs β_1 et α_1 , couplés respectivement à la protéine Gs et Gq. L'activation du récepteur β_1 induit une

augmentation d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) via l'activation de l'adénylate cyclase (AC). L'activation du récepteur $\alpha 1$ permet la potentialisation de l'augmentation de l'AMPc induite par l'activation du récepteur $\beta 1$ via la protéine kinase C (PKC) mais également en favorisant l'augmentation l'influx de Ca^{2+} intracellulaire [pour revue (Simonneaux and Ribelayga, 2003)]. L'augmentation de ce second messager va entraîner la translocation de la partie catalytique de la PKA (Protéine kinase AMPc dépendante) dans le noyau. Chez toutes les espèces étudiées, la PKA augmente l'activité de l'AA-NAT mais les mécanismes impliqués dépendent des espèces.

Chez les rongeurs, l'activation de l'AA-NAT dépend de mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels [pour revue (Ganguly et al., 2002)]. La PKA transloquée dans le noyau, phosphoryle le facteur de transcription CREB, activant ainsi la transcription de gènes cibles, en particulier ceux codant pour l'AA-NAT et HIOMT (Ribelayga et al., 1999b; Roseboom and Klein, 1995). Chez les mammifères non rongeurs, l'ARNm de l'AA-NAT est exprimé de manière constitutive. Chez toutes les espèces, l'activation de l'enzyme dépend aussi de la PKA qui phosphoryle l'AA-NAT et favorise son interaction avec une protéine chaperon 14-3-3 qui empêche sa dégradation par le protéasome (Gastel et al., 1998).

L'augmentation de l'activité de l'AA-NAT induit la synthèse de la mélatonine qui diffuse directement dans la circulation sanguine mais également dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Figure 42). Chez le mouton, la concentration de mélatonine dans le LCR est très élevée ce qui permet sa distribution dans les différentes régions du cerveau, en particulier dans les aires périventriculaires (Legros et al., 2014a).

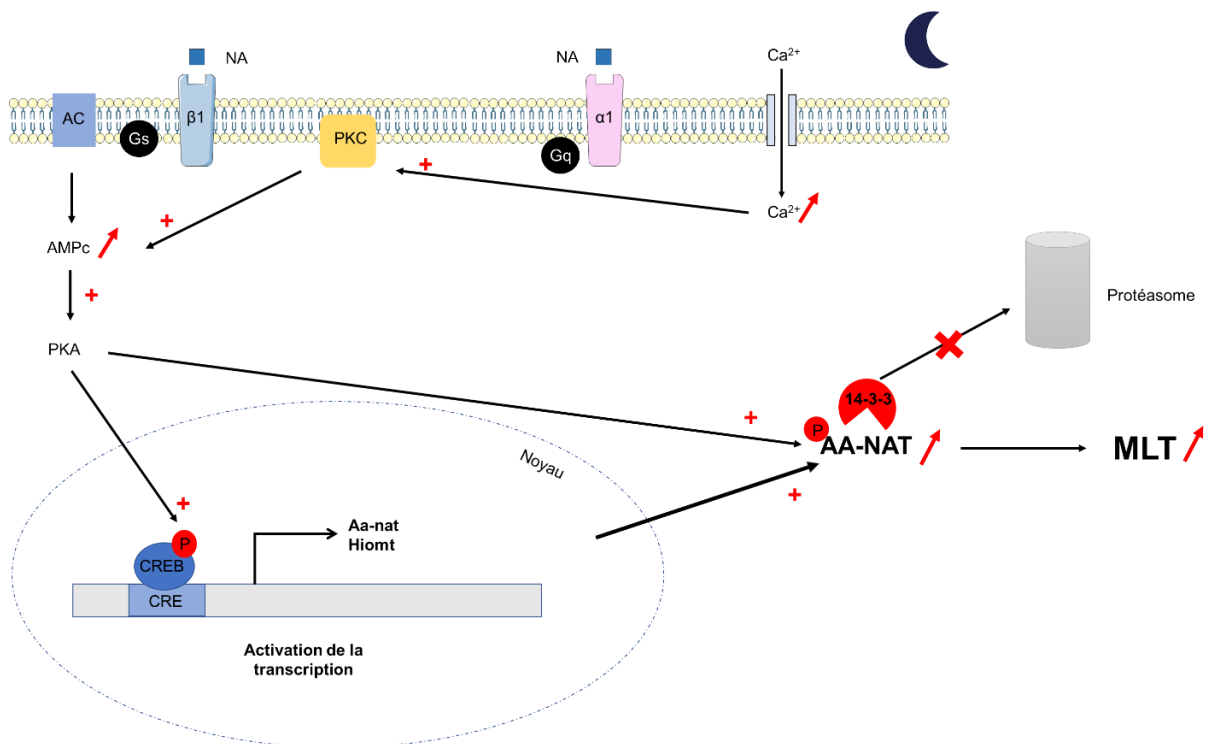


Figure 42 : Représentation schématique de l'impact du signal adrénérgique sur la synthèse de mélatonine (MLT).

L'arrivée de la lumière en début de jour inhibe la libération de NA dans la glande pinéale entraînant une diminution du taux d'AMPC intracellulaire et de l'activité de la PKA. La synthèse de AA-NAT est non seulement arrêtée mais la protéine AA-NAT est très rapidement dégradée par le protéasome, induisant une diminution rapide du taux de mélatonine.

ii. Bilan

Le message lumineux journalier capté par des cellules ganglionnaires photosensibles de la rétine, est transmis par la voie RHT jusqu'au NSC. Les neurotransmetteurs libérés (PACAP et glutamate) synchronisent la transcription des gènes horloges. Les NSC sont reliés à la glande pinéale par l'intermédiaire d'une voie synaptique impliquant diverses structures (PVN, NIML, GCS). Les fibres nerveuses issues des GSC libèrent de la NA sur les pinéalocytes uniquement la nuit. La NA active l'AA-NAT, permettant ainsi la synthèse nocturne de mélatonine. La mélatonine amphiphile n'est pas stockée et est directement libérée dans la circulation afin de pouvoir agir sur ses sites d'action via des récepteurs particuliers (Figure 43). Toute modification de la synthèse de la mélatonine dans la glande pinéale va être directement traduite dans la circulation sanguine. Cet aspect est primordial dans la transmission précise et immédiate de l'information temporelle.

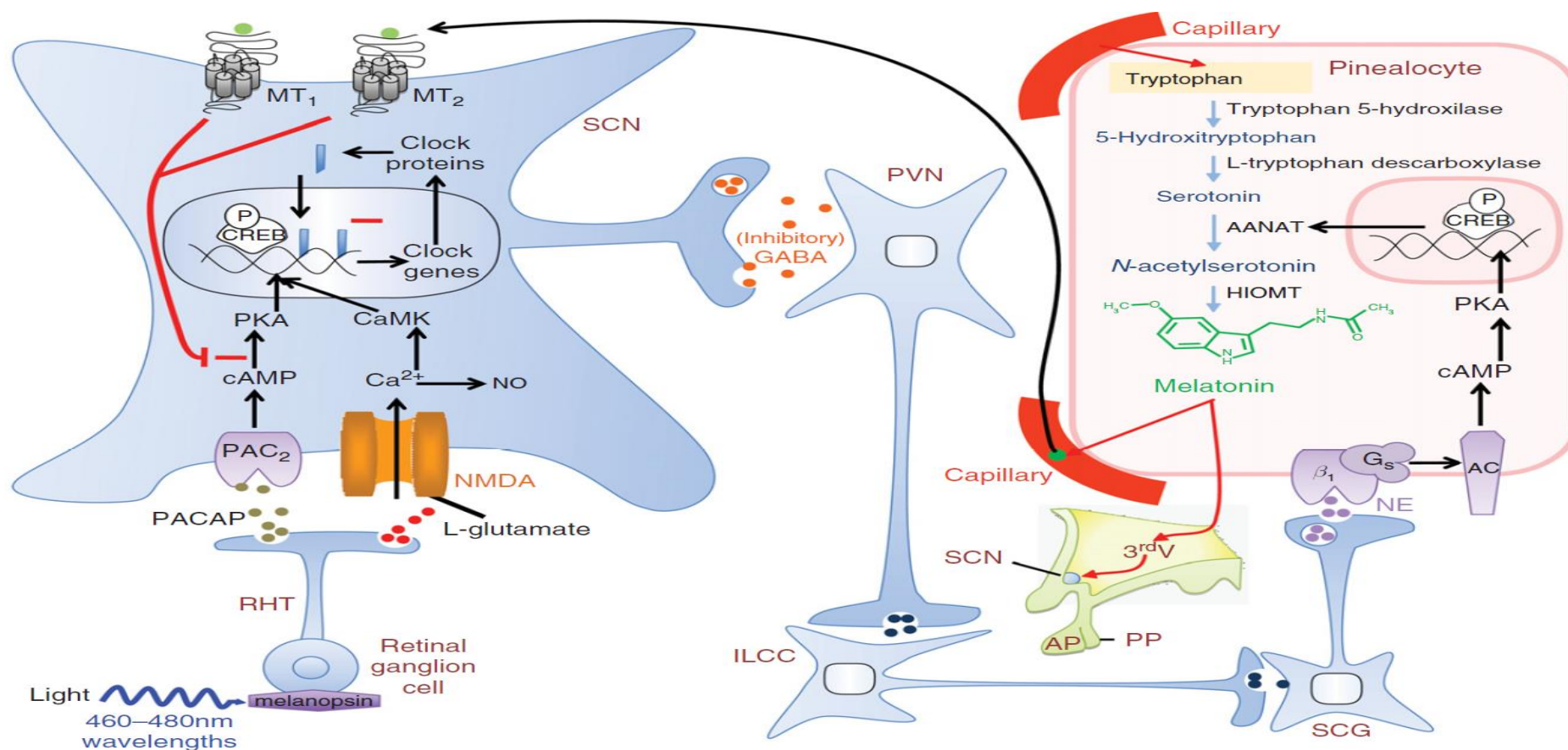


Figure 43 : Représentation schématique des processus impliqués dans la synthèse de la mélatonine (Reiter et al., 2010).

RHT: tractus rétinohypothalamique; SNC: noyaux suprachiasmatiques; PACAP: pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide; NMDA: N-méthyl-D-aspartate, PAC2: PACAP récepteur; cAMP: adénosine monophosphate cyclique; PKA: protéine kinase A; CaMK: calmoduline kinase; NO: oxyde nitrique; CREB: cAMP response-element-binding protein; MT1: mélatonine récepteur 1; MT2: mélatonine récepteur 2; GABA: acide aminobutyrique (GABA); PVN: noyaux para-ventriculaires; ILCC: noyaux intermédiolatéraux de la moelle épinière; SCG: ganglions cervicaux supérieurs; NE: norépinephrine; β_1 : récepteur beta-adrénergique; AC: adénylyl cyclase; Gs: G protéine stimulatrice; AANAT: arylalkylamine N-acetyltransferase; HIOMT: hydroxyindole-O-méthyltransferase; 3rd V: troisième ventricule; AP: anté-hypophyse; PP: post-hypophyse (Reiter et al., 2010).

c) Catabolisme de la mélatonine

La mélatonine est principalement catabolisée par le cytochrome P450 hépatique en 6-hydroxymélatonine (Skene et al., 2001). Elle est ensuite excrétée sous forme de sulfate ou de glucuronide. Chez l'Homme, le principal métabolite excrété dans les urines est la forme sulfatée (6-sulfatoxymélatonine) alors que chez la souris, la forme glucuronidée semble être prédominante (Ma et al., 2008). Le dosage urinaire des métabolites de la mélatonine est utilisé comme marqueur de l'activité sécrétrice de la glande pinéale. Le temps de demi-vie de la mélatonine est propre à chaque espèce, mais une moyenne de 30 minutes est observée (Gibbs and Vriend, 1981; Waldhauser et al., 1984). Ces caractéristiques sont essentielles à la bonne transmission des informations temporelles à l'ensemble de l'organisme.

3. Rôles de la mélatonine

a) Mélatonine et rythmes circadiens

La sécrétion de mélatonine est l'une des principales sorties de l'horloge et son rythme est directement sous le contrôle des NSC. De ce fait la mélatonine peut transmettre un message journalier/circadien à toutes les structures possédant ses récepteurs. Pourtant le rôle de la mélatonine dans la régulation des rythmes circadiens semble limité. En effet, malgré la présence de récepteurs à la mélatonine sur les NSC (Morgan et al., 1994), des lésions de la glande pinéale engendrent peu de désorganisation des rythmes circadiens (Cheung and McCormack, 1982; Underwood and Goldman, 1987). La rythmicité de l'expression des gènes horloges dans les organes périphériques pourrait être directement dépendante du message mélatoninergique (Pévet, 2003).

Au contraire, la mélatonine exogène à des concentrations supra-physiologiques est capable d'influencer la phase et/ou la période de l'horloge circadienne, lui conférant des propriétés chronobiologiques (Pévet, 2003). L'administration de mélatonine exogène à un moment précis permet de resynchroniser des individus dont l'horloge endogène est décalée comme dans le cas d'un *jet-lag* ou chez des personnes aveugles (Arendt and Skene, 2005). Cette action chronobiologique pourrait être le reflet d'une action directe de la mélatonine sur les NSC (Pévet et al., 2002). Bien que l'action chronobiologique de la mélatonine semble principalement observée à des doses pharmacologiques plutôt que physiologiques, elle présente un intérêt dans le traitement d'un grand nombre de troubles (Figure 44).

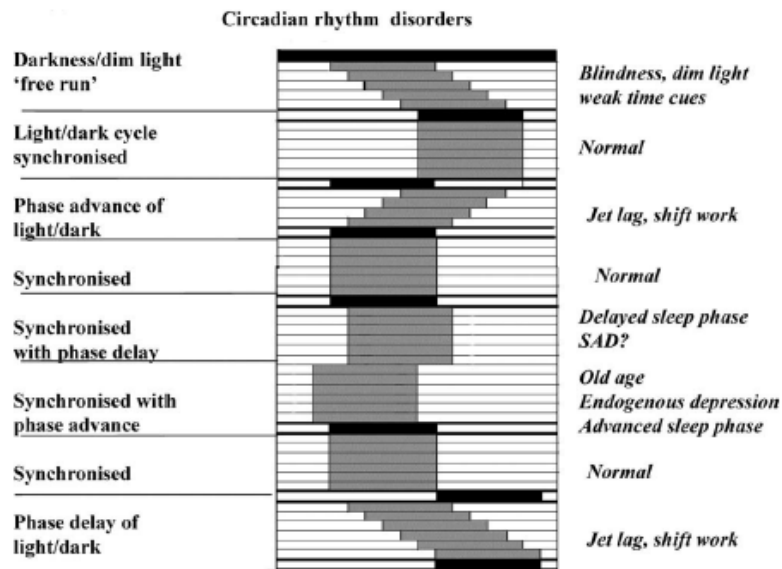


Figure 44 : Troubles du rythme circadien pour lesquels l'administration de mélatonine pourrait être bénéfique (Arendt and Skene, 2005).

Les barres noires représentent la période d'obscurité. Les zones grises schématisent la période d'éveil.

b) Mélatonine et fonctions saisonnières

Les expériences de lésions spécifiques de structures centrales et d'infusion locale de mélatonine, principalement chez le hamster et le mouton, ont permis de déterminer les sites de liaisons de la mélatonine impliqués dans le contrôle saisonnier de la fonction de reproduction. Maywood et ses collaborateurs ont mis en évidence que des lésions des sites de liaison de la 2-[¹²⁵I]-mélatonine dans le MBH de hamsters syriens pinéalectomisés prévenaient la régression testiculaire normalement induite par des infusions de mélatonine (Maywood et al., 1996). Chez le hamster sibérien, des lésions des NSC bloquent les effets des infusions de mélatonine sur la fonction de reproduction (Bartness et al., 1991). De manière surprenante, la *pars tubéralis*, structure la plus riche en site de liaisons mélatoninergique, ne semblait pas impliquée dans l'action de la mélatonine dans la régulation saisonnière de l'axe reproducteur. En effet, chez la brebis placée en PL inhibitrice, des micro-implants placés dans le MBH délivrant de la mélatonine induisent une augmentation de LH alors que chez les brebis dont les implants ont été placés dans la *pars tubéralis* aucune augmentation de LH n'a été observée. Dans ces deux groupes de brebis, la sécrétion de prolactine (hormone peptidique sécrétée par les cellules lactotropes de l'adénohypophyse) est diminuée (Malpaux et al., 1993, 1995, 1998, 2001). Ces observations chez le mouton indiquaient que, la mélatonine contrôle la reproduction par l'intermédiaire d'une action sur des sites hypothalamiques.

La *pars tubéralis* est la partie la plus rostrale de l'adénohypophyse et est apposée contre la partie externe de l'éminence médiane. Cette structure est composée, entre autres, de cellules thyrotropes (cellules sécrétant la TSH) qui ne possèdent ni récepteurs à la TRH, ni récepteurs aux TH mais une très forte densité de récepteurs MT1 (Bockmann et al., 1997). L'expression de MT1 varie fortement en fonction de la photopériode, en effet, Dardente et ses collaborateurs

ont mis en évidence une importante expression en PL dans la *pars tubéralis* du hamster d'Europe (Figure 45) (Dardente et al., 2003).

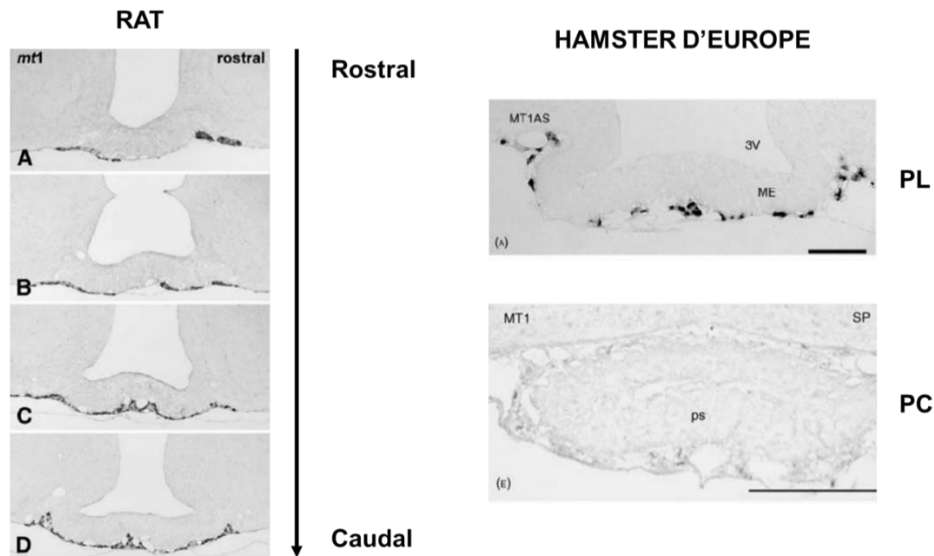


Figure 45 : Expression du récepteur MT1 dans la *pars tubéralis* de rat et du hamster d'Europe d'après (Dardente et al., 2003; Klosen et al., 2002).

Chez le rat, des coupes rostro-caudales de la *pars tubéralis* (A-D) mettent en évidence la présence de MT1 dans cette structure par hybridation *in situ* de ribosondes mt1. Chez le hamster d'Europe en PL, le récepteur MT1 est fortement exprimé dans la *pars tubéralis*. L'expression de ce récepteur est réduite en PC. 3V : Troisième ventricule ; ME : Eminence médiane ; ps : tige pituitaire ;. La barre d'échelle représente 100µm. pour l'image de PL et 200 µm pour l'image de PC.

De plus, chez le hamster européen, le récepteur MT1 est coexprimé dans les cellules à TSH (Figure 46) et l'activation de ce récepteur module l'expression du gène codant pour la TSHβ de telle façon que le pic long de mélatonine en PC inhibe son expression (Dardente et al., 2003, 2010; Hanon et al., 2010; Klosen et al., 2002; Morgan and Williams, 1996).

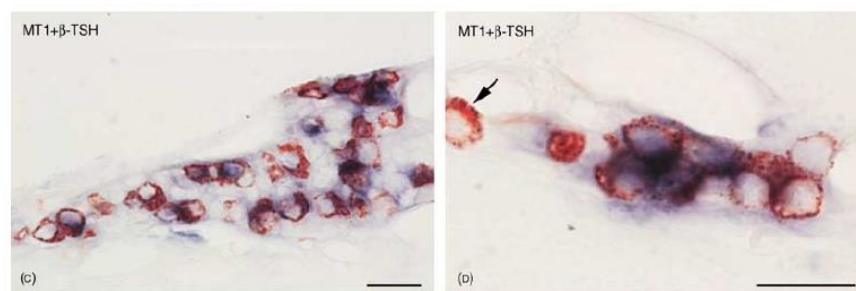


Figure 46 : Caractérisation immunochemique de la *pars tubéralis* du hamster d'Europe en PL (Dardente et al., 2003).

Mise en évidence dans la *pars tubéralis* d'une colocalisation cellulaire du récepteur MT1 (coloration bleue) et de la TSHβ (coloration rouge) à faible (C) et fort grossissement (D). La barre d'échelle représente 200µm.

Ainsi, la mélatonine circulante transmet le message photopériodique en régulant la synthèse et la sécrétion de TSH dans la *pars tubérialis* par l'intermédiaire du récepteur MT1.

Les expériences menées par Yoshimura et ses collaborateurs sur la caille japonaise (*Coturnix japonica*) ont été primordiales dans la compréhension des mécanismes liant les fonctions saisonnières et le métabolisme des TH. En effet, ils ont montré que l'expression de Dio2 dans le MBH est induite par la lumière et que des infusions intra-cérébro-ventriculaire de T3 engendraient une activation de l'axe reproducteur chez des cailles en PC. De plus, un transfert de PC en PL entraîne une régulation opposée de l'expression de Dio2 et Dio3 dans le MBH (Figure 47) ; alors que le taux d'ARNm de Dio2 augmente celui de Dio3 diminue. Une exposition à une PL engendre donc une augmentation locale de T3 dans le MBH grâce à une régulation spécifique et inverse des déiodinases Dio2 et Dio3 (Yasuo et al., 2005; Yoshimura et al., 2003).

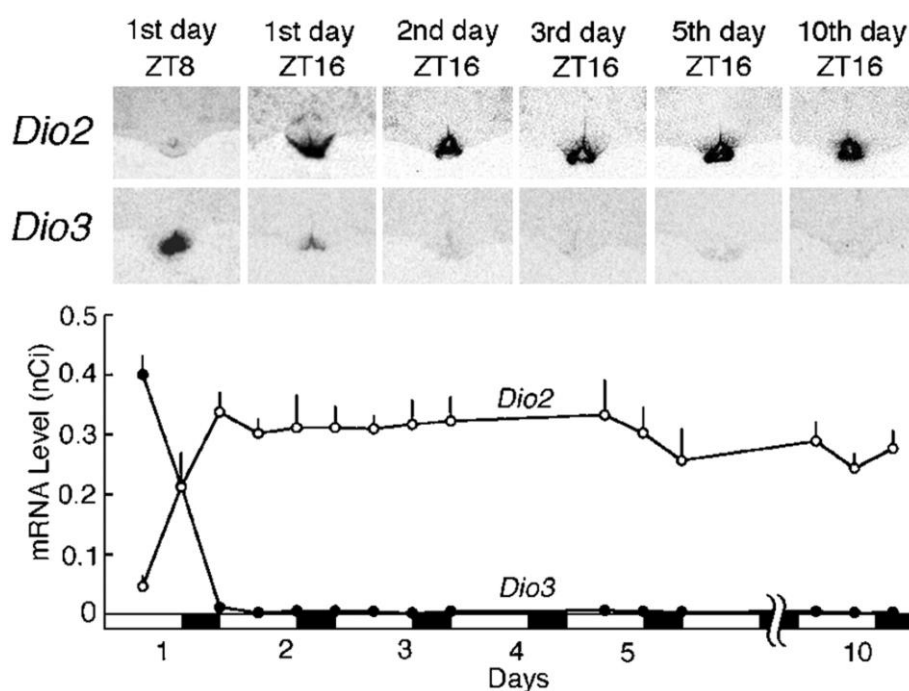


Figure 47 : Activation et inactivation des gènes codant pour les déiodinases dans le MBH de cailles transférées de PC en PL (Yasuo et al., 2005) .

Le passage de PC en PL induit une augmentation de l'expression de Dio2 et une diminution de Dio3 dans le MBH de cailles (autoradiogrammes en haut de l'image). Le graphique du bas représente les variations du taux d'ARNm des gènes codant pour Dio2 et Dio2 au cours du temps (moyenne $\pm$ sem ; n = 3-4).

Le MBH est constitué de plusieurs noyaux qui bordent le 3^{ème} ventricule, notamment les noyaux ventro/dorso médiaux et l'ARC (Figure 48). La paroi du 3^{ème} ventricule est formée de deux types cellulaires, les cellules épendymaires classiques et les tanocytes, des cellules gliales spécialisées. Ces cellules font l'interface entre le liquide céphalo rachidien, le MBH et l'éminence médiane (Bechtold and Loudon, 2007).

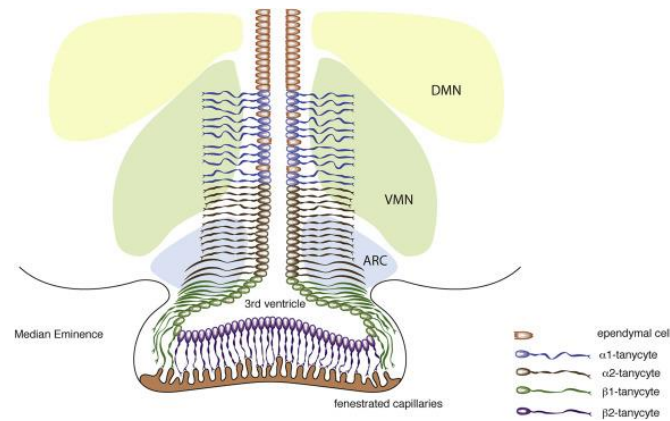


Figure 48 : Représentation schématique des noyaux constituant l'hypothalamus médiobasal de part et d'autre du 3ème ventricule, tapissé de cellules épendymaires et différents types de tanocytes (Rizzoti and Lovell-Badge, 2017).

ARC: arcuate nucleus, VMN: ventro-medial nucleus, DMN: dorso-medial nucleus.

Les déiodinases Dio2 et Dio3, dont l'expression est régulée par la photopériode de façon à induire une augmentation de la concentration de T3 dans le MBH en PL, sont exprimées dans les tanocytes (Guadaño-Ferraz et al., 1997; Klosen et al., 2013; Tu et al., 1997; Yoshimura et al., 2003). La régulation photopériodique de la balance Dio2/Dio3 dépend des espèces (Figure 49). Chez le hamster sibérien, l'expression de Dio3 est fortement augmentée en PC à la différence de Dio2 qui est peu régulée (Barrett et al., 2007a). Chez le hamster syrien, au contraire Dio2 est fortement inhibée en PC tandis que Dio3 varie peu (Revel et al., 2006). Chez le hamster d'Europe, une PC induit une régulation inverse de deux déiodinases (Hanon et al., 2008, 2010; Yasuo et al., 2007).

Espèces	DIO2	DIO3
Hamster sibérien	↓	↑↑↑
Hamster syrien	↓↓↓	-
Hamster européen	↓↓↓	↑↑↑
Fischer F344 rat	↓↓↓	↑↑↑

Figure 49 : Variation d'expression des déiodinases par la photopériode courte dans les tanocytes : ↓ régulées négativement ; ↑ régulée positivement d'après (Ebling, 2014).

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la TSH dans la *pars tubéralis* et ses conséquences dans l'hypothalamus, Nakao et ses collaborateurs ont étudié par microarray les variations du transcriptome dans le MBH et dans la *pars tubéralis* de caillles transférées de PC en PL. Rapidement après le transfert, une variation de l'expression des gènes codant pour TSHβ et Eya3 (un coactivateur facilitant la transcription du gène de la TSH) est observée dans la *pars tubéralis* suivie d'une augmentation de Dio2 corrélée à une diminution de Dio3 dans les tanocytes. (Nakao et al., 2008).

Dans la *pars tubéralis* du mouton, le coactivateur Eya3 est fortement exprimée en PL. De ce fait, la transcription du gène codant pour la TSH est augmentée. La transcription Eya3 est contrôlée par l'horloge circadienne et inhibée par la mélatonine. Son expression est maximale 12 heures après le début de production de mélatonine. La mélatonine a donc deux effets

antagonistes : d'une part elle favorise, de manière indirecte, l'expression d'Eya3 en définissant sa phase circadienne (maximum d'expression), mais son action directe induit une inhibition de l'expression de ce coactivateur (Figure 50). De ce fait, l'expression d'Eya3 est dépendante de la photopériode et son expression est maximale respectivement pendant la nuit en PC et le jour en PL (Dardente et al., 2010, 2014). Ainsi en PL, quand le message inhibiteur mélatoninergique est plus court, l'expression d'Eya3 induit l'expression de la TSH.

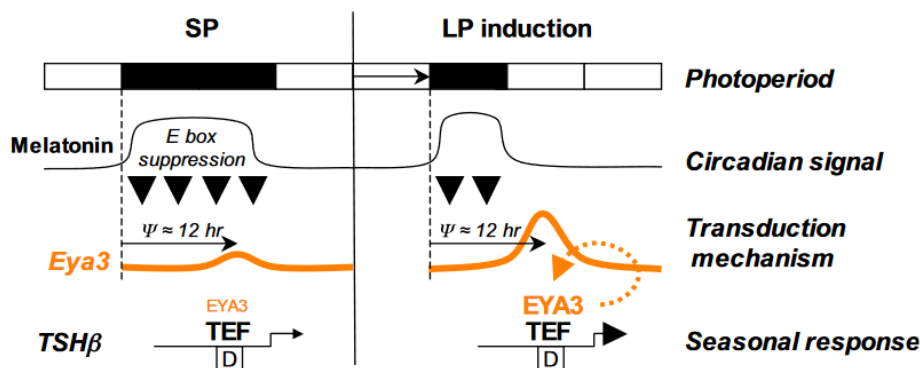


Figure 50 : Modèle d'induction photopériodique de l'expression d'Eya3 dans la *pars tubéris* (Dardente et al., 2010).

La sécrétion de mélatonine au début de la nuit définit la phase circadienne d'Eya3 (ψ), dont le maximum sera atteint 12 heures après le début de sécrétion. En PC, la longue durée de sécrétion de mélatonine inhibe la transcription d'Eya 3. En PL, le message inhibiteur de la mélatonine est plus court permettant ainsi l'expression d'Eya3 qui favorise la synthèse de TSH. Le complexe de coactivateurs TEF (Thyrotroph Embryonic Factor) et Eya3 induisent l'expression du gène TSH β en se liant sur un domaine D-box.

La mise en évidence de la forte expression de TSHR dans les tanocytes a permis de faire le lien entre la libération de TSH depuis la *pars tubéris* et la régulation de T3 dans le MBH.

Il existe donc une voie rétrograde depuis l'hypophyse jusqu'à l'hypothalamus indispensable au contrôle des fonctions saisonnières. Cette voie fait intervenir les hormones thyroïdiennes qui sont des éléments clés dans la régulation de ces fonctions. En PL, la mélatonine, en se liant aux récepteurs MT1, induit dans la PT la transcription de TSH β , via une augmentation d'Eya 3. La TSH libérée se lie sur ses récepteurs localisés sur les tanocytes induisant une augmentation de Dio2, une diminution de Dio3 et par conséquent une augmentation locale de T3 (Figure 51 et Figure 52). L'élévation de T3 dans le MBH est indispensable au contrôle des fonctions saisonnières en particulier la reproduction (Barrett et al., 2007a; Klosen et al., 2013).

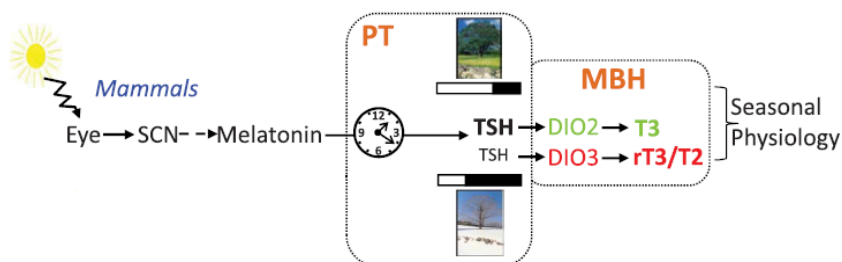


Figure 51 : Contrôle photopériodique de la TSH dans la *pars tubéris* chez les mammifères (Dardente et al., 2014).

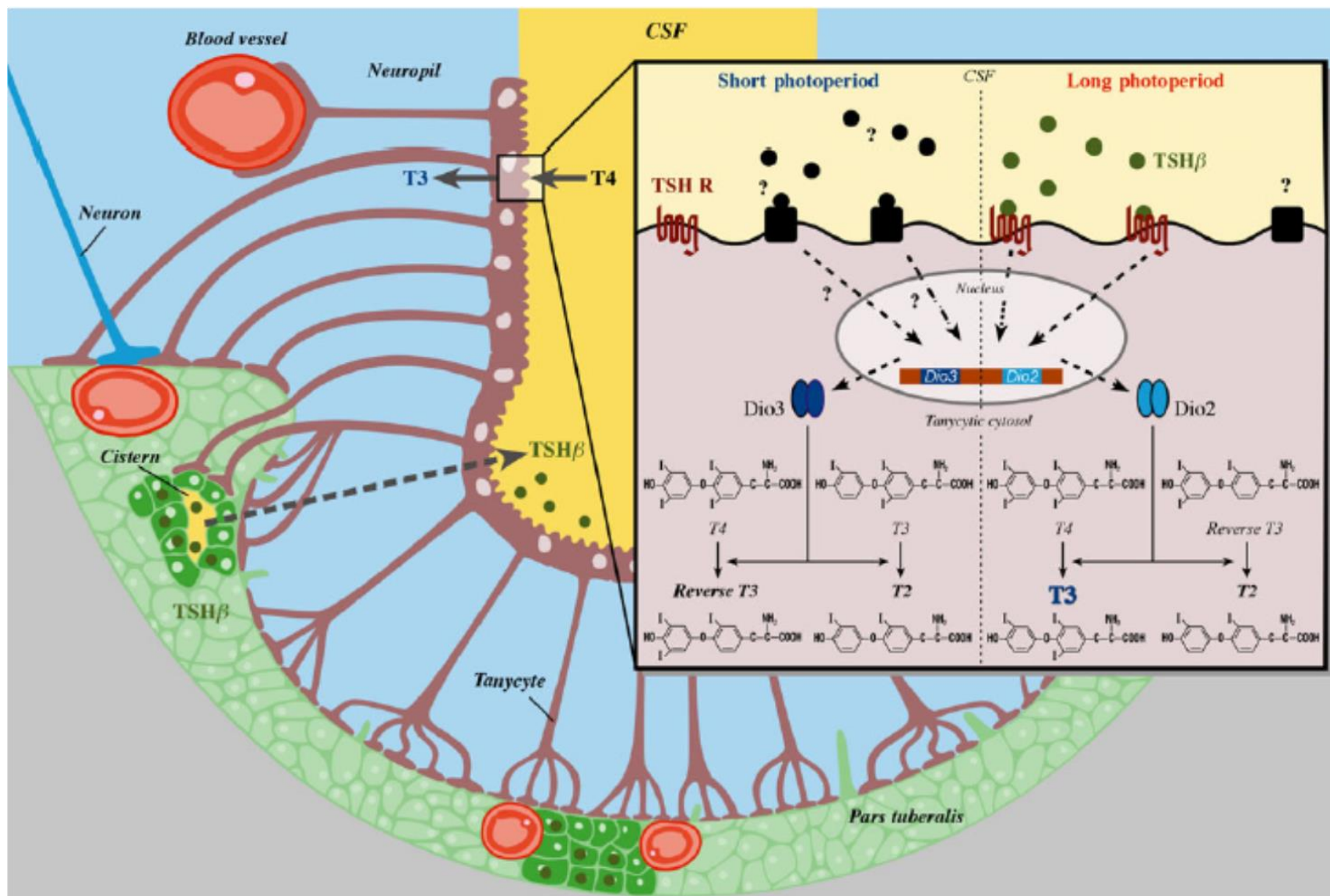


Figure 52 : Lien entre la sécrétion de TSH et la disponibilité en TH dans le MBH (Barrett and Bolborea, 2012).

La régulation saisonnière de la reproduction est un phénomène complexe, seul un bref aperçu du rôle des TH hypothalamiques sera résumé dans le paragraphe suivant.

L'activité saisonnière de l'axe gonadotrope est sous le contrôle des changements mélatonine-dépendant de la disponibilité en T3. En effet, l'hypothèse actuelle est que la T » hypothalamique régule l'activité de neuropeptides impliqués dans le contrôle de l'activité des neurones à GnRH, notamment le RFRP (RF (Arg-Phe) amide-related peptides) et le kisspeptine (Kiss) dont l'expression est fortement modulée par la photopériode chez de nombreuses espèces (Figure 53). Au niveau central, le contrôle de la reproduction dépend de l'action de la neurohormone GnRH sur la production hypophysaire des gonadotropines (LH et FSH).

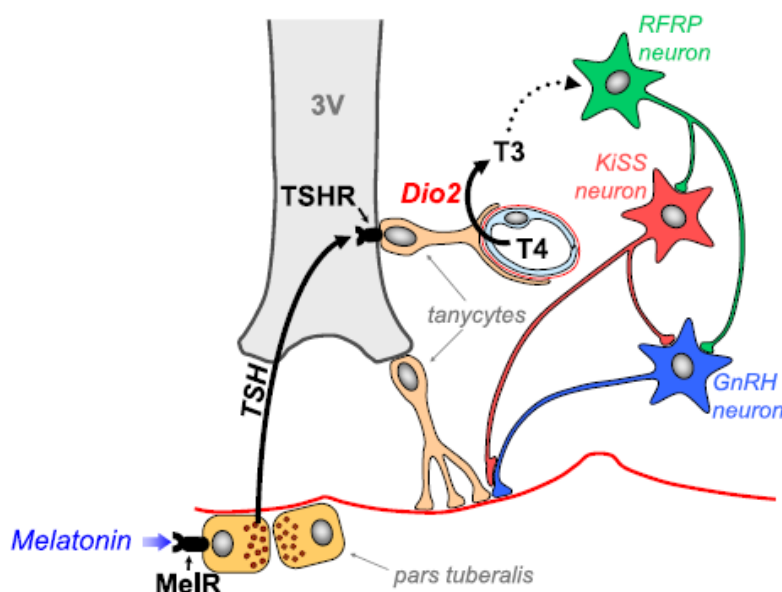


Figure 53 : Implication de la mélatonine et les hormones thyroïdiennes dans le contrôle de la reproduction du hamster mâle (Klosen et al., 2013).

c) Autres rôles de la mélatonine

La fonction principale de la mélatonine est de transmettre à l'organisme les informations à l'échelle de la journée (alternance jour/nuit) et de l'année (alternance des saisons), au sein du règne animal mais aussi chez les plantes (Kolář et al., 1997; Nawaz et al., 2016). Mais d'autres rôles de la mélatonine ont été proposés. Elle aurait une action anti âge (Touitou, 2001) et antioxydante (Reiter et al., 2003), et serait impliquée dans les mécanismes liés aux cancers (Reiter, 2004) et au système immunitaire (Carrillo-Vico et al., 2004, 2005). La concentration nocturne de mélatonine est connue pour diminuer chez les personnes âgées (Touitou, 2001). De plus, une supplémentation en mélatonine aurait un effet protecteur dans certaines maladies neurodégénératives, comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, et d'Huntington ou les scléroses amyotrophiques latérales (Karasek, 2004). La Figure 54 présente l'ensemble des rôles décrits de la mélatonine. Un très grand nombre d'effets de la mélatonine dans différents modèles cellulaires et animaux sont résumés dans l'Annexe 2.

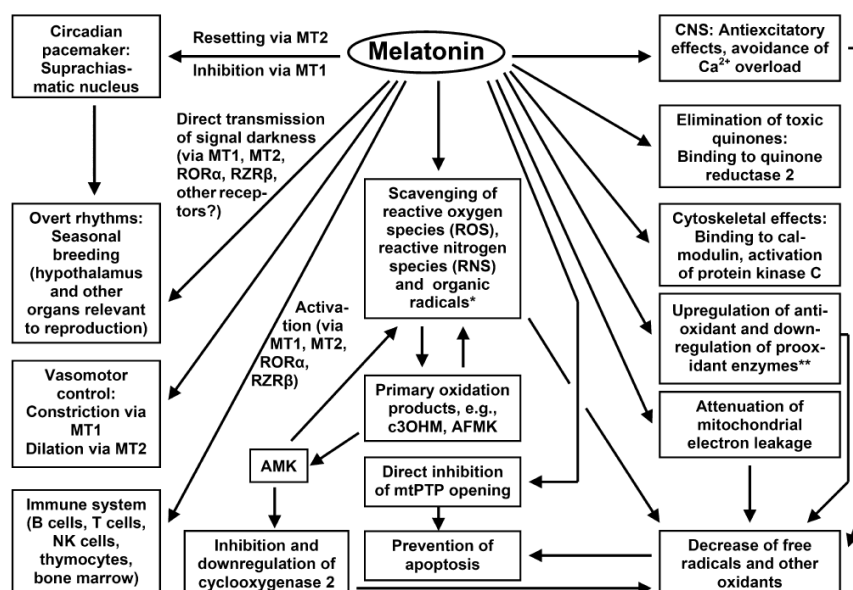


Figure 54 : Différentes actions de la mélatonine (Pandi-Perumal et al., 2006).

AFMK : N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine ; AMK : N1-acetyl-5-methoxykynuramine ; c3OHM : 3-hydroxymélatonine cyclique. Ces 3 produits sont issus du métabolisme de la mélatonine. MT1 et MT2 : récepteurs à la mélatonine 1 et 2 ; mtPTP : pore mitochondriale de transition membranaire, ROR/RZR : récepteurs nucléaires de la superfamille des acides rétinoïques ; ROS : espèces réactives de l'oxygène, RNS : espèces réactives du nitrogène.

Certaines études ont montré la capacité de la mélatonine à réduire le temps d'endormissement et à augmenter la durée totale du sommeil (Ferracioli-Oda, 2013) possiblement via un abaissement de la température corporelle (Dawson and Encel, 1993). Cette action de la mélatonine dépendrait principalement de l'heure de l'administration, de la dose mais serait également âge et genre dépendant. Cet effet hypnotique de la mélatonine est controversé. En effet, que les espèces soient diurnes ou nocturnes, la sécrétion de mélatonine est exclusivement nocturne, de ce fait, le rôle hypnotique de la mélatonine est discutable, sauf s'il est limité à l'Homme. Les différents aspects de ce débat sont détaillés dans deux articles (van den Heuvel et al., 2005; Zhdanova, 2005).

B. Récepteurs à la mélatonine

1. Présentation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une superfamille de récepteurs membranaires (800 gènes retrouvés chez l'Homme) impliqués dans la majorité des grandes fonctions biologiques. Ils sont par conséquent des cibles thérapeutiques très importantes, en effet 30% des médicaments actuellement sur le marché ciblent les RCPG (Fredriksson et al., 2003; Hopkins and Groom, 2002). Preuve de cette importance, les travaux sur la cristallisation des RCPG de Robert Lefkowitz et Brian Kobilka ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 2012

Les RCPG sont impliqués dans la transmission de messages extracellulaires vers l'intérieur de la cellule. Les types de messages transduits par ces récepteurs sont très divers, on peut citer la lumière, des peptides et protéines, les molécules odorantes, le calcium... La diversité des ligands possibles reflète le succès évolutif de ces récepteurs. Le signal est transduit au niveau intracellulaire par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques (composées des sous unités α , β , γ). Ces protéines G vont, par l'intermédiaire d'action activatrice ou inhibitrice sur des effecteurs, induire une réponse intracellulaire (Figure 55).

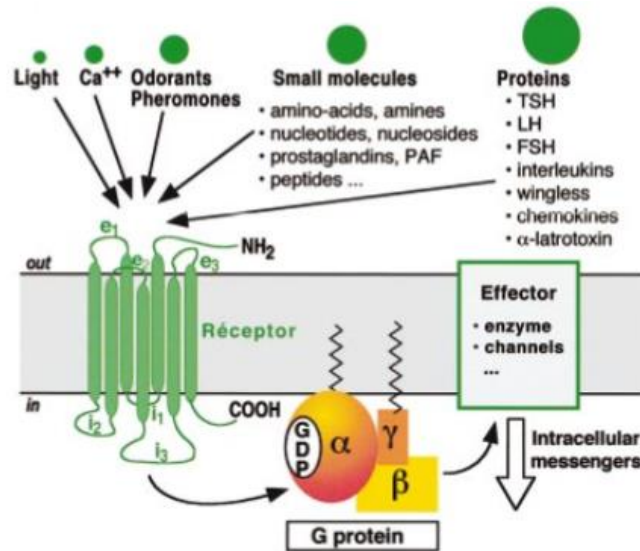


Figure 55 : Transmission d'un signal extracellulaire au niveau intracellulaire par l'intermédiaire d'un RCPG (Bockaert and Pin, 1999).

PAF: Platelet-Activating factor, GDP: Guanosine Diphosphosphate, TSH: Thyroid Stimulating Hormone, LH: Luteinizing Hormone, FSH: Follicle Stimulating Hormone

Il existe de nombreuses classifications de cette superfamille mais la plus utilisée est basée à la fois sur les aspects structuraux et fonctionnels ainsi que sur les homologies de séquences de ces récepteurs : la classification A-F élaborée par Kolakowski (Kolakowski, 1994; Munk et al., 2016). Cette classification distingue 6 familles :

- Famille A regroupe les récepteurs similaires à la rhodopsine
- Famille B regroupe les récepteurs similaires au récepteur à la sécrétine
- Famille C regroupe les récepteurs similaires au récepteur du glutamate
- Famille D, non retrouvée chez les humains, correspond aux récepteurs aux phéromones fongiques
- Famille E, non retrouvée chez les humains, correspond aux récepteurs à l'AMPc
- Famille F correspond à la famille de récepteurs Frizzled/Smoothed, impliqués en autres dans les voies de signalisations Wnt.

Malgré une évidente diversité, ces récepteurs possèdent une structure commune. Ils sont composés de sept hélices α transmembranaires (TM) hydrophobes dont les séquences sont relativement homologues. L'extrémité NH₂ terminale, extracellulaire, présente deux sites de N-glycosylation, l'extrémité COOH est, quant à elle, intracellulaire. Les sept domaines

TM1-TM7 sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (E1-3) et trois boucles intracellulaires (I1-3) (Figure 56) (Baldwin, 1993; Kobilka, 2007). L'extrémité COOH peut s'ancrer à la membrane par l'intermédiaire d'une cystéine palmitoylée et constituer une quatrième boucle intracellulaire (I4), principalement retrouvée dans les récepteurs de la famille A (Gether, 2000).

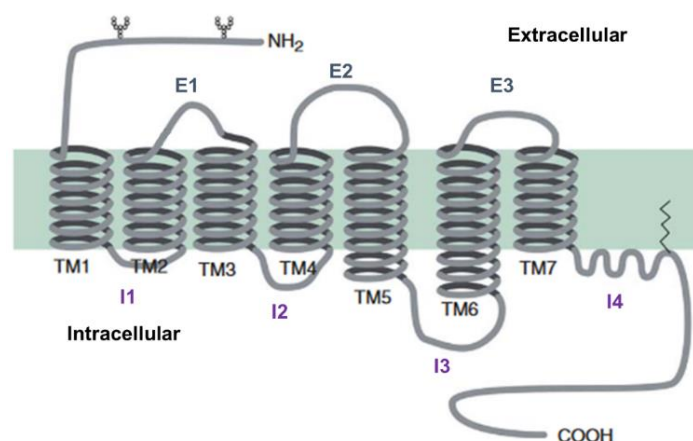


Figure 56 : Représentation schématique de la structure bidimensionnelle des RCPG d'après (Deupi and Kobilka, 2007).

Trois parties distinctes peuvent être identifiées dans la structure des RCPG (extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire). La partie extracellulaire, constituée de la partie N terminale et des trois boucles extracellulaires, a pour rôle de moduler l'accès du ligand. La longueur de la région N terminale et des boucles extracellulaires mais également les séquences retrouvées sont hautement variables. La boucle E2 a un rôle particulièrement important, elle permettrait de guider le ligand dans la poche de liaison. Un pont disulfure entre cette boucle et le TM3, largement conservé au sein des RCPG, permet de stabiliser la structure. La région des domaines TM forme le cœur structural du récepteur, elle est impliquée dans la liaison du ligand et dans la transduction du signal par le biais de changements de conformation. Le lien entre les TM se fait par l'intermédiaire de 24 contacts et 36 acides aminés topologiquement identiques. Le TM3 semble avoir un rôle crucial dans la structure des RCPG, il forme des contacts particuliers avec les TM2-4-5 et 6.

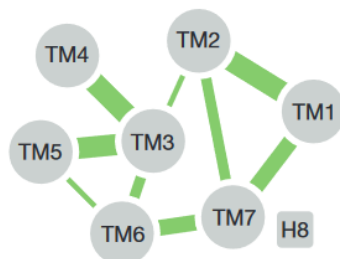


Figure 57 : Représentation schématique des contacts entre les domaines transmembranaires (Venkatakrishnan et al., 2013).

Les contacts entre les TM sont représentés par les lignes vertes, l'épaisseur de la ligne est proportionnelle au nombre de contact entre les TM. H8 représente la quatrième boucle intracellulaire.

La partie intracellulaire est quant à elle constituée des trois boucles intracellulaires et le cas échéant d'une quatrième. Cette dernière partie est en contact direct avec les protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire.

La liaison du ligand sur son récepteur entraîne des changements de conformation au niveau des TM. Ce signal est transduit au niveau intracellulaire par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques composées de la sous-unité α et du complexe $\beta\gamma$. De nombreux types de sous-unités ont été détaillés, 20 sous-unités α , 5 sous-unités β et 10 γ . Quatre grandes familles de protéines G peuvent être décrites : Gs, Gi, Gq et G₁₂ (Fields and Casey, 1997). Certaines de ces protéines (G_{i/o}) sont sensibles à la toxine pertussique : en présence de cette dernière, les protéines G sensibles restent liées au GDP empêchant ainsi leur activation. Le récepteur activé agit comme un facteur d'échange de la guanine (GEF) pour la sous-unité α (passage du GDP au GTP). La présence du GTP sur la sous-unité α activée (*) entraîne une séparation de la sous-unité α et du complexe $\beta\gamma$, et ainsi son activation. La sous-unité α va pouvoir agir avec des effecteurs intracellulaires, entraînant leur activation et l'initiation de la cascade des seconds messagers. L'hydrolyse du GTP en GDP entraîne l'inactivation de la sous-unité α , permettant ainsi la réassociation avec le complexe $\beta\gamma$ (Figure 58).

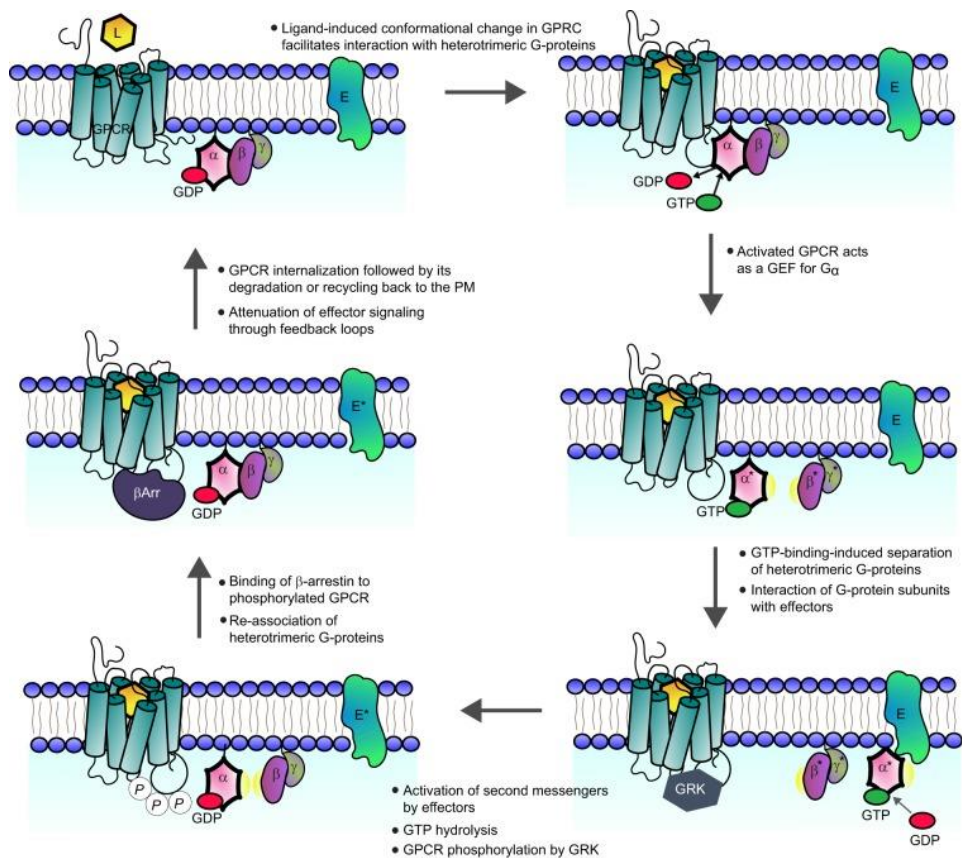


Figure 58 : Représentation schématique de l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (Hanlon and Andrew, 2015).

Le récepteur est phosphorylé par des kinases spécifiques des RPCG (GRK), ce qui active le recrutement et la liaison de la β -arrestine (β Arr) provoquant l'internalisation du récepteur. Le récepteur va être adressé à l'endosome, où il pourra être déphosphorylé et renvoyé à la

membrane plasmique ou envoyé dans une voie de dégradation (Hanlon and Andrew, 2015; Pierce et al., 2002) (Figure 58 et Figure 59).

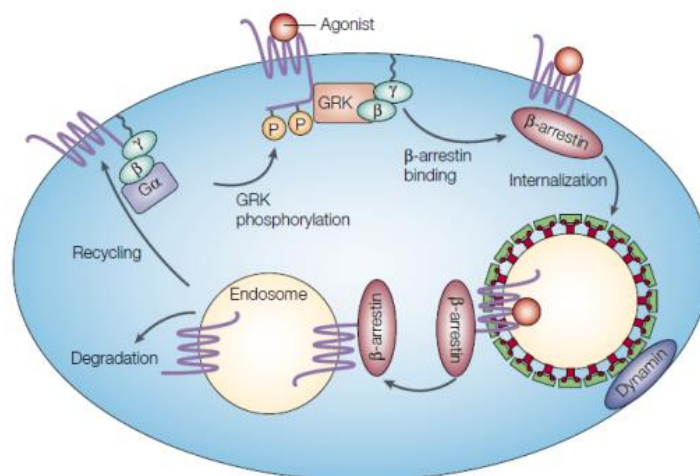


Figure 59 : Rôle de la β -arrestine dans l'inactivation des RCPG (Pierce et al., 2002).

2. Récepteurs à la mélatonine, un exemple de RCPG

La mise en évidence des sites de liaison de la mélatonine dans les différents tissus a été facilitée par l'utilisation de la 2- ^{125}I -mélatonine, un agoniste spécifique, dans des expériences d'autoradiographie (Vaněček et al., 1987). Deux types de sites de liaison ont été mis en évidence selon leur affinité pour la 2- ^{125}I -mélatonine : les sites de haute affinité (constantes de dissociation (K_D) comprises entre 20 et 200 pM) et de faible affinité. (K_D de l'ordre du nanomolaire). Le clonage des récepteurs de haute affinité a permis de déterminer trois types de récepteurs (Reppert et al., 1996a). Cloné à partir de mélanophores de xénope lisse, Mel1c a été le premier récepteur identifié (Ebisawa et al., 1994). Basée sur leur homologie de séquence, la séquence des récepteurs MT1 et MT2 a ensuite été caractérisée (Reppert et al., 1994, 1995a) et enfin celle d'un récepteur sans affinité pour la mélatonine, le récepteur GPR50 (Reppert et al., 1996b). Un site de liaison atypique de faible affinité a également été mis en évidence, d'abord nommé MT3, il s'agit en réalité d'une enzyme, la quinone réductase 2 (QR2) (Nosjean et al., 2000).

a) Structures génique et protéique des récepteurs

Les gènes *mtnr1a*, *mtnr1b*, *Mel1c* et *gpr50* codent respectivement pour les récepteurs MT1, MT2, Mel1c et GPR50. La structure de ces gènes est commune, composée de deux exons séparés par un large intron de plusieurs kilobases. La présence de cet intron, et sa taille, ont été un obstacle majeur au clonage *de novo* de récepteurs à la mélatonine. Le site d'épissage se trouvant toujours dans la première boucle cytoplasmique. L'exon 1 code pour le TM1, la séquence de cet exon est très riche en GC et peu spécifique. L'exon 2 quant à lui code pour les TM2 à 7 et sa séquence est beaucoup plus spécifique (Reppert et al., 1994, 1995a).

Les récepteurs à la mélatonine sont des RCPG appartenant à la famille A proche de la rhodopsine, où ils forment une sous-famille à part entière (Fredriksson et al., 2003) (Figure 60).

Chapitre I : Introduction

Les récepteurs MT1 et MT2 humains présentent 60% d'homologie de séquence protéique l'un avec l'autre et 73% en ne prenant en compte que les TM.

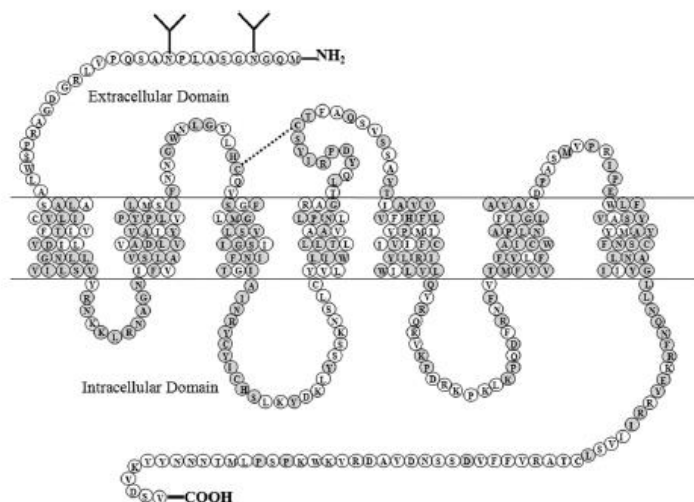


Figure 60 : Représentation schématique du récepteur humain MT1 (hMT1) (Dubocovich et al., 2010).

Les acides aminés grisés représentent les acides aminés en commun avec le récepteurs MT2 humain. La partie N terminale extracellulaire du récepteur MT1 possède deux sites de glycosylation alors que le récepteur MT2 n'en possède qu'un seul.

Certains motifs d'acides aminés sont conservés au sein de la famille des RPCG (Figure 61). Le motif DRY, impliqué dans la liaison avec la protéine G, situé dans le TM3 est retrouvé sous le motif NRY dans les récepteurs à la mélatonine. Le motif NAXXY présent dans le TM7 (impliqué dans l'activation du récepteur) est retrouvé sous la forme NAXIY (Fritze et al., 2003; Venkatakrishnan et al., 2013).

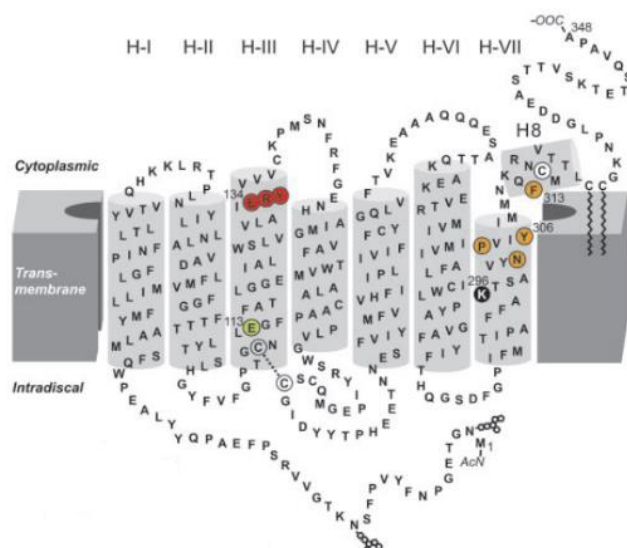


Figure 61 : Mise en évidence des motifs DRY et NXXY dans la rhodopsine (Fritze et al., 2003).

Le motif D(E)RY (TM3) est représenté en rouge et le motif NXXY (TM7) en orange

b) Récepteurs à haute affinité

Trois récepteurs à haute affinité ont été décrits, les récepteurs MT1 et MT2 retrouvés chez les mammifères et non mammifères et le récepteur Mel1c retrouvé seulement chez les amphibiens et les oiseaux.

i. Récepteurs MT1 et MT2

Le récepteur MT1 est le plus étudié et considéré comme le principal acteur de la régulation des rythmes circadiens et saisonniers (Yasuo et al., 2009). Il est, en particulier, impliqué dans la transmission de l'information photopériodique qui conditionne les phénotypes hivernaux tels que la torpeur ou la restriction métabolique. Depuis les années 90, il est admis que chez les hamsters, le récepteur MT2 est un knockout naturel. En effet, Weaver et ses collaborateurs ont mis en évidence chez le hamster sibérien la présence d'un codon stop prématuré ayant pour conséquence la production d'une protéine tronquée au niveau du domaine TM4 et non fonctionnelle (Weaver et al., 1996). Ces éléments ont conduit à l'hypothèse de l'absence d'implication du récepteur MT2 dans les fonctions saisonnières de façon générale.

Les méthodes d'autoradiographie, les hybridations in situ et la RT PCR ont permis de mettre en évidence les structures dans lesquelles sont exprimés les récepteurs mélatoninergiques (Table 4). De façon notable, cette répartition est espèce-dépendante à l'exception de la *pars tubéralis* et des NSC. Chez tous les mammifères, à l'exception de l'Homme, la *pars tubéralis* est la structure la plus riche en récepteurs MT1 et chez les espèces saisonniers son expression diminue en PC. Chez les mammifères, mis à part chez le vison et le mouton, les NSC expriment le récepteur MT1. Dans cette même structure, chez le rat, MT1 est régulé de manière circadienne (Poirel et al., 2002).

D'autres structures centrales expriment MT1 comme l'hippocampe, le cortex et la rétine (Dubocovich et al., 1998; Mazzucchelli et al., 1996; Poirel et al., 2003). Dans une récente publication, la présence du récepteur MT1 a été mise en évidence dans la mitochondrie neuronale où se trouveraient de grandes quantités de mélatonine. La mélatonine ainsi synthétisée inhibe, via sa liaison au récepteur MT1 mitochondrial, la libération de cytochrome c et l'activation des caspases liée au stress (Suofu et al., 2017).

Le récepteur MT2 quant à lui est exprimé dans la rétine, et a aussi été retrouvé dans les NSC chez le rat mais pas chez l'Homme (Isobe et al., 2001; Jockers et al., 2008; Liu et al., 1997; Pévet et al., 2002; Rivera-Bermúdez et al., 2004).

Au niveau périphérique, les récepteurs à la mélatonine sont largement distribués et retrouvés, entre autres, dans le pancréas, le cœur, le foie, les poumons, la peau et les vaisseaux sanguins (Zawilska, 2009). Cette large distribution des récepteurs est le reflet de l'action pléiotrope de la mélatonine (Doolen et al., 1998; Masana et al., 2002; Vanecek, 1998).

Tissue/ Cells	Species	Techniques / References	Affinity (Kd; pM)	Bmax (fmol/mg)
Central nervous system				
Hypothalamus	Rat; hamster; human fetus	Autoradiography; binding / 1, 2, 3	55 ± 9	1.1 ± 0.3
Hypothalamus - SCN	Rat, human	Autoradiography; binding / 4, 5, 6	52.8	16.5
Hypothalamus - median eminence	Rat	Binding / 6, 7, 8	20.9 ± 1.7; 170; 43	8.5 ± 0.4; 8
Hypothalamus - median eminence	Hamster	Binding / 9	59	10.4
Striatum	Rat	Autoradiography / 1	-----	-----
Thalamus	Rat, hamster, human fetus	Autoradiography / 3, 6	-----	-----
Hippocampus	Rat	Autoradiography / 1, 6	-----	-----
Area Postrema	Rat	Autoradiography; binding / 6, 10	45.9 ± 6	30.8 ± 4.6
Parietal Cortex	Rat	Autoradiography / 1	-----	-----
Pons-medulla	Rat	Autoradiography / 1	-----	-----
Cerebellum	Rat, human fetus	Autoradiography / 1, 3	-----	-----
Cerebellum	Human	Binding / 11	24 - 80	3.6
Pituitary	Hamster	Binding / 9	97	6
Pituitary - pars tuberalis	Hamster	Binding / 12	29.3 ± 5.9	2.54 ± 0.19
Pituitary - pars tuberalis	Sheep	Binding / 13, 14	17	63.4 ± 6.3
Harderian gland	Rat	Binding / 8	190	4
Retina	Chicken, rabbit, mouse	Binding / 15, 16	434 ± 56	74.0 ± 13.6
Blood vessels				
Brain arteries	Rat	Binding / 17	13	-----
Anterior cerebral artery	Rat	Binding / 18	340	19
Caudal artery	Rat	Binding / 18	10.5	15

Peripheral organs				
Heart	Hamster	Autoradiography; binding / 19	-----	0.5
Heart	Duck	Binding / 20	30.5 ± 3.5	0.46 ± 0.1
Thymus	Rat	Binding / 21	470	1.01 pM
Spleen	Rat	Binding / 22	530 *	2.52 pM
Intestine	Mouse, hamster, chicken, human	Autoradiography; binding / 19, 23, 24	1750 ± 130 *; 150 - 200	31.0 ± 3.7; 0.7
Kidney	Hamster	Binding / 19	1900 ± 400 *	89.5 ± 18.0
Kidney	Human	Binding / 25	15.2 ± 2.5	1.79 ± 0.19
Lung	Hamster; chicken	Autoradiography; binding / 19, 20	9.11 ± 0.73	1.29 ± 0.16; 2.2
Liver	Hamster	Binding / 19	-----	6.1
Hepatocytes	Mouse	Binding / 26	10.0 ± 0.4	2.9 ± 0.4
Pancreas	Rat	Autoradiography / 27	-----	-----
Lymphocytes	Human	Binding / 28	1020 ± 340	10.1 ± 1.6 fmol/10 ⁷ cells
Activated lymphocytes	Human	Binding / 29	140 ± 30	6.8 ± 1.5
Adrenal cortex	Rat, monkey	Binding / 30, 31	541; 96.9 ± 15	3.8 ± 0.4;
Mammary gland	Mice	Binding / 32	1330 ± 220 *	267 ± 42
Brown adipose tissue	Hamster	Binding / 33	570 ± 300 *	3.2 ± 1.8
Brown adipocyte cell line PAZ6	Human	Binding / 34	457 ± 5	7.5 ± 1.6
Reproductive system				
Ovarian cells	Human, rat	Binding / 35, 36	99; 83	3.28
Uterus	Rat	Binding / 37	28.9 ± 3.59	1.6 ± 0.15
Testes	Rat	Binding / 38	215 ± 23	0.94 ± 0.1
Prostate	Human	Binding / 39	68	-----
Epididymis	Rat	Binding / 40	62.6 ± 7.79	1.55 ± 0.16
Leydig cells	Rat	Binding / 41	88.70 ± 6.20	46.7 ± 3.5
Vas deferens	Rat	Binding / 42	104.2 ± 23.7	2.07 ± 0.19
Cancer cells				
Melanoma	Hamster	Binding / 43	890 ± 80	6.2 ± 2.9

* correspond most likely to MT3 (QR2) binding sites

Table 4 : Localisation des sites de liaison de la [125 I] mélatonine (Zlotos et al., 2014)

ii. Récepteur Mel1c

Le récepteur Mel1c, premier récepteur de haute affinité décrit pour la mélatonine, a été mis en évidence dans les mélanophores de *Xenopus laevis* (Ebisawa et al., 1994). Son affinité pour la mélatonine est comparable à celle des récepteurs MT1 et MT2 (Ebisawa et al., 1994; Reppert et al., 1995b). Ce récepteur est trouvé exclusivement chez les poissons, amphibiens et oiseaux (Reppert, 1997). Au sein d'une même espèce, la séquence en acides aminés de ce récepteur présente environ 60% d'homologie avec les récepteurs MT1/MT2 (Dufourny et al., 2008). D'un point de vue phylogénétique, Mel1c est plus proche du récepteur MT2 que de MT1 (Dubocovich et al., 2010). Jockers et ses collaborateurs ont montré que le récepteur Mel1c de xénope pouvait moduler la voie de la guanosine 3'5'-cyclique monophosphate (GMPC) intracellulaire. (Jockers et al., 1997).

c) Récepteurs de faible affinité

Le récepteur MT3 de faible affinité pour la mélatonine n'est pas un récepteur à sept domaines transmembranaires mais une enzyme : la quinone réductase 2, purifiée à partir de rein de hamster syrien. L'affinité de la [¹²⁵I]-mélatonine pour ce récepteur est de l'ordre 3-9 nanomolaires (Boutin, 2007; Nosjean et al., 2000). L'inhibition de QR2, par des concentrations pharmacologiques importantes de mélatonine ($\geq 500\mu\text{M}$), pourrait expliquer certaines actions protectrices de la mélatonine [pour revue (Boutin, 2015)].

d) Récepteur sans affinité: GPR50

i. Généralités

Le récepteur H9 a été décrit par Reppert et ses collaborateurs en 1996 à partir de librairie élaborée à partir d'hypophyse humaine (Reppert et al., 1996b). Gubitz et Reppert ont ensuite mis en évidence que chez l'Homme, le gène *h9* est retrouvé sur le chromosome X (GPR50) (Gubitz and Reppert, 1999). Ce récepteur possède 45% d'homologie avec le récepteur MT1 et MT2 humain. A la différence de ces derniers, il ne possède pas de site de glycosylation au niveau N-terminal et présente une extrémité C terminale allongée de plus de 300 acides aminés. De manière surprenante, ce récepteur ne possède aucune affinité pour la mélatonine. A ce jour, ce récepteur reste toujours orphelin, en effet aucun ligand endogène n'a été mis en évidence (Reppert et al., 1996b). Par contre, il peut affecter la liaison de la mélatonine sur MT1 en s'hétérodimérisant (Levoye et al., 2006a). Ce point sera détaillé dans la section

Hétérodimérisation II.B.5.

Ce récepteur a été décrit uniquement chez les mammifères. Dufourny et ses collaborateurs ont montré que les récepteurs GPR50 et Mel1c étaient deux récepteurs orthologues. Deux hypothèses sont actuellement en cours de débat quant à l'origine de ces deux récepteurs orthologues. Un gène ancestral à Mel1c/GPR50 se serait dupliqué avant l'apparition des vertébrés. Cette hypothèse implique la présence d'un pseudogène Mel1c chez les mammifères et de la même manière un pseudogène GPR50 chez les poissons, oiseaux et xénope. Cette évolution a déjà été observée pour les gènes de la zone pellucide qui ont été perdus chez les mammifères.

La seconde hypothèse, estimée plus probable, considère que le gène *Mel1c* aurait rapidement évolué chez les mammifères euthériens introduisant des mutations sur des acides aminés dont le rôle est essentiel dans la liaison de la mélatonine au récepteur. L'addition d'une longue queue en C-terminal serait également une des raisons de la perte de la fonctionnalité de ce récepteur. Il faut toutefois prendre en compte que cette hypothèse ne peut être validée qu'à la condition que l'environnement génique de ces deux récepteurs reste le même (Dufourny et al. 2008).

Malgré cette perte de fonctionnalité vis-à-vis de la mélatonine, ce récepteur a été conservé dans le génome des mammifères euthériens. Des études récentes ont mis en évidence l'implication du gène *gpr50* dans certaines pathologies. Une association significative entre la présence d'un polymorphisme ($\Delta 502-505$) trouvé sur le gène *gpr50* et les troubles bipolaires affectifs ainsi que les troubles dépressifs majeurs a été mise en évidence, avec une corrélation plus forte chez les femmes (Thomson et al., 2004). Une autre étude de variants a été réalisée chez une cohorte de patients avec une obésité sévère précoce. Les porteurs homozygotes des mutations C-16X2GPR50T, Ins501Del, A1582G ont un taux de triglycérides (TG) circulants à jeun significativement plus élevé que les sujets non porteurs du variant. Cette étude révèle le rôle potentiel de GPR50 dans le métabolisme des lipides (Bhattacharyya et al., 2006).

La production d'anticorps spécifiques de GPR50 a permis de déterminer sa distribution (Batailler et al., 2012; Hamouda et al., 2007). Chez le rat, l'expression de GPR50 a été mise en évidence dans des régions hypothalamiques entourant le 3^{ème} ventricule en particulier dans le DMH, le noyau périventriculaire, les tanycytes, et des structures non hypothalamiques comme la *pars tubéralis* (Figure 62). Chez le mouton, le GPR50 n'est pas exprimé dans les tanycytes indiquant des différences de distribution de ce récepteur entre espèces.

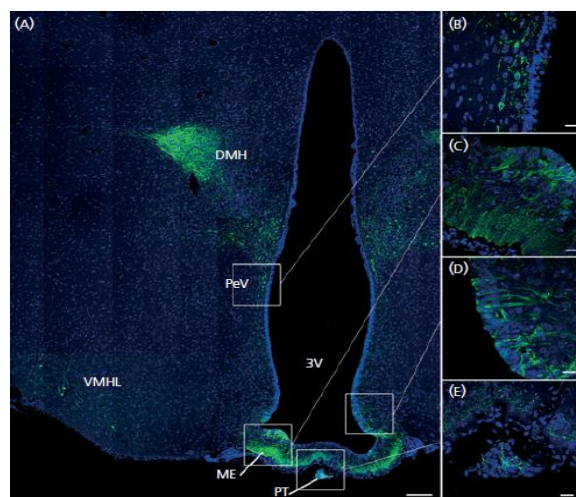


Figure 62 : Localisation du récepteur GPR50 dans le diencephale de rat. (Batailler et al., 2012).

Analyse d'immunofluorescence sur des coupes de cerveau de rat fixées au paraformaldéhyde. Le récepteur GPR50 est marqué en vert (et les noyaux en bleu) dans la région du 3^{ème} ventricule (3V) de l'hypothalamus (A) : dans le noyau périventriculaire de l'hypothalamus (PeV-B), dans les tanycytes de l'éminence médiane (ME-C), dans les tanycytes au niveau du noyau ventro-médial de l'hypothalamus (VMHL-D), et dans la *pars tubéralis* (PT-E).

Le récepteur GPR50 est également trouvé dans l'aire médiale préoptique, le septum latéral, l'aire hypothalamique latérale, le noyau de la stria terminalis, et certaines régions de l'amygdale (Batailler et al., 2012).

Les tanycytes de l'hypothalamus sont fortement impliqués dans la transmission du signal saisonnier mélatoninergique (via la TSH) vers l'hypothalamus [pour revue (Hazlerigg and Simonneaux, 2015b)]. La présence de GPR50 dans cette région indique leur possible implication dans la réponse photopériodique. Ainsi, chez le hamster de Sibérie, l'expression du gène *gpr50* est diminuée en PC par rapport à la PL (Barrett et al., 2006).

La caractérisation du phénotype des souris *Gpr50*^{-/-} a montré que le métabolisme de ces souris était altéré. En effet cette étude a montré la résistance de ces souris au régime favorisant l'obésité (prise de poids réduite bien que la prise de nourriture soit plus élevée) (Ivanova et al., 2008). Bechtold et ses collaborateurs ont mis en évidence un rôle spécifique de GPR50 dans la thermogénèse et la torpeur (Bechtold et al., 2012). Après quelques heures de jeûne, les souris KO présentent des périodes de torpeur à la différence des souris WT. Des accès de torpeur ont déjà été décrits chez des souris de laboratoire mais lors d'exposition prolongée à des températures ambiantes faibles associées à des restrictions en nourriture. Cette altération de la thermogénèse est associée à une réponse diminuée à la leptine ainsi qu'une réduction de la TRH dans l'hypothalamus.

3. Voies de signalisation des récepteurs MT1 et MT2

Les récepteurs à la mélatonine sont couplés à plusieurs voies de signalisation intracellulaires (Figure 63). La voie de signalisation conduisant à la diminution de l'AMPc intracellulaire est commune aux deux récepteurs MT1 et MT2 et est la plus répandue. Le couplage de ces récepteurs à une protéine G α_i , sensible à la toxine pertussique, induit l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC), entraînant ainsi la diminution de l'AMPc intracellulaire (Reppert et al., 1994, 1995a). Dès lors, l'activité de la PKA est réduite, conduisant ainsi à une inhibition de la phosphorylation du facteur de transcription CREB, et par conséquent la transcription de ses gènes cibles (Figure 63). D'autres voies peuvent être activées selon le type cellulaire et la structure dans lesquelles les récepteurs sont exprimés.

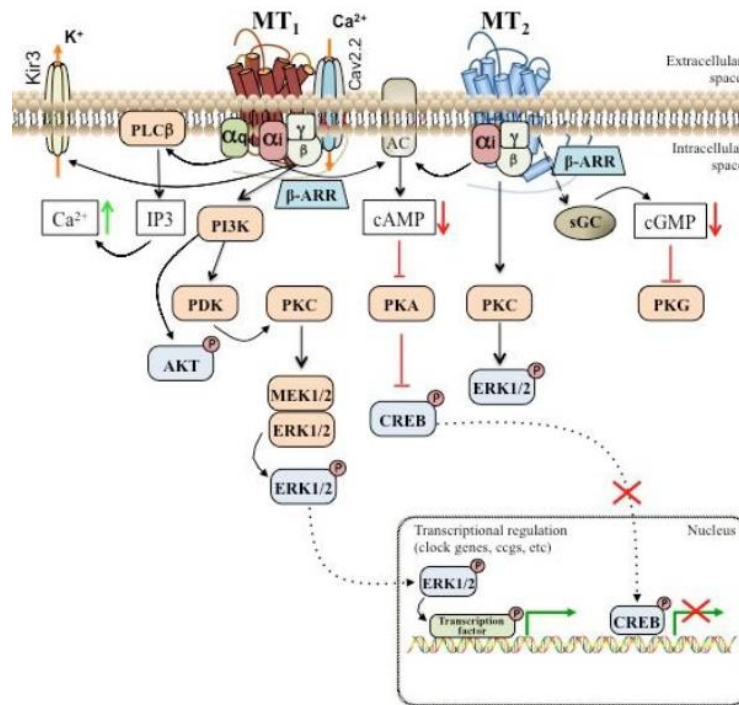


Figure 63 : Voies de signalisation des récepteurs MT1 et MT2 (Cecon et al., 2017).

a) Voie de signalisation du récepteur MT1

Les réponses intracellulaires induites par l'activation du récepteur MT1 par la mélatonine sont multiples (Figure 63), dépendantes du type cellulaire et se font par l'intermédiaire de protéines G sensibles (Gi) ou non sensibles (Gq) à la toxine pertussique. Dans les cellules non neuronales, l'activation du récepteur MT1 induit l'augmentation de la phosphorylation de ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2) et de MEK1/2 (Mitogen-Activated Protein Kinase). Une fois phosphorylé ERK peut entrer dans le noyau et favoriser la transcription de gènes cibles, dont les gènes horloges. Ces voies font intervenir la PI3K (phosphoinositide 3-kinase), la PDK (protéine kinase phosphoinositide dépendante) et la PKC.

La PI3K peut également phosphoryler la protéine kinase B ou AKT. MT1 couplé à une protéine Gq induit l'activation de la phospholipase C (PLC), qui va entraîner une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} par l'intermédiaire d'une augmentation de l'IP3 (inositol triphosphate) (Cecon et al., 2017; Dubocovich et al., 2010; Witt-Enderby et al., 2000). Dans les NSC, l'activation du récepteur MT1 induit l'inhibition de l'activité électrique spontanée de l'horloge par la stimulation d'un courant potassique hyperpolarisant faisant intervenir les canaux Kir3 (Jiang et al., 1995; Nelson et al., 1996). La modulation de l'activité neuronale par le récepteur MT1 peut également se faire par l'inhibition de l'entrée de Ca^{2+} via le canal voltage dépendant Cav2.2 (Cecon et al., 2017).

b) Voie de signalisation du récepteur MT2

L'activation de MT2, comme de Mel1c, entraîne l'inhibition de la guanylyl cyclase induisant une réduction du taux de guanoside monophosphate cyclique (GMPc). Cette diminution du GMPc induit une inhibition de la PKG (protéine kinase G). Cette voie n'est pas

activée par la liaison de la mélatonine sur le récepteur MT1 (Petit et al., 1999). MT2 peut également activer la voie PKC/ERK (Figure 63).

4. Pharmacologie des récepteurs mélatoninergiques

a) Généralités et définitions

L'activité des récepteurs peut être modulée par la liaison de molécules. Les agonistes pleins sont des produits dont l'action sur le récepteur est identique à celle du ligand de référence (souvent le messager naturel) et va conduire à l'activation complète d'une voie de signalisation donnée. On parle d'effet mimétique. Certains produits sont qualifiés d'agonistes partiels car ils induisent une activation submaximale du récepteur même en condition saturante. Les antagonistes sont des produits qui n'ont pas d'effet sur l'activité basale du récepteur mais qui vont s'opposer à la liaison du médiateur naturel et des agonistes en général. L'effet observé suite à cette liaison « neutre » correspond donc exclusivement à la diminution de l'effet de la liaison de l'agoniste sur son récepteur. L'agoniste inverse est un ligand qui s'oppose aux effets de l'agoniste mais qui induit également une réponse propre du récepteur (Figure 64).

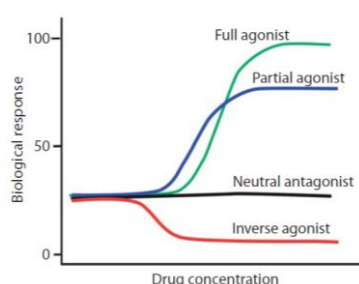


Figure 64 : Différentes actions de ligands sur un récepteur ayant une activité basale (Deupi and Kobilka, 2007).

Les agonistes pleins activent complètement le récepteur (100% de réponse biologique) alors que les agonistes partiels ne l'activent que de façon incomplète (100% > réponse biologique > activité basale). Les antagonistes ne modifient pas l'activité basale alors que les agonistes inverses induisent une diminution de cette activité.

L'affinité d'un ligand correspond à sa capacité de fixation sur son récepteur. Elle est caractérisée par la constante de dissociation (K_D) qui correspond à la concentration de ligand occupant 50 % des récepteurs. Plus la concentration d'agoniste nécessaire à l'activation du récepteur sera faible, plus l'affinité sera élevée.

b) Pharmacologies des récepteurs MT1 et MT2

Les récepteurs MT1 et MT2 ont une forte affinité de l'ordre du picomolaire pour la 2-[¹²⁵I]-mélatonine. Exprimés de manière transitoire, les récepteurs humains MT1 et MT2 ont une affinité décroissante pour les produits suivants : 2-iodomélatonine ≥ mélatonine >> N-acétylsérotinine >> sérotinine. Les récepteurs MT1 et MT2 peuvent être distingués pharmacologiquement grâce à des différences de sélectivité pour certains ligands. Le récepteur MT2 possède la même affinité pour la mélatonine, la 2-[¹²⁵I]-mélatonine, et la 6-chloromélatonine. Le récepteur MT1 a une plus forte affinité pour la 2-[¹²⁵I]-mélatonine que

pour la mélatonine et une affinité encore plus faible pour la 6-chloromélatonine (Audinot et al., 2003; Browning et al., 2000; Dubocovich et al., 1997; Masana and Dubocovich, 2001).

Dans une famille de récepteurs, un ligand est considéré comme sélectif pour un récepteur particulier quand son affinité pour ce dernier est 50-100 fois supérieure comparé aux autres. Par conséquent, les produits présentant une différence d'affinité inférieure à 50 sont considérés comme non sélectifs.

Le Rameltéon (Rozerem®) et l'Agomélatine (Valdoxan®), deux médicaments utilisés chez l'Homme, l'un comme hypnotique, l'autre comme antidépresseur sont des agonistes non sélectifs MT1/MT2 (Buoli et al., 2017; Medvedev, 2017). Le luzindole est un antagoniste qui possède une affinité légèrement plus importante pour MT2 que pour MT1 (entre 15 et 25 fois) (Figure 65). Il y a plus de produits spécifiques de MT2 que de MT1. Le 4P-PDOT, par exemple, (N-[(2S,4S)-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl]propanamide) est un antagoniste de MT2 hautement spécifique. En effet, il présente pour ce dernier une affinité de 300 à 1500 fois supérieure à celle pour MT1 (Dubocovich et al., 2010; Jockers et al., 2016; Zlotos et al., 2014).

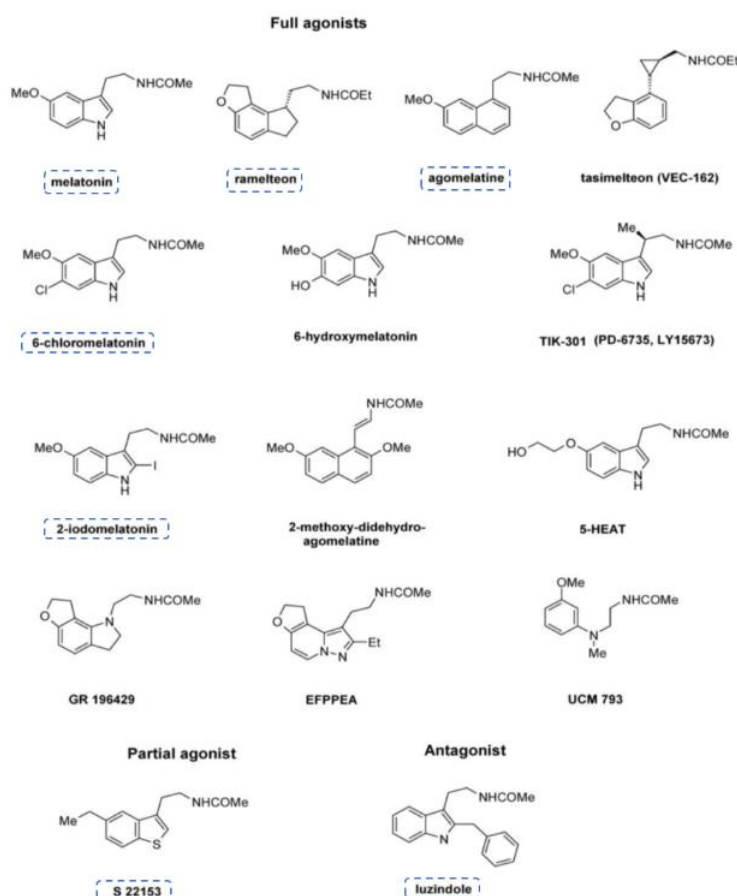


Figure 65 : Ligands non sélectifs MT1/MT2 (Jockers et al., 2016).

Les ligands encadrés font partie de la librairie utilisée dans les expériences de radioliation de cette étude. Melatonin : (5-methoxy-N-acetyltryptamine) ; Agomelatine® (S20098) : N-(2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)ethyl) acetamide; Ramelteon® (FLN68) : (S)-N-(2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno-(5,4) furan-8-yl) ethyl) propionamide; S22153 : N-[2-(5-ethylbenzothiophen-3-yl)ethyl] acetamide; Luzindole : N-acetyl-2-Br-MLT.

5. Hétérodimérisation

Des phénomènes d'homodimérisation et d'hétérodimérisation sont fréquemment observés au sein de la famille des RCPG. Les récepteurs à la mélatonine ne dérogent pas à cette règle. En effet, des homodimères et hétérodimères des récepteurs MT1 et MT2 ont été mis en évidence *in vitro*. L'expression relative des récepteurs MT1 et MT2 gouverne l'engagement de MT1 dans la formation d'homodimères ou d'hétérodimères. La formation de l'hétérodimère MT1/MT2 est plus probable que celle des homodimères MT2 (Ayoub et al., 2002, 2004). L'existence d'hétérodimères MT1/MT2 a également été mise en évidence *in vivo* dans la rétine de souris. Ainsi, Baba et ses collaborateurs ont montré que l'effet de la mélatonine sur la sensibilité des photorécepteurs se faisait par l'intermédiaire de l'hétérodimère MT1/MT2 (Baba et al., 2009, 2013; Tosini et al., 2012).

Le récepteur orphelin GPR50 a la capacité de former des homodimères ainsi que des hétérodimères soit avec les récepteurs MT1 soit avec MT2. La formation de l'hétérodimère

GPR50/MT1 a deux principaux effets, une diminution drastique de l'affinité des agonistes pour le récepteur MT1 ainsi que la perte du couplage avec la protéine G (Figure 66). La délétion de la queue C-terminale du récepteur GPR50 n'influence pas l'hétérodimérisation avec MT1 mais entraîne la suppression de l'effet inhibiteur de l'hétérodimérisation sur l'activité du récepteur MT1. L'hétérodimérisation de GPR50 avec MT2 n'affecte pas la fonction de ce dernier (Levoe et al., 2006a).

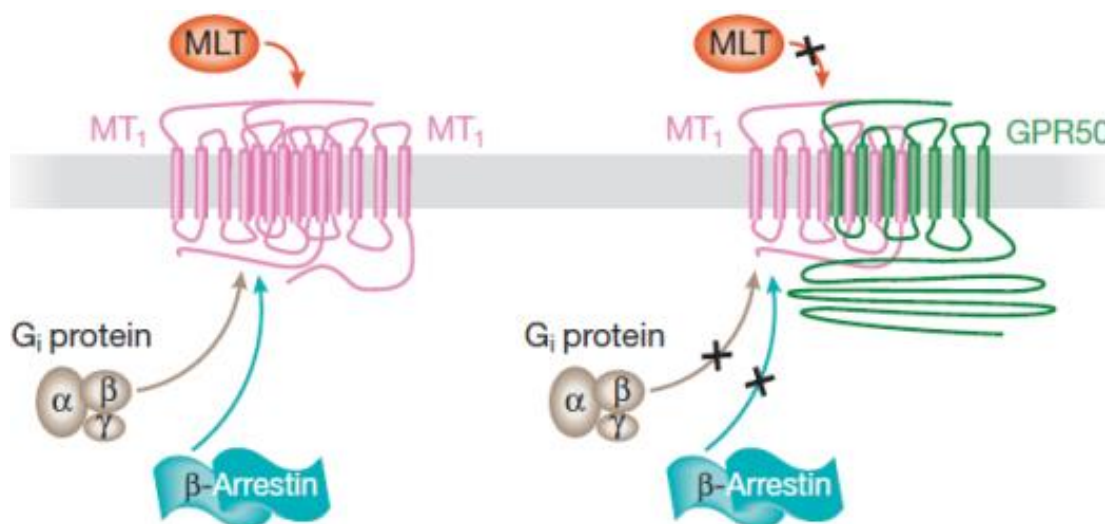


Figure 66 : Représentation schématique de l'impact de l'homodimérisation du récepteur MT1 et de son hétérodimérisation avec GPR50 sur les voies de signalisation (Levoe et al., 2006b).

La liaison de la mélatonine sur l'homodimère MT1 engendre l'augmentation du couplage à la protéine G_i inhibitrice (inhibant l'accumulation d'AMPC) et le recrutement de la β-arrestine. Au contraire, l'hétérodimérisation de MT1 avec GPR50 entraîne une perte du couplage avec la protéine G_i et du recrutement de la β-arrestine sans doute suite à un encombrement stérique dû à la queue C-terminale du récepteur GPR50.

6. Régulation des récepteurs

La régulation des récepteurs à la mélatonine contribue à la diversité des réponses physiologiques de cette hormone. Cette régulation est dépendante de plusieurs facteurs dont la mélatonine elle-même et la photopériode. La désensibilisation homologue est un mécanisme commun de régulation des récepteurs membranaires en réponse à une stimulation prolongée du ligand. Bien que toujours présent, le ligand n'induit plus le recrutement des voies de signalisation.

Ce phénomène a été observé dans la *pars tubéralis* et les NSC de rat. En effet, la suppression de mélatonine soit par pinéalectomie ou par une exposition prolongée à la lumière entraîne une augmentation de la densité des récepteurs. Une injection unique de mélatonine permet d'inverser cette augmentation (Gauer et al., 1993a). Dans la *pars tubéralis* de rats gardés en condition 12L : 12D (12 h de lumière et 12 h de nuit), la densité des récepteurs varie en fonction d'un rythme journalier avec une densité maximale pendant le jour quand le taux de mélatonine est le plus bas. Cette variation de la densité des récepteurs est abolie en absence de mélatonine.

lorsque les animaux sont gardés lumière constante (Gauer et al., 1993b). Ces expériences mettent en évidence une régulation directe de la mélatonine sur ces récepteurs grâce à un mécanisme de désensibilisation homologue. Cette régulation homologue dépend de la concentration de mélatonine (concentration physiologique (30-400 pM) ou supra physiologique (1-1000 nM) mais également du temps d'exposition (Dubocovich et al., 2010; Gerdin et al., 2004; Hazlerigg et al., 1993; Witt-Enderby et al., 2003).

Des facteurs autres que la mélatonine, comme la lumière ou la photopériode, peuvent réguler la densité des récepteurs et leurs fonctionnalités ; cette régulation est dite hétérologue. Chez les rats pinéalectomisés, la densité des récepteurs à la mélatonine dans les NSC est régulée par le cycle lumière/obscurité avec des valeurs plus élevées le jour. L'application d'un créneau lumineux pendant la nuit induit également une augmentation du niveau de leur densité (Gauer et al., 1993b). Chez le hamster d'Europe, une régulation saisonnière des récepteurs à la mélatonine est observée dans la *pars tubéralis* avec une diminution très importante en PC lors de la phase d'inactivité sexuelle (Dardente et al., 2003). De plus, pendant la phase d'hibernation du hérisson, la densité des récepteurs à la mélatonine diminue encore plus qu'en PC quand les animaux sont en hypothermie en comparaison des animaux en normothermie (Gauer et al., 1993c; Masson-Pévet and Gauer, 1994).

III. Winter is coming-Hibernation

Selon la classification de R.B Cowles, les endothermes sont des animaux dont la chaleur nécessaire au maintien d'une T_b stable (en adéquation avec les fonctions biologiques), provient exclusivement d'une activité métabolique intrinsèque importante. Les animaux qui utilisent la chaleur externe au moyen de leur comportement sont quant à eux qualifiés d'ectothermes. L'endothermie confère de nombreux avantages évolutifs ; l'affranchissement vis-à-vis des conditions environnementales a permis la colonisation de niches écologiques hostiles aux ectothermes, le développement d'un appareil locomoteur performant (en particulier chez les oiseaux) mais également la possibilité d'assurer l'ensemble des fonctions biologiques indépendamment des variations de la T_a . Mais l'endothermie a un coût : le métabolisme énergétique des endothermes est 8 fois supérieur à celui des ectothermes, qui ont des besoins alimentaires restreints [pour revue (Barré et al., 2001; Thomas, 2002)].

La classification de H. Bergmann définit les homéothermes comme des animaux dont la température reste constante grâce à un contrôle fin de la thermolyse et thermogenèse quelle que soit la T_a . Ils sont opposés aux poïkilothermes, dont la température varie en fonction de la T_a . Certains homéothermes peuvent, dans des conditions très particulières, présenter des phases d'hétérothermie, régionale ou temporelle, extrêmement contrôlées. L'hétérothermie régionale, retrouvée entre autres chez certains oiseaux permet grâce à des ajustements vasculaires (échangeurs thermiques à contre-courant) de faire varier la température des extrémités tout en conservant une température du noyau central constante. La température des extrémités prend alors une valeur proche de celle de l'environnement extérieur [pour revue (Barré et al., 2001; Thomas, 2002)].

L'hétérothermie temporelle est utilisée par les animaux afin de faire face à un environnement peu favorable. Elle est caractérisée par une période d'hypothermie couplée à un hypométabolisme. L'hibernation et la torpeur journalière sont deux exemples d'hétérothermie temporelle.

A. Hibernation et torpeur journalière : généralités

1. Définitions

De façon générale, la torpeur se caractérise par une diminution de la T_b et du métabolisme en réponse à ces conditions environnementales défavorables. Selon l'amplitude et la durée de l'état torpide, les espèces sont définies comme hibernantes ou exprimant des torpeurs journalières.

Lors de l'hibernation¹, les épisodes de torpeur sont caractérisés par une diminution drastique de la T_b (la valeur de la T_b devient proche de la température extérieure), et du métabolisme pendant plusieurs jours. Chez certaines espèces comme le hamster syrien, l'entrée en hibernation est dépendant de la photopériode et éventuellement de la T_a alors que chez les

¹ Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons exclusivement au comportement d'hibernation. Le terme torpeur sera utilisé par la suite afin de décrire, la phase d'hypométabolisme et non pas le comportement de torpeur journalière.

hibernants obligatoires, comme la marmotte, le spermophile arctique ou le hamster d'Europe, elle dépend d'une horloge circannuelle (Drew et al., 2007).

La torpeur journalière est également caractérisée par une réduction de la Tb moins importante que celle observée chez les hibernants vrais. Les épisodes de torpeur ne durent que quelques heures pendant la période journalière de repos, permettant ainsi aux individus de chercher de la nourriture et de conserver des activités sociales et territoriales (Geiser, 2011a; Wang and Lee, 2011). Cette réponse adaptative est induite par un environnement défavorable comme des températures inadaptées (froides ou chaudes), une photopériode courte, ou une diminution de la disponibilité en nourriture.

Alors que la réduction du métabolisme lors de l'hibernation permet de réduire les dépenses énergétique de pratiquement 90% (Heldmaier et al., 2004), le gain énergétique est beaucoup plus modeste chez les animaux présentant des torpeurs journalières. Ces deux comportements de torpeurs sont largement trouvés au sein des mammifères, comme par exemple au sein du taxon des primates, monotrèmes et rongeurs (Figure 67).

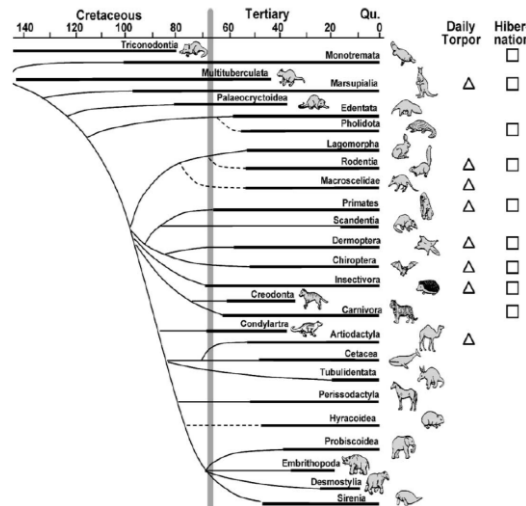


Figure 67 : Les comportements d'hibernation et de torpeur journalière sont observés dans de nombreuses espèces de mammifères (Heldmaier et al., 2004).

De nombreuses espèces d'oiseaux torpides ont également été recensées mais une seule espèce hibernante (engoulevent de Nuttall). L'hibernation et la torpeur journalière s'observent dans toutes les régions du monde, des déserts chauds à la forêt amazonienne en passant par les régions polaires. Ces traits comportementaux ont été conservés au cours de l'évolution et semblent donc être hérités de l'ancêtre commun des vertébrés (Heldmaier et al., 2004). Les études de Geiser et Turbill (Geiser and Turbill, 2009) suggèrent que les mammifères hibernants ont une chance accrue de survivre aux extinctions.

2. Différentes phases du cycle d'hibernation

La physiologie saisonnière de l'hibernation est actuellement présentée comme un phénomène à deux cycles (Figure 68) (Grabek et al., 2015; Hampton and Andrews, 2007; Serkova et al., 2007).

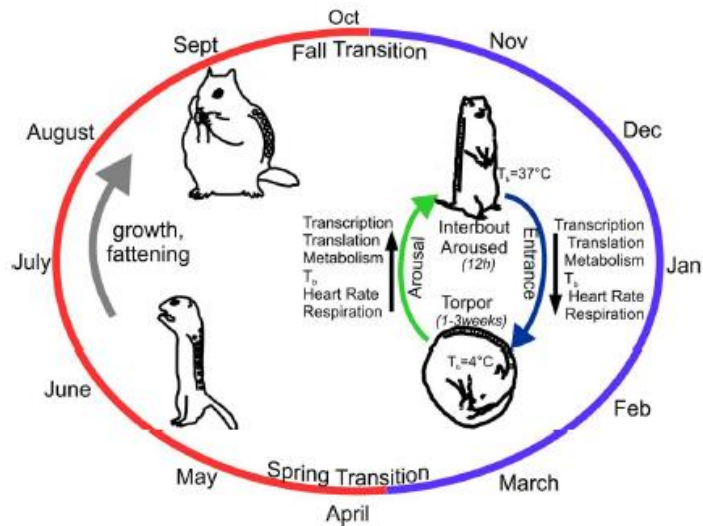


Figure 68 : Modèle à deux cycles (Grabek et al., 2015).

Durant le printemps et l'été, les hibernants se reproduisent, se développent et se préparent pour l'hiver (demi-cercle rouge). Tout au long de cette période, les animaux ne présentent aucune phase d'hétérothermie à la différence de la période d'hibernation (demi-cercle bleu). Durant toute cette période, l'hibernant va alterner entre périodes d'homéothermie et d'hétérothermie.

Le premier cycle saisonnier dépend d'une horloge circannuelle et de facteurs environnementaux avec une phase d'homéothermie obligatoire (printemps/été) et une phase permissive d'hibernation avec des états d'hypothermie (automne/hiver) et de réveil. Les deuxièmes cycles ont lieu pendant la période d'hibernation et correspondent à une succession de périodes d'hypothermie (torpeur) et de normothermie (activité inter-torpeur ou *inter bout activity*) (Figure 69).

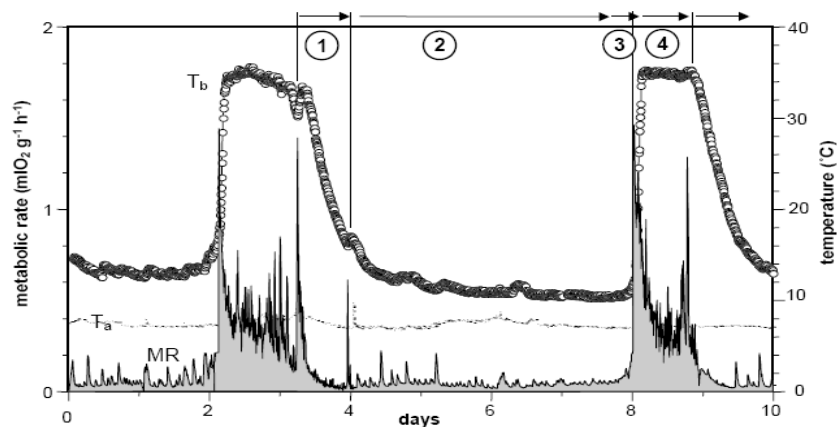


Figure 69 : Graphique représentant les variations du métabolisme et de la température corporelle au cours des différentes phases de l'hibernation de la marmotte Alpine (*Marmota marmota*) (Heldmaier et al., 2004).

Les variations du métabolisme (consommation d'oxygène) et de la température corporelle sont le reflet des différentes phases de torpeur. Il existe quatre phases successives : l'entrée en torpeur (1), la période de torpeur (2), l'éveil (3) et la normothermie (4). MR : taux métabolique ; Ta : température ambiante ; Tb : température corporelle.

L'entrée en hibernation est caractérisée par une diminution rapide et drastique de la Tb et du métabolisme. Elle est suivie par une phase de torpeur durant laquelle la Tb et le métabolisme restent bas pendant plusieurs jours (au minimum 24 heures). Durant cette période, toutes les grandes fonctions comme la ventilation, l'activité cardiaque mais aussi la synthèse de macromolécules sont extrêmement ralenties. De façon remarquable, pendant la phase de torpeur, la Tb reste toujours régulée par rapport à une température consigne ajustée à une valeur très inférieure à celle existant en normothermie. Lorsque la Tb descend en dessous de cette valeur consigne, des mécanismes de régulation provenant de l'aire préoptique de l'hypothalamus engendrent des réponses adaptatives permettant la thermogenèse et le maintien à une Tb basse mais constante. Cette diminution de la valeur-consigne permet une diminution contrôlée de la Tb (Buck and Barnes, 2000; Drew et al., 2007; Heller et al., 1977). Pendant la phase d'éveil, la température et le métabolisme augmentent très rapidement, en quelques heures, pour recouvrer des valeurs initiales. Cette phase de normothermie dure un ou deux jours.

Ces quatre phases vont se répéter tout au long de la saison d'hibernation mais la durée de la phase de torpeur sera de plus en plus longue, passant d'un ou deux jours au début à une quinzaine de jours au milieu de l'hiver. Les périodes de réveil ont un coût énergétique très important avec en moyenne 72% des ressources allouées à la période d'hibernation utilisées pendant ces phases. Néanmoins les phases de normothermie intermittentes sont toujours conservées car elles pourraient avoir un rôle dans la reconstitution des réserves énergétiques mais également dans l'élimination des déchets. Chez les animaux stockant l'énergie sous forme de graines conservées dans l'hibernacle, cette période de réveil permet la prise de nourriture (Geiser, 2011a; Heldmaier et al., 1993, 2004).

3. Contrôle temporel des cycles de torpeur et de normothermie : un rôle des gènes horloge ?

Les mécanismes contrôlant les différentes phases de l'hibernation ne sont pas élucidés. Un rôle de l'horloge circadienne dans le phénomène d'entrée/sortie de torpeur pendant la phase d'hibernation a longtemps été débattue (Heller and Ruby, 2004; Ruby, 2003). En 2007, Revel et ses collaborateurs ont rapporté que l'horloge circadienne des NSC était arrêtée et ne délivrait plus de signaux rythmiques pendant la phase de torpeur. Alors que les gènes *Per1*, *Per2* et *Bmal1* sont exprimés de manière circadienne pendant la phase de normothermie, leur cycle d'expression s'arrête pendant la période de torpeur avec des niveaux d'ARN constamment élevé pour *Per1*, bas pour *Per2* et intermédiaire pour *Bmal1* (Figure 70). Le rythme d'expression de l'AA-NAT dans la glande pinéale, qui reflète l'activité des NSC, est également aboli avec des niveaux élevés quelle que soit la période de la journée. Par contre le taux plasmatique de mélatonine reste constamment bas sans variation circadienne, indiquant un possible découplage entre les ARNm et l'activité protéique de l'AA-NAT pendant l'hibernation. Des résultats similaires ont aussi été observés chez l'écureuil arctique *Urocyon parryi* (Ikeno et al., 2017). L'ensemble de ces observations suggère que l'horloge circadienne des NSC, bien que thermo-compensée, s'arrête de fonctionner pendant les phases de torpeur et ne serait pas nécessaire pour induire les phases d'éveil.

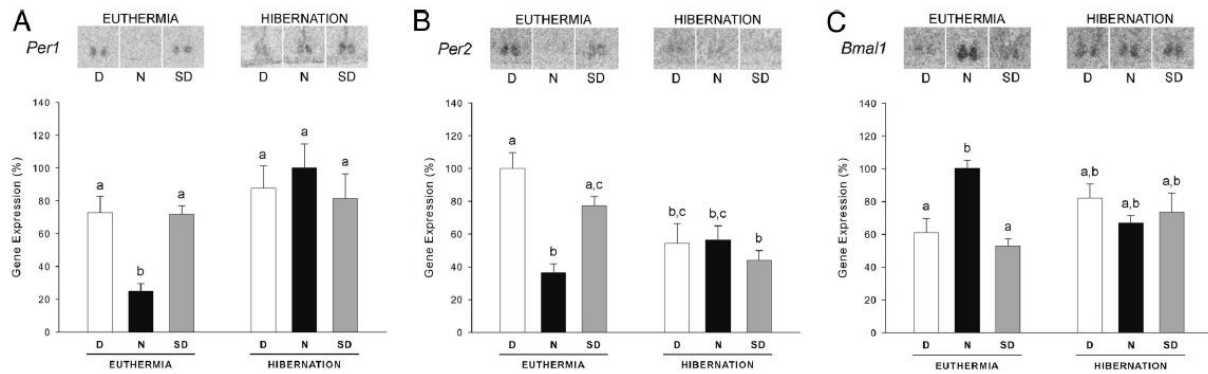


Figure 70 : Expression journalière des gènes horloges *Per1*, *Per2* et *Bmal1* analysée par hybridation in situ dans les NSC de hamsters d'Europe pendant les phases d'hibernation ou d'euthermie (Revel et al., 2007b).

Les données mesurées durant la journée (D), la nuit (N), et le jour subjectif (SD) sont représentées en pourcentage de la valeur maximale (moyenne $\pm$ SEM). Les valeurs des histogrammes annotées avec des lettres différentes sont significativement différentes.

B. Régulations endocrines, métaboliques et génétique de l'hibernation

Les phénomènes contrôlant le processus d'hibernation sont complexes et restent encore méconnus. De profondes modifications physiologiques sont mises en place durant cette période et différentes approches ont été utilisées pour comprendre le rôle des hormones, du métabolisme ou de l'expression spécifiques des gènes.

1. Contrôle endocrine de l'hibernation

Le rôle des hormones dans le processus d'hibernation n'est pas complètement élucidé d'autant plus qu'elles pourraient avoir des effets dépendants des espèces. Dans le paragraphe suivant, le rôle de quelques hormones dont l'implication a pu être démontrée chez le hamster sera discuté.

a) Rôle des stéroïdes sexuels

Chez les espèces hibernantes, la reproduction et l'hibernation sont des processus intimement liés mais mutuellement exclusifs. Chez le hamster d'Europe, la diminution de la photopériode induit une régression gonadique et une diminution du taux circulant des hormones sexuelles, en particulier la testostérone. Une réduction de cette dernière est nécessaire pour l'entrée en hibernation (Masson-Pévet et al., 1987; Pévet et al., 1987, 2004).

Des changements au niveau de l'innervation vasopressinergique centrale, en particulier dans le septum latéral, sont observés suite à la régression testiculaire et à la diminution de testostérone. Le septum latéral est une structure qui est, entre autres, impliquée dans le contrôle du point de consigne de la température. Cette perte d'innervation pourrait permettre à l'animal pendant l'hibernation de diminuer sa température corporelle en dessous du point de consigne. L'entrée et le maintien de l'hibernation ne sont possibles que lorsque le taux de vasopressine

est faible. En effet, une infusion de vasopressine dans le septum latéral de hamster prévient les épisodes d'hypothermie (Hermes et al., 1989, 1993; Pévet et al., 2004).

Ces éléments mettent en évidence un rôle indirect de la photopériode, impliquant les hormones sexuelles, sur la régulation de l'hibernation.

b) Rôle de la mélatonine

Le rôle précis de la mélatonine dans l'hibernation n'a pas encore été clairement établi. La mélatonine, grâce à son rôle de messenger photopériodique, permet l'induction du phénotype de PC nécessaire au processus d'hibernation, mais elle pourrait être directement impliquée dans les différentes phases.

En 1987, Stanton et ses collaborateurs ont montré qu'une infusion centrale de mélatonine permettait de prolonger la durée de la phase de torpeur chez le spermophile arctique (Stanton et al., 1987). Chez le hamster syrien en PC, l'injection continue au niveau périphérique d'un antagoniste² à la mélatonine (S22153) diminue la durée totale d'hibernation (diminution du nombre d'accès de torpeur et de leur durée) et bloque l'augmentation de la masse de BAT normalement observée en PC (Bartness and Wade, 1984; Pitrosky et al., 2003). Ces deux études suggèrent que la mélatonine régule la durée des phases de torpeur.

c) Rôle de la leptine

L'implication de la leptine dans les adaptations métaboliques liées à l'hibernation a été principalement décrite chez les espèces « fat-storing ». Cette adipokine circulante est produite et sécrétée par le tissu adipeux blanc proportionnellement à la masse grasseuse corporelle. Elle agit principalement par l'intermédiaire de ses récepteurs (ObR) exprimés dans l'hypothalamus (Baskin et al., 1999; Schwartz et al., 2000). Un taux important de leptine (reflet d'une masse grasse importante) favorise les dépenses énergétiques et inhibe la prise alimentaire (Friedman and Halaas, 1998). Chez les espèces « fat-storing » comme la marmotte (*Marmota monax*), le taux de leptine augmente avec la prise de masse corporelle lors de la phase pré-hibernatoire (Concannon et al., 2001; Florant et al., 2004). Mais de manière surprenante, chez la chauve-souris (*Myotis lucifugus*), la sécrétion de leptine est observée avant l'augmentation de la masse grasseuse mais n'induit ni d'augmentation de la dépense énergétique ni une réduction de la prise alimentaire. Ces éléments laissent penser que la sécrétion de leptine pourrait être dissociée de la masse grasseuse durant l'hibernation (Kronfeld-Schor et al., 2000). Cette dissociation pourrait permettre l'état hyperphagique pré-hibernatoire malgré l'accumulation importante de graisse.

Chez le hamster sibérien, une diminution de la photopériode liée à la période hivernale entraîne une réduction de la masse corporelle. Une injection de leptine permet de prévenir l'entrée en torpeur journalière. Pourtant, le taux de leptine circulant ne diffère pas entre les hamsters

² Il est important de noter qu'une récente étude suggère que le S22153 pourrait ne pas être un antagoniste plein mais plutôt un agoniste partiel (Legros et al, in press).

torpides et les hamsters normothermique suggérant que la réduction chronique du taux de leptine est un facteur permissif pas suffisant pour l'entrée en torpeur (Freeman et al., 2004).

d) Rôle des hormones thyroïdiennes

Largement impliquées pendant le développement et la croissance, les TH ont un rôle prépondérant dans un grand nombre de fonctions biologiques chez l'adulte. Au niveau périphérique, T3 est particulièrement impliquée dans le métabolisme et dans l'activation de la thermogenèse (cet aspect sera détaillé dans la partie : Contrôle central et périphérique de la thermogenèse III.B.2.b)i). Comme nous l'avons décrit précédemment, le rôle des TH au niveau central est majeur dans le contrôle des fonctions saisonnières.

La diminution de la disponibilité en TH dans l'hypothalamus est un élément clé dans la mise en place d'un phénotype PC chez le hamster sibérien (Barrett et al., 2007a). Des micro implants délivrant l'hormone T3 dans l'hypothalamus du hamster sibérien induisent une augmentation de la prise alimentaire, une prise de poids, une augmentation de la graisse corporelle et de la taille testiculaire reflet d'un phénotype de PL (Murphy et al., 2012). Le jeûne induit également des modifications de l'expression hypothalamique des déiodinases. Chez des animaux en PC, la diminution de Dio2 habituellement observée, est partiellement inversée par jeûne de 48 heures, favorisant ainsi la synthèse de T3 (Herwig et al., 2009).

Le rôle des TH dans l'hibernation a été mis en évidence dans un nombre réduit d'études. Murphy et ses collaborateurs ont montré que des implants délivrant de la T3 placés dans l'hypothalamus de hamsters sibériens en PC entraînent une augmentation du poids corporel et une diminution drastique du nombre d'épisodes de torpeur (Murphy et al., 2012). De la même manière, une injection intrapéritonéale d'un dérivé naturel des TH, le 3-iodothyronamine (T1AM), induit une hypothermie chez la souris et le hamster sibérien (Scanlan, 2009). Finalement, Bank et ses collaborateurs ont montré que chez des hamsters sibériens en PC, un taux faible de T3 dans le sérum induit une augmentation du nombre d'accès de torpeur (Bank et al., 2015a).

L'ensemble de ces éléments sont en faveur d'un rôle important des TH dans le contrôle de l'hibernation mais les mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés.

2. Adaptations métaboliques et thermiques

a) Adaptations métaboliques

i. Différentes stratégies de stockage énergétique chez les hibernants

Lors des épisodes de torpeur, l'ensemble des fonctions physiologiques et le métabolisme cellulaire sont drastiquement réduits afin de limiter la dépense énergétique. Mais une consommation minimale d'énergie est indispensable à la survie de l'animal et pour répondre aux besoins énergétiques lors des phases d'éveil. Deux systèmes de stockage de l'énergie ont été décrits, chez les espèces « fat-storing » l'énergie est stockée sous forme de graisse corporelle, alors que les espèces « food-storing » stockent l'énergie sous forme de nourriture accumulée dans l'hibernacle.

Les espèces « fat-storing », comme la marmotte ou le spermophile arctique, accumulent une quantité importante de graisse pendant la période pré-hibernatoire, en dépit des signaux adipocytaires inhibiteurs. L'hydrolyse des lipides (en glycérol et acides gras) contenus dans la graisse blanche devient l'unique source d'énergie pour toute la période hivernale.

Les espèces « food-storing », comme le hamster d'Europe, accumulent de la nourriture dans leur terrier afin de pouvoir survivre à toute la période hivernale. La période de pré-hibernation est caractérisée par une diminution de la masse corporelle, qui continue tout au long des mois d'hibernation (Figure 26). Pendant les épisodes de normothermie, ils se nourrissent sans quitter leur terrier.

Ces deux stratégies induisent des modifications métaboliques différentes. Chez les espèces « food-storing », l'appareil digestif doit être maintenu fonctionnel pendant toute la durée de l'hibernation alors que chez les espèces « fat storing » une régression est observée (Humphries et al., 2001; Weitten et al., 2016). Dans les deux cas, l'hibernation peut être considérée comme une période de jeûne, de quelques jours chez les espèces « food-storing » à quelques mois chez les espèces « fat-storing ». Alors qu'en conditions normothermiques, la source majeure d'énergie est fournie par les glucides, elle provient principalement des lipides pendant l'hibernation. Ce phénomène, communément appelé « switch glucides/lipides », a été mis en évidence grâce à la mesure du quotient respiratoire (QR) qui correspond au ratio du volume de dioxyde de carbone produit par le volume d'oxygène consommé. Le QR est un indicateur fiable du substrat consommé, une valeur égale à 1 indique une utilisation majoritaire de carbohydrates alors qu'un QR inférieur à 0,7 indique une utilisation majoritaire de lipides. Il a été montré que lors de phases de torpeur, le QR est d'environ 0,7 mettant en évidence que les acides gras sont la principale source d'énergie alors que durant les périodes de réveils, le QR est compris entre 0,8 et 1 indiquant une utilisation des réserves en glucides stockées dans le foie et le muscle. Néanmoins une autre hypothèse suggère que l'augmentation du QR serait due à l'hyperventilation caractéristique de la période de réveil (Carey et al., 2003).

ii. Adaptation au jeûne - Shift glucides/lipides

L'arrêt de la prise de nutriments entraîne un grand nombre d'adaptations physiologiques pour lesquelles un modèle simplifié (excluant le métabolisme des protéines musculaires) sera présenté ici.

D'un point de vue hormonal, le pancréas réduit la sécrétion d'insuline et augmenter celle du glucagon. La diminution du rapport insuline/glucagon va induire, au niveau hépatique, les réactions cataboliques dont la finalité est d'engager les ressources stockées (glycogène hépatique et TG stockés dans la graisse). L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans, qui diffuse dans le sang afin d'atteindre ses tissus cibles (foie, tissu adipeux, muscle). Elle favorise le stockage des nutriments grâce à son action glycogénique, lipogénique et protéinogénique. Le glucagon est une hormone du jeûne sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans, qui est véhiculée par le sang jusqu'au foie, son tissu cible. Lors d'un jeûne, le glucagon stimule la production de glucose au niveau hépatique par

l'intermédiaire des voies de néoglucogenèse³ et glycogénolyse⁴. Seules les cellules glucodépendantes et le cerveau vont utiliser le glucose ainsi libéré. Les acides gras (AG) provenant de la lipolyse des TG sont transformés par le foie en corps cétoniques (Figure 71).

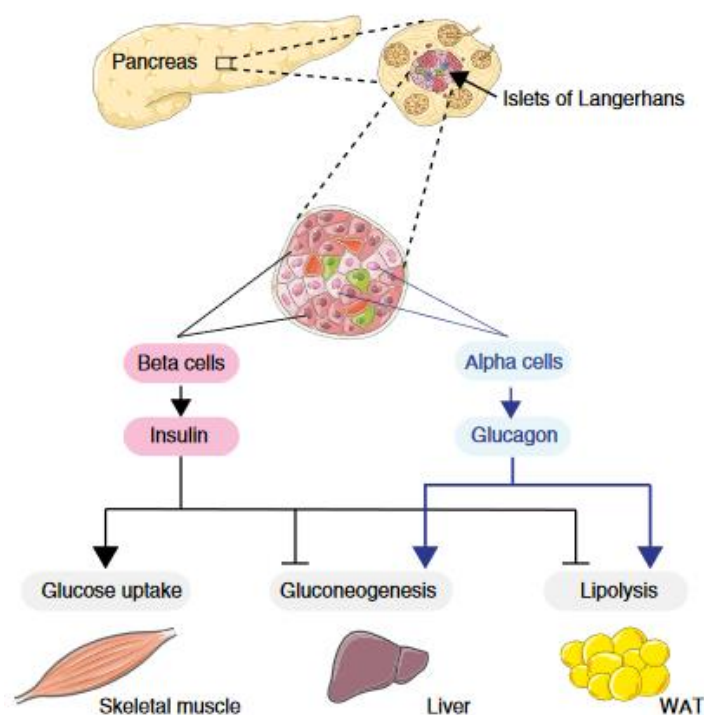


Figure 71 : Implication des hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon dans le métabolisme du glucose (Ruud et al., 2017).

L'insuline et le glucagon agissent de manière antagoniste dans le contrôle du métabolisme du glucose dans les organes périphériques. L'insuline favorise l'absorption du glucose par le muscle squelettique et inhibe la production du glucose hépatique en inhibant la lipolyse. Le glucagon a un rôle hyperglycémiant en favorisant la gluconéogenèse et la lipolyse.

Quelques heures après la dernière prise de nourriture, quand le taux de glucose sanguin diminue, la dégradation du glycogène hépatique (polymère de glucose) permet de fournir rapidement du glucose (Figure 72). Mais le stock de glycogène hépatique est limité et si le jeûne se poursuit, la dégradation des molécules non glucidiques comme le lactate et le glycérol devient la source principale de glucose (Rui, 2014).

Les TG constituent la plus grande réserve énergétique de l'organisme. Stockés dans le tissu adipeux blanc (WAT), ils vont être catabolisés en AG et glycérol (lipolyse) puis libérés dans la circulation sanguine (Lass et al., 2011). Dans le foie, le glycérol est directement converti en glucose alors que les AG sont métabolisés en corps cétoniques : β -hydroxybutyrate et acétoacetate (cétogenèse). Ces derniers sont, avec le glucose, l'unique source d'énergie du cerveau (Cahill, 2006). La β -oxydation des AG a un bilan en ATP élevé.

³ Néoglucogenèse ou gluconéogenèse : synthèse de glucose à partir de molécules organiques.

⁴ Glycogénolyse : dégradation du glycogène (polymère de glucose).

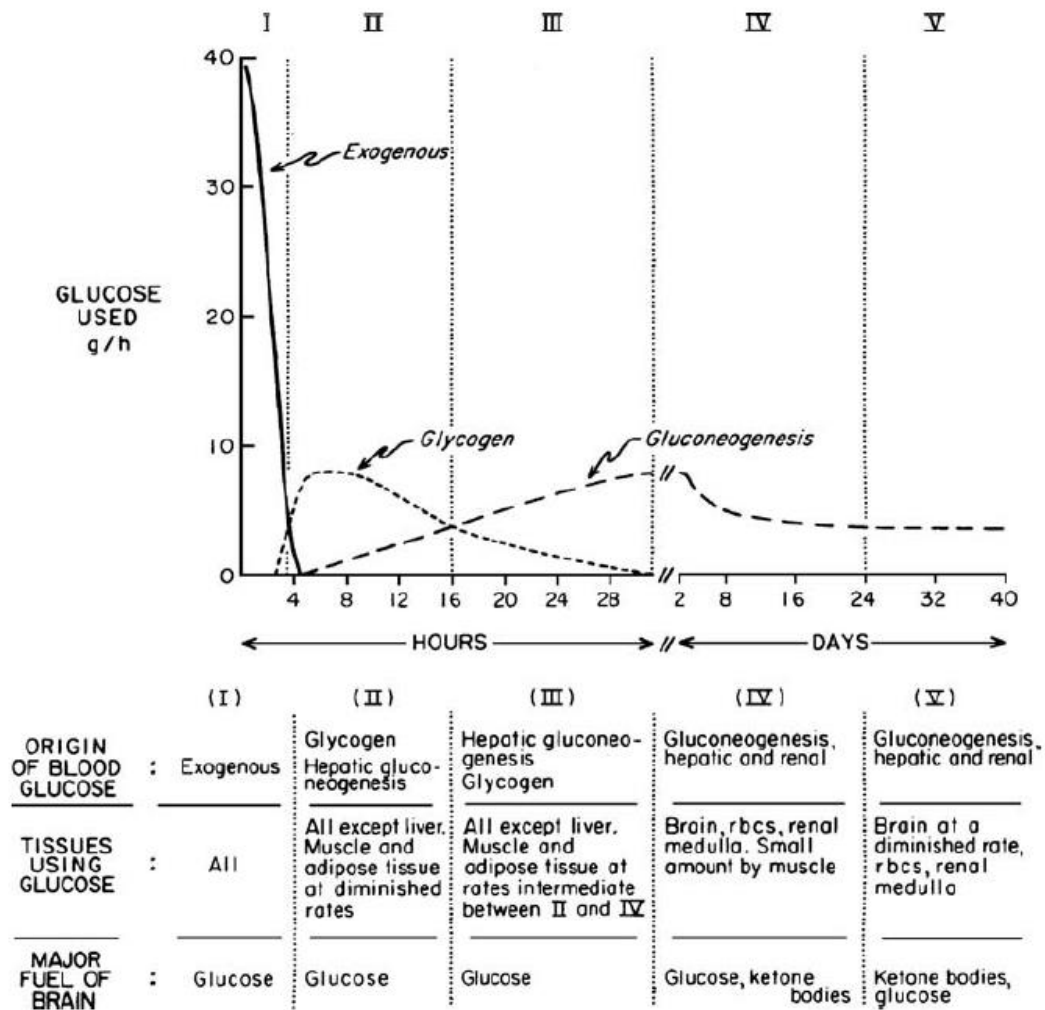


Figure 72 : Représentation schématique des différentes étapes métaboliques de l'état post prandial (I) au jeûne prolongé (V) (Cahill, 2006).

La Figure 73 présente un bilan simplifié des éléments décrit ci-dessus.

	Etat nourri	Jeûne
Foie	↑ synthèse du cholestérol, du glycogène	↑ gluconéogenèse, glycogénolyse
Pancréas	↑ sécrétion d'insuline	↑ sécrétion du glucagon
Graisse	↑ lipogenèse	↑ catabolisme des lipides
Muscle	↑ synthèse des acide gras et métabolisme glycolytique	↑ métabolisme oxydatif

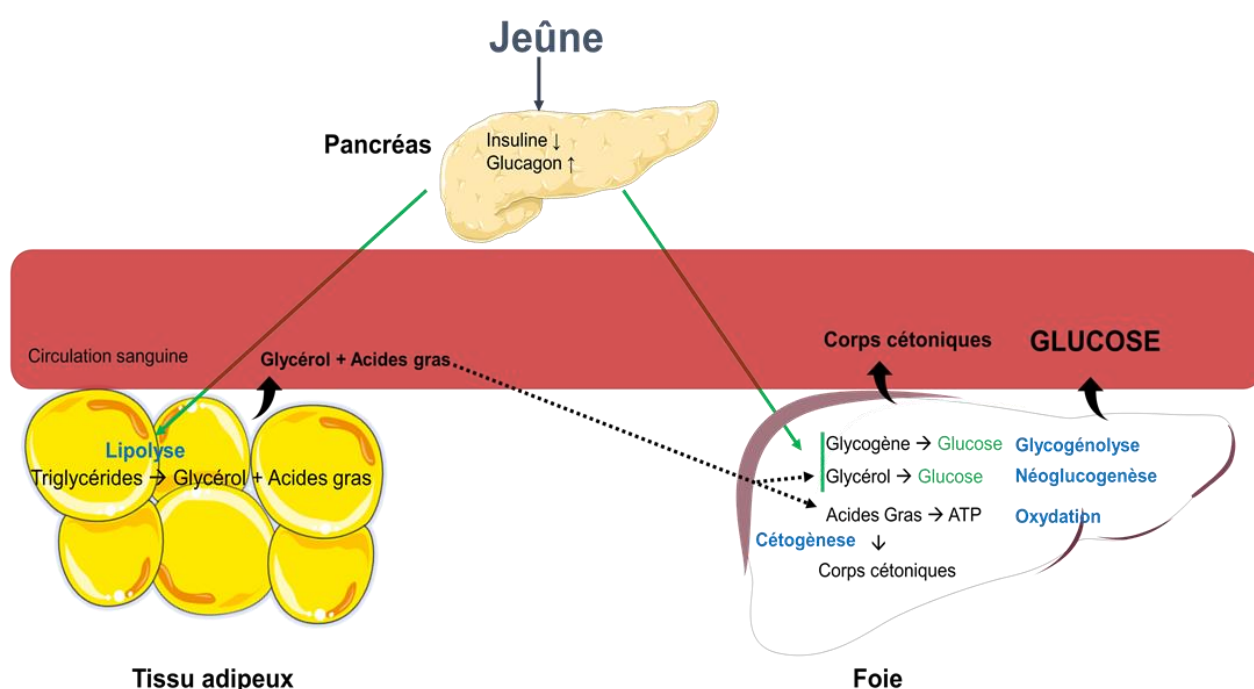


Figure 73 : Régulations métaboliques en fonction des états nourri et de jeûne dans différents organes d'après (Patterson et al., 2015) et bilan simplifié des adaptations métaboliques liées au jeûne .

iii. Facteurs de régulation

Le switch glucides/lipides est particulièrement régulé pendant les cycles torpeur/éveil en période d'hibernation (Buck and Barnes, 2000). SIRT1 favorise la gluconéogenèse hépatique en activant la déacétylation de PGC-1 α (Herzig et al., 2001; Rodgers et al., 2005) et réduit également l'adipogenèse en inhibant PPAR- γ , un important facteur de transcription adipogénique (Picard et al., 2004). Chez la souris en période jeûne, le taux de NAD⁺ augmente induisant l'activité de déacétylation de SIRT1 (Hayashida et al., 2010). PPAR α est un acteur majeur de la gestion des réserves énergétiques pendant le jeûne. Il favorise l'oxydation des acides gras dans le foie grâce à la régulation de l'expression de gènes du métabolisme (Kersten et al., 1999). FGF21 (fibroblast growth factor 21) contrôlé par PPAR α , joue un rôle majeur dans l'adaptation au jeûne en favorisant la lipolyse dans le WAT, la cétogenèse dans le foie et finalement la torpeur chez la souris (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007).

TXNIP, un régulateur négatif de la thioredoxine (Nishiyama et al., 1999), est impliqué dans l'homéostasie énergétique du MBH (Blouet and Schwartz, 2011) et la régulation hépatique de la gluconéogenèse (Chutkow et al., 2008). TXNIP est régulé positivement durant la torpeur journalière du hamster sibérien mais également pendant l'hibernation chez le spermophile arctique (Hand et al., 2013; Schwartz et al., 2013).

b) Thermorégulation

i. Contrôle central et périphérique de la thermogénèse

Deux types de thermogénèse, obligatoire et facultative (ou adaptative) peuvent être décrits. Le premier résulte de l'activité métabolique de l'ensemble des cellules, correspondant principalement au métabolisme de base tandis que le second correspond à la chaleur produite suite à une exposition au froid. Il existe deux composantes à la thermogénèse adaptative, la thermogénèse avec ou sans frisson. La thermogénèse sans frisson s'observe chez tous les mammifères pendant la période néo-natale et plus largement chez les animaux de petites tailles. Elle implique l'activité du BAT un tissu trouvé exclusivement chez les mammifères. Chez l'Homme, ce tissu a un rôle très important dans la survie des nouveaux nés mais disparaîtrait à l'âge adulte (Cannon and Nedergaard, 2004; Lasar et al., 2018). Il est conservé à l'âge adulte chez les animaux de petites tailles, principalement localisé autour des organes vitaux. Au niveau cellulaire, la thermogénèse sans frisson résulte d'un découplage de la respiration mitochondriale par la protéine UCP1 (UnCoupling Protein 1) dans le BAT. Le rôle de cette protéine est d'annuler le gradient de protons de la chaîne respiratoire (Brondani et al., 2012).

La thermogénèse sans frisson dans le BAT est sous le contrôle de l'hypothalamus par l'intermédiaire du système nerveux sympathique (SNS) via la libération de NE (Norépinéphrine). Cette dernière se lie principalement aux récepteurs adrénergiques β_3 (β_3 -AR) induisant l'augmentation du taux d'AMPc, l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de la lipase hormono-sensible (HSL). Cette cascade d'activation intracellulaire permet la transcription d'UCP1 et l'hydrolyse des TG. Les acides gras libres importés dans la mitochondrie par la carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a), vont être oxydés, permettant la production de chaleur grâce à l'action découplante d'UCP1. Par ailleurs, une exposition au froid induit une importante augmentation de l'expression de Dio2 dans le BAT, permettant une augmentation du taux de T3 (de Jesus et al., 2001) qui via une action sur les TR être essentielle au maintien du signal provenant du SNS (Figure 74). En effet, l'induction d'UCP1 est 20 fois plus importante quand le signal noradrénergique est couplé au signal provenant des TH (López et al., 2013; Mullur et al., 2014).

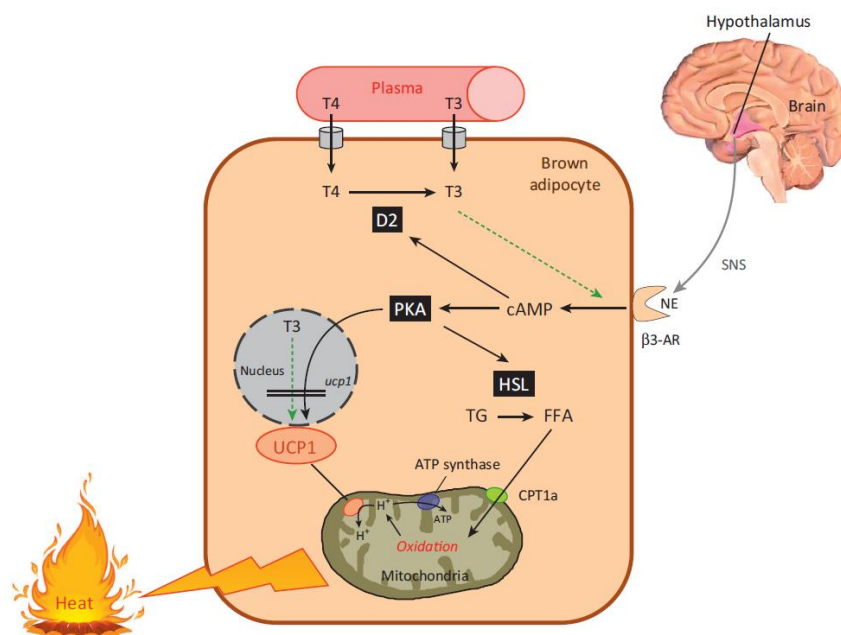


Figure 74 : Régulation de la thermogenèse dans le BAT par la NE et les TH (López et al., 2013).

De nombreux facteurs peuvent induire l'expression du gène *ucp1* dans le BAT en se liant à sa région « enhancer » notamment les TH, les PPAR et PGC-1 α (Figure 75). Parmi ces facteurs, on retrouve les TH mais également les PPAR. PGC-1 α est induit dans le BAT lorsque des souris sont exposées au froid ce qui entraîne une augmentation de l'expression d'*ucp1* (Puigserver and Spiegelman, 2003; Puigserver et al., 1998).

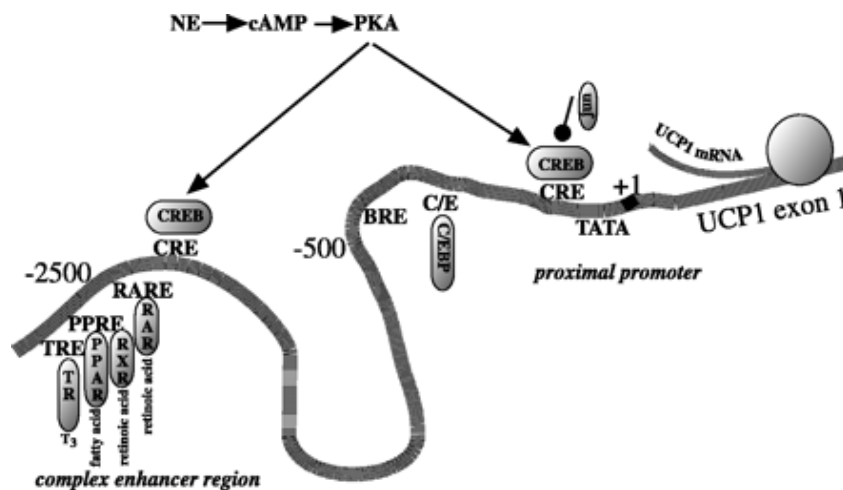


Figure 75 : Représentation schématique des facteurs contrôlant l'expression du gène *ucp1* (Cannon and Nedergaard, 2004).

Deux régions régulatrices contrôlent l'expression du gène *ucp1* : le promoteur proximal et une région plus distale « enhancer ». Le promoteur proximal contient en plus des éléments basaux du promoteur, un site CRE (cAMP response element), deux sites C/EBP (C/E), mais également d'autres sites dont l'un pourrait être spécifique au BAT (BRE). La région enhancer est composée de nombreux éléments de réponses dont CRE, Retinoic acid response elements (RARE), PPAR response elements (PPRE) sur lequel peuvent se lier PPAR α et PPAR γ . Les éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes (TRE) sont également retrouvés. RXR : Retinoic X receptor ; RAR : Retinoic acid receptor.

López et ses collaborateurs ont montré le rôle central des TH dans la thermogénèse sans frisson (Figure 76). Ainsi, l'administration centrale de T3 entraîne une diminution de l'AMPK dans le VMH, permettant l'activation des enzymes clés de la lipogenèse *de novo* dans le VMH. L'augmentation du malonyl-CoA et des lipides complexes est associée à une activation du système nerveux sympathique engendrant une augmentation de l'activité du BAT (López et al., 2010). Cette activation se traduit par une augmentation de l'expression des gènes codant pour UCP1 et de PGC1α et par conséquent de production de chaleur.

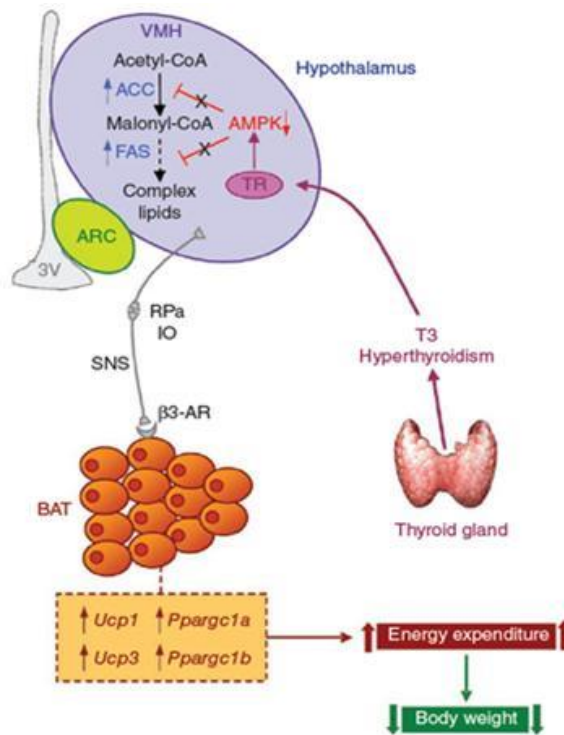


Figure 76 : Action centrale de l'hormone thyroïdienne T3 dans la thermogénèse (López et al., 2010).

ACC: Acetyl-CoA Carboxylase; FAS: Fatty acid Synthase; RPa: Raphe Pallidus; IO: Inferior Olive nuclei; *Pparg1a* code pour PGC1α et *Pparg1b* code pour PGC1β.

ii. Régulation de la température corporelle chez les hibernants

La diminution de la température corporelle observée pendant l'hibernation est un mécanisme finement contrôlé. En effet, il a été montré chez la marmotte (*Marmota flaviventris*) que les processus de thermorégulation restaient fonctionnels. La réduction drastique de la température corporelle serait rendue possible par un abaissement du point de consigne. La Tb sera donc régulée en fonction de ce nouveau point de consigne (Florant and Heller, 1977; Florant et al., 1978).

Le BAT joue un rôle majeur durant le processus d'hibernation particulièrement pendant la phase de réveil [pour revue (Cannon and Nedergaard, 2004)]. Néanmoins, des mécanismes de thermogénèse n'impliquant pas la BAT doivent également intervenir en particulier chez les monotrèmes hibernants qui en sont dépourvus (Carey et al., 2003).

3. Variation de l'expression génique

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit ont permis de déterminer l'identité et le niveau d'expression d'ARNm impliqués dans les différentes phases de l'hibernation. Une récente étude réalisée dans le BAT de spermophile arctique pendant différentes phases de l'hibernation a mis en évidence des variations d'expression du gène codant pour la protéine découplante UCP1. De manière relativement inattendue, aucune différence d'expression de cet ARNm ne fut observée entre les états de torpeur et de réveil. Par contre, les auteurs ont mis en évidence d'une forte augmentation de ce gène durant la torpeur et le réveil comparés à l'état actif printanier (Figure 77) (Hampton et al., 2013).

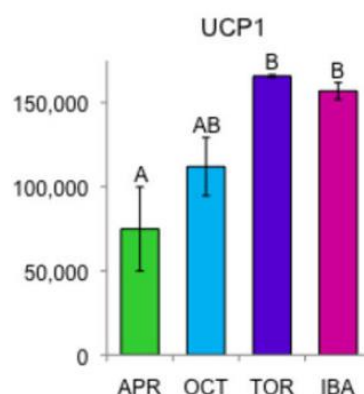


Figure 77 : Variation du gène UCP1 dans le BAT de spermophile arctique à différentes périodes de l'année (Hampton et al., 2013).

Les quatre points de collections correspondent à des animaux actifs : avril (APR) et octobre (OCT) et des animaux hibernants : en torpeur (TOR) et en période normothermique entre deux accès de torpeur (IBA). Les barres d'erreurs représentent l'écart types de la moyenne. Les points de collections n'ayant pas de lettre en commun sont significativement différents.

Dans l'hypothalamus de hamster sibérien entrant en torpeur, environ 1% des 27 830 gènes identifiés ont été trouvés différentiellement exprimés, principalement dans les fonctions métaboliques et cellulaires. Ce faible pourcentage met en évidence que le niveau d'expression de la majorité des gènes dans l'hypothalamus ne semble pas varier pendant la torpeur. Les gènes codant pour les facteurs de transcription font partie des 20 gènes les plus régulés négativement. La suppression générale de la synthèse protéique pendant l'état torpide pourrait être donc due à une régulation négative des gènes codant pour les facteurs de transcription (Cubuk et al., 2017a). Dans ce même tissu, une autre étude a permis de mettre en évidence une diminution de *Dio2* pendant la torpeur, ce résultat est en cohérence avec une diminution locale de T3 dans l'hypothalamus (Cubuk et al., 2017b).

L'hypothalamus et le cortex cérébral du spermophile arctique mettent en œuvre des stratégies très différentes pendant l'hibernation. En effet, seulement 20% de gènes exprimés différentiellement lors de l'hibernation sont communs à ces deux structures cérébrales. Dans l'hypothalamus, les gènes régulés positivement sont impliqués dans les voies de signalisation liées à la dégradation, à la prise de nourriture, la satiété, les mécanismes de synchronisation des fonctions saisonnières, et l'utilisation de réserves énergétiques. Au contraire, dans le cortex

cérébral, les variations concernent la plasticité, le remodelage et l'organisation synaptique. Au niveau cérébral, les variations d'expression génique sont à la fois régionales et dépendantes des phases de l'hibernation (Schwartz et al., 2013).

Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle des différentes phases de l'hibernation est très complexe, en particulier parce que des variations inter-espèces sont observées. Les approches transcriptomiques apportent un large set de données permettant de mettre en évidence les principales voies impliquées pendant les différentes phases de l'hibernation. Mais compte tenu de leur coût et de la complexité de leur analyse, il est difficile de reproduire ces expériences sur un nombre important d'organes d'autant plus que les variations d'expression géniques peuvent différer selon les organes et même selon les régions cérébrales.

C. Applications biomédicales de l'hibernation

Les hibernants subissent de profonds bouleversements lors des différentes phases de l'hibernation. En cas d'hypothermie non contrôlée ou chez les non hibernants, ces conditions extrêmes seraient fatales. Les adaptations physiologiques mises en place par ces animaux sont remarquables, on peut citer par exemple, la capacité des hibernants à lutter contre le stress oxydatif, à tolérer les ischémies-reperfusion, ignorer le signal inhibiteur de la leptine, lutter contre la perte osseuse... Ainsi l'ours, bien qu'immobile pendant de longs mois, serait capable de régénérer du tissu osseux pendant l'hibernation (Doherty et al., 2014). L'identification des mécanismes moléculaires orchestrant l'ensemble de ces adaptations contribuerait à améliorer les stratégies thérapeutiques dans de nombreuses pathologies humaines comme les maladies métaboliques, l'ostéoporose et les hypothermies thérapeutiques utilisées entre autres pendant les greffes d'organes (Bouma et al., 2012; Carey et al., 2003; Dave et al., 2012; Ivakine and Cohn, 2014). L'utilisation de composants pharmacologiques permettant aux humains d'entrer dans des états mimant la torpeur pourraient être d'une grande utilité en médecine. En particulier dans le cas de patients ayant subi des arrêts cardiaques, des accidents vasculaires cérébraux ou de graves hypothermies. Dans un futur beaucoup plus lointain, ces hypothermies thérapeutiques pourraient être utilisées sur les astronautes pendant leur long voyage dans l'espace.

IV. Objectifs

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la régulation des différentes phases de l'hibernation sont encore très peu connus. Afin d'élucider ces mécanismes, une des approches possibles est d'étudier les variations d'expression de certains gènes en fonction des différents états. Cette démarche sous-entend que l'hibernation n'est pas un phénomène régulé par un ensemble de gènes spécifiques mais plutôt par un fin contrôle de l'expression de gènes communs à l'ensemble des mammifères (Srere et al., 1992). Dans cette optique et grâce aux nouveaux outils de séquençage à haut débit, un certain nombre d'études ont permis de mettre en évidence l'existence de gènes spécifiquement régulés dans un nombre limité d'organes pendant les différentes phases de l'hibernation (Cubuk et al., 2017b; Hampton et al., 2013; Schwartz et al., 2013).

Le principal objectif de mon travail de thèse a été d'établir une signature moléculaire spécifique de chacune des phases de l'hibernation du hamster d'Europe. Pour cela, les variations de l'expression de 21 gènes associés à plusieurs fonctions (horloge, métabolisme, hormones thyroïdiennes, action de la mélatonine) ont été étudiées par ddPCR dans 8 organes. Pour ce faire, il a été nécessaire de mettre en place à la fois les conditions environnementales permettant l'hibernation du hamster d'Europe ainsi qu'une plateforme de ddPCR permettant de traiter un grand nombre d'échantillons.

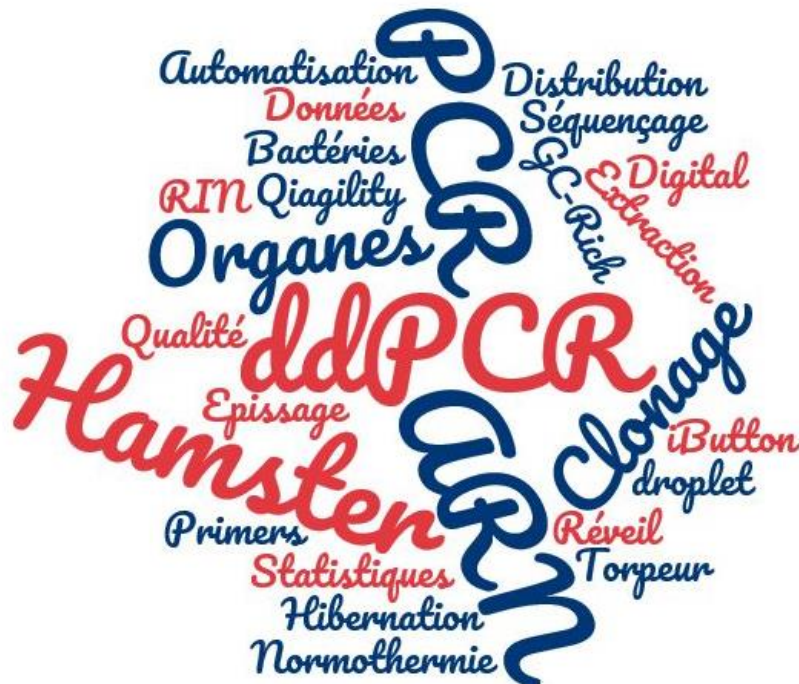
La mélatonine est un élément clé dans le contrôle des fonctions saisonnières. Pourtant, le rôle des récepteurs mélatoninergiques dans l'hibernation est encore très peu documenté. Le récepteur MT1 est considéré comme le principal acteur de la régulation des rythmes circadiens et saisonniers. De plus, l'étude mettant en évidence l'existence d'un codon stop dans la séquence du récepteur MT2 du hamster sibérien, espèce photopériodique, a conforté l'absence d'implication du récepteur MT2 dans ces phénomènes. Nous avons voulu étudier de manière plus approfondie le rôle (ou l'absence de rôle) des différents récepteurs à la mélatonine durant l'hibernation, principalement MT1 et MT2. Pour ce faire, nous avons donc voulu cloner et caractériser pharmacologiquement ces deux récepteurs.

Dans le cadre de l'étude des récepteurs à la mélatonine, je me suis finalement intéressée dans un projet satellite au clonage et la caractérisation du récepteur Mel1C de l'ornithorynque, un des seuls mammifères à pondre des œufs. Cette étude pourrait aider à comprendre la distance, en termes d'évolution, entre cet animal et les autres mammifères ainsi qu'établir la pharmacologie moléculaire du seul récepteur Mel1c fonctionnel chez les mammifères et documenter la distance entre cette pharmacologie moléculaire et celles des autres Mel1c (poule, xenopus) d'une part et avec celles des récepteurs humains MT₁ et MT₂.

La connaissance s'acquiert par l'expérience,
tout le reste n'est que de l'information.

Albert Einstein

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES



I. Modèle d'étude : hamster d'Europe *Cricetus cricetus*

Le hamster d'Europe appartient à la famille Cricetidae et à la sous-famille Cricetinae de l'ordre des rongeurs (Neumann et al., 2006). C'est un animal solitaire nocturne principalement retrouvé en Europe centrale mais également en Alsace. Comme de nombreux rongeurs sauvages, le hamster d'Europe est un reproducteur saisonnier de jours longs, ayant une période de gestation courte, les petits naissent au printemps leur permettant de se préparer à la venue de l'hiver. Le hamster d'Europe a aussi la particularité de présenter des cycles endogènes circannuels, qui s'expriment en l'absence de tout changement saisonnier de l'environnement, mais qui sont néanmoins synchronisés par des facteurs tels que les changements saisonniers de la photopériode ou de la mélatonine.

Le suivi mensuel de hamsters d'Europe mâles en conditions environnementales naturelles à Strasbourg montre qu'ils présentent une régression testiculaire et une diminution du poids corporel lié à une réduction de la prise alimentaire à partir du mois d'août, période synonyme de la diminution de la longueur du jour (durée du jour inférieure à une quinzaine d'heure). Cette régression testiculaire marque le début d'une période de quiescence sexuel qui va durer tout l'hiver, jusqu'en avril (Figure 26).

Le hamster d'Europe est également une espèce hibernante qui présente des phases de torpeur de plusieurs jours en conditions hivernales où la Ta, la durée de la photopériode et la disponibilité en nourriture diminuent. Sa période d'hibernation s'étend de novembre à avril, période durant laquelle il se réfugie dans un hibernacle qu'il a construit à la fin de l'été et dans lequel il a accumulé une grande quantité de nourriture (jusqu'à plusieurs dizaines de kilos) qu'il consomme durant les phases de réveils (Fenyk-Melody, 2012; Masson-Pévet et al., 1994).

Pendant toute la durée du cycle d'hibernation, les animaux sont enfermés dans leur terrier et privés de repères temporels, en particulier de photopériode. Le succès de la reproduction repose donc sur la synchronisation du système reproducteur avec la fin de la période d'hibernation coordonné par l'horloge circannuelle et les changements de la photopériode (Figure 78).

Depuis 2006, le Chronobiotron de Strasbourg (CNRS-UMS 3415) élève des hamsters d'Europe en captivité. Cette animalerie permet de mimer les conditions hivernales (diminution de la durée du jour, et réduction de la température extérieure jusqu'à 8°C) propices à l'hibernation. La durée de vie des hamsters d'Europe en captivité est entre 2,5 et 3 ans, ce qui permet de les suivre sur plusieurs mois consécutifs.

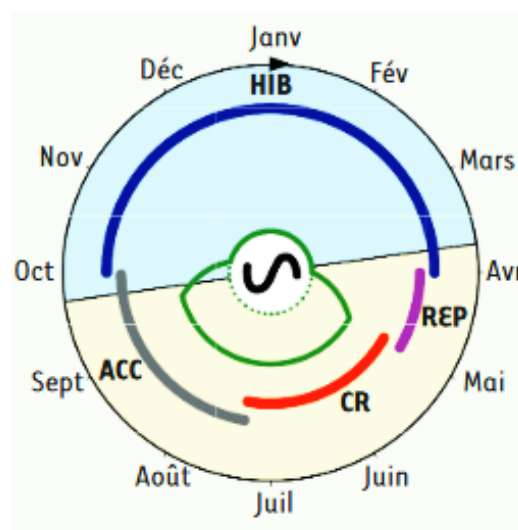


Figure 78 : Chez les hibernants, les grandes fonctions physiologiques sont précisément réparties tout au long de l'année (Sáenz de Miera et al., 2015).

La disponibilité en nourriture (en vert) et la photopériode (courte en bleu et longue en jaune) sont des facteurs saisonniers synchronisant l'horloge circannuelle. Les grandes fonctions physiologiques des hibernants comme les périodes d'hibernation (HIB), activité reproductive (REP), croissance des petits (CR), et accumulation des réserves qu'elles soient sous forme de graisse ou de graines (ACC) sont finement synchronisées avec l'environnement.

II. Suivi de l'hibernation

Les hamsters d'Europe utilisés pour cette étude ont été élevés au Chronobiotron (CNRS-UMS 3415). Pendant toute la durée de l'étude, les hamsters adultes mâles ont été maintenus individuellement dans des cages avec un accès en eau et nourriture *ad libitum*. L'implantation intrapéritonéale d'un thermochron iButtons (DS1922L, Maxim, Dallas, TX) sous anesthésie (isoflurane) a été réalisée afin de suivre la température corporelle (Tb) tout au long de l'expérience. Toutes les procédures expérimentales ont été validées par un comité éthique et autorisées par la Direction Française de la Recherche et de l'Innovation (01546.02).

Une étude préliminaire, dont les résultats ne sont pas présentés ici, a été réalisée avec un nombre réduit d'animaux et d'organes afin de valider les protocoles expérimentaux et la plateforme de ddPCR mise en place. Cette première expérience dont les résultats ne seront pas présentés ici, a permis d'ajuster d'une part les conditions techniques propre à la plateforme de ddPCR mais également celles de la mise en hibernation des animaux. Nous avons également pu ajuster les organes et gènes étudiés en fonction des premiers résultats obtenus. La deuxième étude, dont les résultats sont présentés sous forme d'article soumis a été réalisée sur un plus grand nombre d'animaux afin d'augmenter la puissance statistique de nos résultats.

Vingt-quatre animaux (8 par groupe) ont été transférés en PC : 10 h de jour et 14h de nuit (lumière allumée à 8 h du matin), avec une Ta de 20°C, du 6 Juillet au 14 Septembre 2015. Le transfert en PC induit un phénotype hivernal caractérisé par une régression testiculaire complète (évaluée par palpation) et une diminution de poids corporel. Les animaux ont ensuite été

transférés dans une chambre climatique (température ambiante) 8°C) dans le but d'induire des épisodes de torpeur caractéristiques. L'enregistrement typique de la Tb d'un hamster d'Europe en PC à 8°C est illustré dans la Figure 79. Les phases de torpeur de chaque animal ont été suivies de manière journalière pendant 3 semaines afin de vérifier la régularité de ces phénomènes.

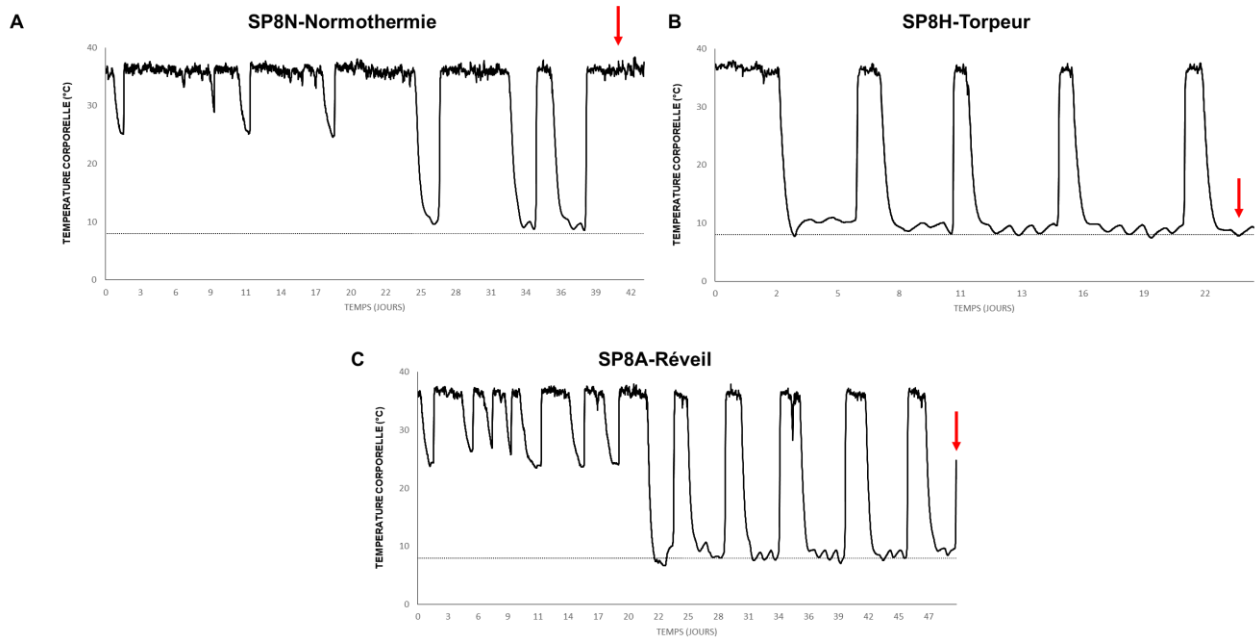


Figure 79 : Enregistrements de la température corporelle en fonction du temps reflétant les différentes phases du cycle d'hibernation.

Les enregistrements représentent le suivi de la température corporelle en fonction du temps de trois hamsters d'Europe maintenu en PC à une Ta de 8°C (ligne pointillée). [A] Les animaux du groupe SP8N-Normothermia ont été euthanasiés (flèche rouge) lors d'une phase de normothermie durant laquelle la Tb est normale et dure quelques jours. [B] Les animaux du groupe SP8H-Hibernation ont été euthanasiés pendant la phase de torpeur, période pendant laquelle l'animal est immobile avec une ventilation, température et un rythme cardiaque réduits. [C] Les animaux du groupe SP8A-Réveil ont été euthanasiés pendant la phase d'éveil caractérisée par une rapide augmentation de la Tb et du métabolisme.

Les animaux ont été euthanasiés à trois phases différentes du cycle d'hibernation toujours pendant la journée (entre 10h et 17h30). Les animaux du groupe SP8N ou normothermiques (Short Photoperiod 8°C Normothermia) ont été sacrifiés pendant une phase de normothermie d'une durée d'au moins trois jours. Les animaux du groupe SP8H (Short Photoperiod Ta= 8°C Hibernation) ou hibernants ont été sacrifiés alors qu'il était en phase de torpeur depuis au moins 3 jours. Le dernier groupe SP8A (Short Photoperiod Ta= 8°C Arousal) est constitué des animaux dont le sacrifice a eu lieu en phase d'éveil, pendant que leur Tb augmentait environ deux heures après avoir réveillés artificiellement par des manipulations douces (Figure 80).



Figure 80 : Hamster d'Europe se réveillant d'une phase de torpeur (Images Chronobiotron).

Les données biologiques des hamsters mesurées pendant la durée de l'expérience sont présentées dans la Table 5.

Hamsters d'Europe mâles en photopériode courte (10h jour/14h nuit) activité reproductrice inhibée										
	N°animal	Ta °C	Tb °C	Date naissance	Date prélèvement	Heure	Poids (g) avant mise en SP	Poids (g) début expérience mise en hibernation	Poids (g) fin expérience sacrifice	Divers
SP8-H	HE24	8°C	8.7°C	24/03/2014	07/10/2015	12:00	368,6	339,4	315,8	
	HE26	8°C	8°C	21/03/2014	07/10/2015	12:30	471,2	420,6	384,9	
	HE31	8°C	8.4°C	21/03/2014	07/10/2015	12:45	501,2	387,0	351,7	
	HE34	8°C	8.3°C	21/03/2014	07/10/2015	13:00	518,5	411,0	390,3	
	HE10	8°C	9.7°C	24/03/2014	08/10/2015	11:00	401,0	411,6	373,3	
	HE15	8°C	9.2°C	24/03/2014	08/10/2015	11:20	502,1	457,8	416,8	
	HE16	8°C	9.2°C	24/03/2014	08/10/2015	11:40	328,2	291,6	268,6	
	HE17	8°C	9.5°C	24/03/2014	08/10/2015	12:00	326,7	281,7	260,2	
SP8-N	HE9	8°C		24/03/2014	07/10/2015	11:00	401,0	411,6	373,8	no I-B start (1)
	HE19	8°C	36.3°C	24/03/2014	07/10/2015	11:20	490,0	412,3	380,3	
	HE20	8°C	37.2°C	21/03/2014	07/10/2015	11:45	498,7	441,8	416,6	
	HE11	8°C		24/03/2014	08/10/2015	10:20	513,9	440,6	408,1	no I-B start (1)
	HE12	8°C	36°C	24/03/2014	08/10/2015	10:45	383,7	352,4	336,2	
	HE33	8°C	25°C	21/03/2015	13/10/2015	10:10	404,6	418,0	350,0	
	HE30	8°C	35.9°C	21/03/2015	14/10/2015	10:15	488,0	445,8	396,7	
	HE23	8°C	33.2°C	24/03/2014	28/10/2015	14:30	408,1	360,5	356,0	I-B stop; Tre (2)
SP8-A	HE18	8°C	30.5°C	24/03/2014	08/10/2015	15:10	510,5	433,3	335,5	
	HE28	8°C	27.4°C	24/03/2014	13/10/2015	12:30	320,4	288,8	262,3	
	HE25	8°C	24.8°C	21/03/2014	14/10/2015	12:40	381,2	358,5	304,7	
	HE8	8°C	21.1°C	24/03/2014	19/10/2015	13:20	406,8	271,4	278,1	
	HE27	8°C	36,3	24/03/2014	19/10/2015	13:45	383,2	328,5	292,8	
	HE14	8°C	27°C	24/03/2014	22/10/2015	16:45	407,0	354,6	319,9	I-B stop; Tre (2)
	HE21	8°C	31°C	21/03/2014	22/10/2015	17:13	491,4	436,4	376,6	I-B stop; Tre (2)
	HE29	8°C	31.6°C	24/03/2014	22/10/2015	17:39	370,9	322,6	297,1	I-B stop; Tre (2)

Table 5 : Données expérimentales relatives aux 24 hamsters d'Europe suivis pendant l'expérience.

(1) Le système d'enregistrement de la température corporelle (I_Button) ne s'est pas déclenché, pas d'information sur la Tb pendant le déroulement de l'expérience (2) le I-Button s'est arrêté avant la fin de l'expérience, la température rectale (Tre) a été mesurée au moment du sacrifice

Les organes (cortex cérébral, hypothalamus, hypophyse, rétine, foie, cœur, tissus adipeux brun, et glandes surrénales) ont été prélevés rapidement après le sacrifice, rincés dans de la solution de Ringer froide, congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C. Le sang a été collecté et centrifugé à 1500g pendant 15 minutes pour extraire le plasma (stocké à -20°C).

III. Dosages des hormones et des métabolites

Afin de comparer le profil transcriptionnel obtenu grâce à notre étude de ddPCR, le profil hormonal (TH, mélatonine, leptine, insuline) des animaux a été déterminé. Le glucose circulant a également été mesuré.

Les concentrations d'hormones circulantes ont été déterminées par radioimmunoassays (RIA) et par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). La mélatonine plasmatique a été extraite dans le chloroforme et mesurée par RIA (Garidou et al., 2003). Les TH (T3 et T4) ont été extraites grâce à un mélange de chloroforme/méthanol (2/1), purifiées à l'aide d'une chromatographie échangeuse d'anions, éluées avec 70% acide acétique, et finalement mesurées par RIA (Reyns et al., 2003). La leptine plasmatique a été mesurée à l'aide d'un kit commercial multi-espèces (EMD Millipore, Billerica, USA). La concentration d'insuline a été déterminée par un kit ELISA (Crystal Chem, Downers Grove, USA). La glycémie a été mesurée par la méthode colorimétrique glucose GOD-PAP (Biolabo, Maizy, France).

IV. Mise en place d'une plateforme de digital droplet PCR pour l'analyse de l'expression génique au cours du cycle d'hibernation

D'un point de vue strictement expérimental, cette étude présentait deux défis majeurs. Premièrement, la gestion d'un grand nombre d'échantillons (192) et d'une grande quantité de points à réaliser (plus de 5000) et deuxièmement l'utilisation d'une technique de quantification absolue impliquant une précision de pipetage importante et reproductible. Cet aspect est déterminant pour la qualité des résultats obtenus. Nous avons donc fait le choix d'utiliser un robot pipeteur afin de réduire les erreurs liées à la distribution. Le QIAgility est une station de pipetage automatique (Qiagen, Valencia, CA, USA) dont l'intérêt majeur est la flexibilité. Des programmes adaptés à l'ensemble des phases de notre étude ont été créés afin de maximiser le nombre d'étapes automatisées. Ainsi, le temps d'expérimentation a pu être réduit et le nombre d'échantillons étudiés augmenté. Les différentes étapes du protocole expérimental sont schématisées sur la Figure 81.

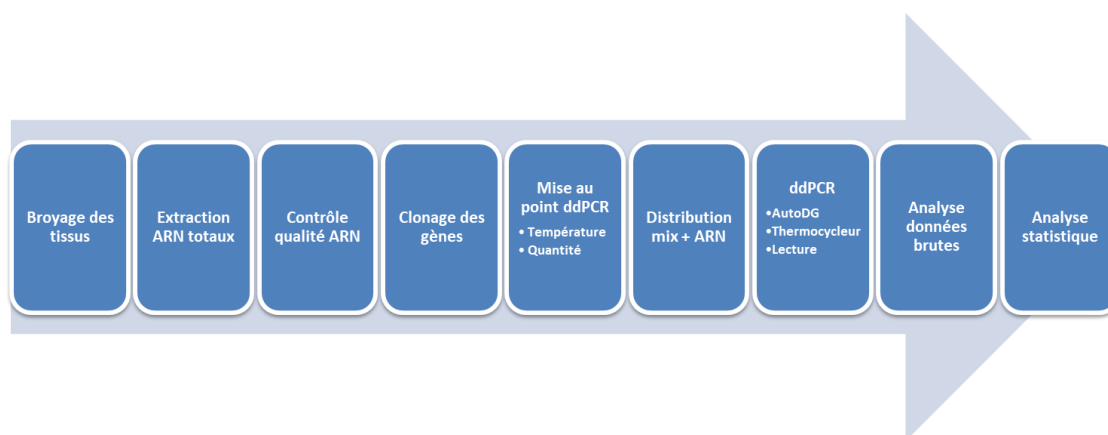


Figure 81 : Organisation du processus global de l'étude de l'expression génique par ddPCR.

A. Préparation des échantillons

La principale difficulté de cette étape du processus était d'éviter les contaminations mais également la dégradation des ARN. Toutes ces extractions ont été réalisées dans une pièce dédiée et les animaux ont été traités un par un.

Une seule et même référence de kit d'extraction a été utilisée pour l'ensemble des organes, le kit RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Bien qu'un kit spécifique des tissus fibreux existe, des études préalables réalisées au sein de notre laboratoire ont montré une meilleure efficacité d'extraction pour tous les types de tissus avec le kit pour tissus lipidiques.

Après extraction avec le QIAcube (Qiagen, Valencia, CA, USA), tous les ARN ont été dosés avec le Nanodrop (ThermoFisher, Waltham, USA) et mis en plaque à une concentration de 50 ng/μL. Cette étape de normalisation de la concentration a été faite à la main, les 192 échantillons ont été répartis sur trois plaques de 96 puits. Ces plaques constituent les plaques mères et ont servi de point de départ pour toutes les autres dilutions. Pendant la mise en plaque, les ARN étaient conservés à 4°C puis très rapidement transférés à -80°C.

La qualité des ARN a été déterminée grâce au Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) et le kit RNA 6000 Nano. Le RIN (RNA Integrity Number) des ARN extraits était compris entre 6,7 et 10. Ces valeurs de RIN sont compatibles avec la technique de ddPCR et donc l'ensemble des échantillons a été conservé pour la suite de l'étude (Figure 82).

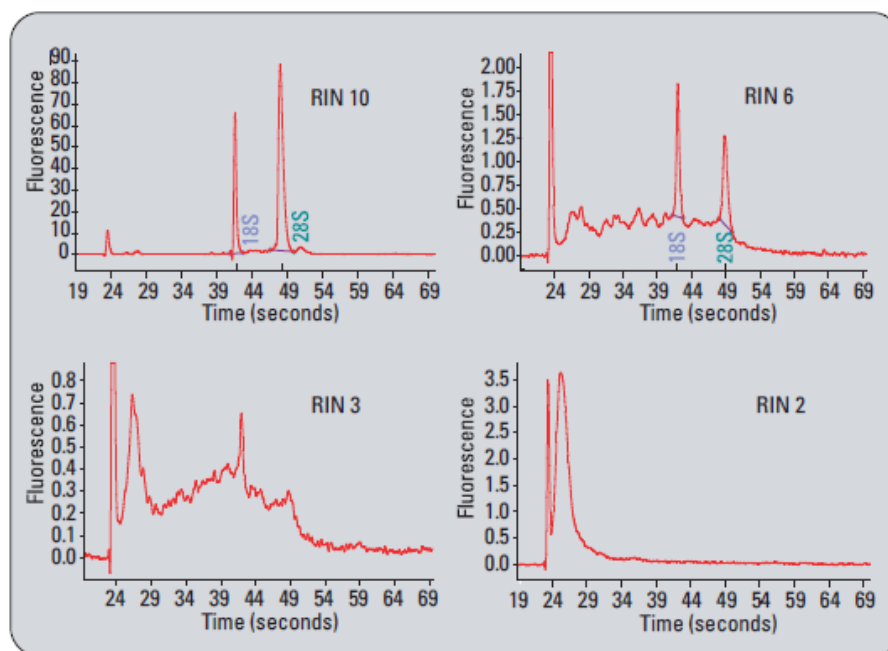


Figure 82 : Electrophorèse d'ARN intègre (RIN 10) à dégradé (RIN 2) (genomics.agilent.com).

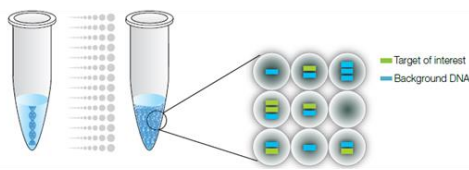
Sur les ARN intact (RIN 10), deux pics sont observés correspondant aux deux sous-unités de l'ARN ribosomique (18S, 28S). L'absence de pic supplémentaires indique une absence de contamination de l'échantillon par de l'ADN génomique et/ou une non dégradation de l'ARN

B. Quantification absolue par ddPCR

1. Principe

La digital droplet PCR est une technique permettant la quantification absolue d'ADN ou d'ARN (Hindson et al., 2011) en point final. L'échantillon est fractionné en 20 000 gouttes d'environ un nanolitre dans lesquelles tous les réactifs nécessaires à la PCR vont être retrouvés. Ce partitionnement permet la mesure de milliers d'amplifications à partir d'un seul échantillon de manière indépendante. Les chimies SYBRGreen et Taqman sont compatibles avec le système de ddPCR Biorad mais la chimie Taqman est la plus adaptée aux études d'expression génique. Elle repose sur l'activité exonucléase de certaines polymérases. Un couple d'amorces spécifiques du gène d'intérêt encadre une sonde, de quelques nucléotides, marquée en 5' par un « reporter » fluorescent et en 3' par un « quencher ». Lorsque la sonde est intacte la fluorescence du reporter est éteinte par le quencher situé à proximité. Lors de la phase de polymérisation, la sonde est hydrolysée par l'activité exonucléase de la polymérase, engendrant la séparation du quencher et du reporter qui pourra alors émettre sa fluorescence. A la fin de la PCR, la fluorescence de chacune des gouttes est mesurée afin d'évaluer la fraction de gouttes positives. La concentration initiale de l'ARN cible dans l'échantillon est alors déterminée par une loi de Poisson (Figure 83).

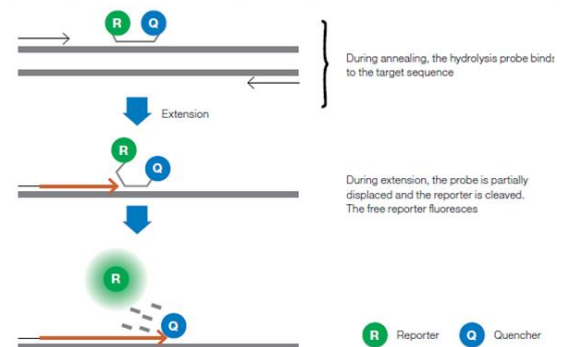
1) Génération des gouttes (Auto DG)



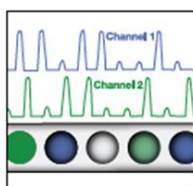
Echantillon fractionné en 20 000 gouttes
1 goutte $\approx$ 1 copie d'ARN + tous les éléments nécessaires à la PCR



2) PCR (sondes Taqman)



3) Mesure de la fluorescence de chaque goutte



Lecture de la fluorescence
Réponse oui / non

4) Analyse des résultats

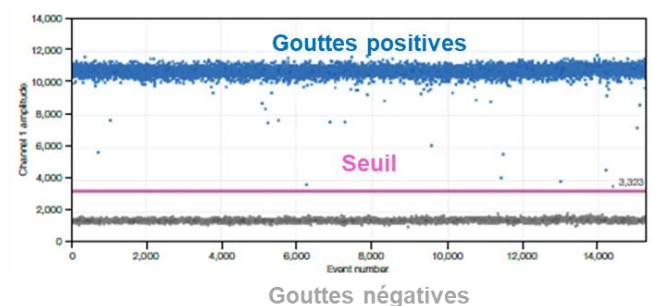


Figure 83 : Différentes étapes de la ddPCR.

2. Clonage des gènes d'intérêts et conception des amorces et sondes

A part les gènes codant pour les déiodinases (*dio2* et *dio3*), aucun des gènes de notre étude n'était publié ou prédit (pour le hamster d'Europe) dans les banques de données (*Database Resources of the National Center for Biotechnology Information*). Une région d'environ 500 paires de bases a été clonée pour chacun des gènes. Dans l'éventualité où plusieurs isoformes étaient décrites dans la littérature, les amorces étaient situées dans une région commune. Les séquences⁵ ainsi obtenues ont servi de référence dans la conception du couple d'amorces et de la sonde (nommé par la suite assay) nécessaires à la ddPCR. Les assays ont été déterminés grâce au logiciel en ligne "Universal Probe Library Assay Design Center" : https://lifescience.roche.com/en_fr/brands/universal-probe-library.html (Roche, Mannheim, Germany). Pour des raisons techniques, des essais conçus spécifiquement par Biorad ont été utilisés pour les gènes *clock* et *fgf21*.

3. Mise au point de la ddPCR et préparation des plaques d'ARN

L'analyse des données brutes se fait en déterminant le seuil entre la population de gouttes positives et la population de gouttes négatives. Plus la séparation de ces deux populations est importante, plus la détermination du seuil est aisée et donc la quantification précise. La quantité de matrice (ARN) et la température d'hybridation lors de la PCR sont deux facteurs qui influencent cette séparation. Des gradients de température et de quantité d'ARN ont été réalisés pour chacun des gènes afin d'optimiser la réaction de PCR (Figure 84).

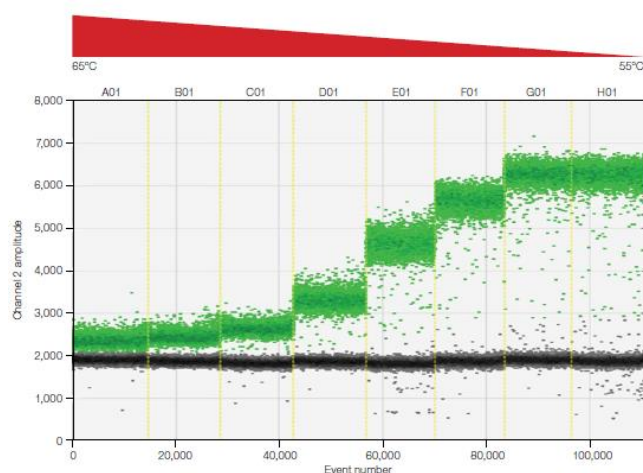


Figure 84 : Représentation de l'intensité de fluorescence de chaque gouttes : résultats d'un gradient de température (Biorad).

Les populations de gouttes positives sont représentées en vert et les populations de gouttes négatives en noire. La séparation entre les deux populations est fonction de la température. En effet à 65°C (puits A01), la distinction se fait difficilement alors qu'à 55°C (puits H01) celle-ci est maximale. Dans cet exemple, la température d'hybridation choisie serait 55°C.

⁵ Les séquences obtenues ont été déposées dans la banque de données GenBank, le détail des séquences est donné dans l' Annexe 1.

L'expression d'un gène est organe-dépendante, mais d'un point de vue pratique, il était extrêmement difficile de déterminer une quantité d'ARN optimale pour chacun des organes et cela pour l'ensemble des gènes. De manière arbitraire, les mises au point ont été réalisées sur du cortex cérébral et nous avons déterminé, en étudiant l'expression génique décrite dans la littérature, la quantité de matrice la plus adaptée à l'ensemble des organes. De manière tout aussi arbitraire, les mises au point ont été réalisées sur le groupe d'animaux en normothermie.

La Table 6 regroupe les conditions de réaction de ddPCR pour chacun des gènes.

Genes	Probes	Probes References	Forward Primer Sequences	Primer Reverse Sequences	RNA Quantity (ng)	Annealing temperature (°C)
<i>Per1</i>	UPL 63	4688627001	CCAGCACACAAAGCGTAAA	TCAGAGGCTGAGGAAGCAGT	1	57
<i>Bmal1</i>	UPL 56	4688538001	CCAACCTTCCCACAGCTTAC	CCTGGAATGCCTGGAACA	5	57
<i>Rev-Erba</i>	UPL 150	4694368001	TGTCTGTCACTGGGAATGTCA	CTCTGTTTCTCACGCTTAGGAAT	1	57
<i>Clock</i>	AATGAAGTTACACTCTCAGATACAT	NA	CCACAAGATCAGATGGTA	TAGCGATCATGACAGATG	50	51
<i>Per2</i>	UPL 161	4694481001	CTTCTTGTCTGCAGGGAGGT	TGTCCTTATCAGTCTTTGTGTGC	10	55
<i>MT1</i>	UPL 145	4694317001	CCCTCTGTACCTGTTCTCTG	GAGTCCGGTTTGCAATTG	150	59
<i>MT2</i>	UPL 131	4694155001	TGTGGTGAAGTCTGGTCTTGG	AGGATCAGTGGGTAAGGGTACA	100	57
<i>GPR50</i>	UPL 86	4689119001	GCTGGCTCTTCTCTAAGCA	GGCTGGTAGCAGGCTTAATG	150	55
<i>QR2</i>	UPL 68	4688678001	AAGACAGCTCTGACAGTGACA	CTAGATCAGCTTCTTGACCTTC	5	59
<i>Tubulin</i>	UPL 78	4689011001	GAGCGGCTCTGTGCGATTA	GGGGCTGGGTAGATGGAG	0.01	59
<i>G6PD</i>	UPL 30	4687639001	TGTGGCAAAGCCCTGAAT	TGCCACATCTCGGAAGTGA	5	55
<i>Actin</i>	UPL 9	4685075001	GCTATGAGCTGCCTGATGG	GGCTGGAAAAGAGCCTCA	0.1	57
<i>SIRT1</i>	UPL 68	4688678001	GAAAGTGCTGGCCCAATAGA	GATTACCATCAAGCCGCTTACTA	5	57
<i>TXNIP</i>	UPL 125	4693604001	CCTTGCTGATCTATGTTAGTGCC	TCACCAGGGGAAGGTCAA	1	57
<i>PPARα</i>	UPL 56	4688538001	CGGTGTGTATGAAGCCATATTC	ATCAGCATCCCGTCTTTGTT	1	57
<i>PGC1α</i>	UPL 41	4688007001	GTAGGCCAGGTATGACAGC	CCTTTCAGATCCCGTTTCTC	1	57
<i>FGF21</i>	ACACTGAAGTCCACCTGG	NA	ACCTCTACACAGATGACA	GGTTGTTGGCAAAGAAC	100	58
<i>Ob-R</i>	UPL 113	4693477001	CGCAGGAGATCAGACCAATC	ATTGATGGCCAGAACC GTAA	100	57
<i>Dio2</i>	UPL 22	4686969001	CCACCTTTCACTAGGCAACTG	AGTCGGCCACTGATGAGAAC	10	57
<i>Dio3</i>	UPL 135	4694198001	GCACCTAACTCGGAGGTCAT	ATAGTCGAGGATGCGCTGTC	100	57
<i>RBM3</i>	UPL 65	4688643001	TGGAAGCGGAAGATATGACA	TCTCTGGACCGCCCATATC	1	57
<i>UCP1</i>	UPL 21	4686942001	GGCAACCTACTGAGGTCGTG	ATCGGGGTTTGATCCGATA	0.1	57

Table 6 : Conditions de réaction de ddPCR pour chacun des gènes analysés, séquences des amorces et sondes, quantité d'ARN et température d'hybridation.

UPL : Universal Probe Library.

Les quantités de matrice sont comprises entre 0,01 et 150 ng. Le volume de matrice dans la réaction de ddPCR a été fixé à 2 µL pour l'ensemble des gènes sauf pour les deux gènes avec une quantité initiale de 150 ng (3 µL). Les ARN extraits et normalisés à 50 ng/µL ont donc été dilués en plaques à l'aide du QIAgility. Six plaques de concentrations différentes ont donc été créés et ont servi à la distribution des matrices dans les plaques de réaction.

4. Réaction de ddPCR

Le kit One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (Biorad, Hercules, USA) a été utilisé pour partitionner directement les échantillons d'ARN. Dans le cas de l'utilisation de l'Automated Droplet Generator (Biorad, Hercules, USA) pour générer les gouttes, le volume final de réaction est de 22 µL. Le mix de réaction de RT-PCR est composé de 2 ou 3 µL de matrice ; 5.5 µl de super mix ; 2.2 µl de reverse transcriptase (20 U/µl); 1.1 µl de DTT (dithiothréitol) à 300mM ; 0.6 µl d'amorces ; 0.55 µl de probes et pour finir la quantité suffisante d'eau RNase free. L'eau et l'ARN ont été distribués directement dans la plaque de réaction grâce au QIAgility ; le mix de réaction a ensuite été préparé puis distribué encore une fois avec le QIAgility. La plaque a ensuite été centrifugée pendant 5 minutes à 3700 rpm afin d'éliminer toutes les bulles d'air.

Les gouttes ont ensuite été générées et la réaction de PCR réalisée. A ce stade, les gouttes sont peu stables et doivent donc être rapidement thermocyclées (moins de 20 minutes). Les conditions de PCR utilisées sont les suivantes : 60 minutes de transcription inverse à 50°C, 10 minutes d'activation de l'enzyme à 95°C, puis pendant 40 cycles : dénaturation à 95°C pendant

30 sec, extension à la température d'hybridation spécifique de chaque gène pendant 70 sec et pour finir désactivation de l'enzyme à 98°C pendant 10 min. Le thermocycleur utilisé est le CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, USA) et pour toutes les étapes une rampe de 2°C/sec a été utilisée. La lecture de la fluorescence a été réalisée à l'aide du lecteur QX200 (Biorad, Hercules, USA).

Le logiciel de traitement QuantaSoft software v. 1.5.38.1118 (Biorad, Hercules, USA) a été utilisé pour analyser les données. Ce logiciel détermine directement le seuil discriminant entre les populations de gouttes positives et négatives. Dans un souci d'homogénéisation, tous les puits ont été vérifiés individuellement. L'analyse statistique des données a été faite grâce au logiciel R Program Writer software 3.3.1 (<http://www.r-project.org/>) avec l'aide du service de biostatistique de l'IdRS en particulier Damien Valour.

V. Expériences de radioliation

A. Expériences de saturation

Les expériences de saturation permettent de déterminer l'affinité d'un radioligand pour un récepteur donné. La 2-[¹²⁵I]-mélatonine a été utilisée dans l'ensemble des expériences de radioliation (Figure 85) décrites dans ce manuscrit.

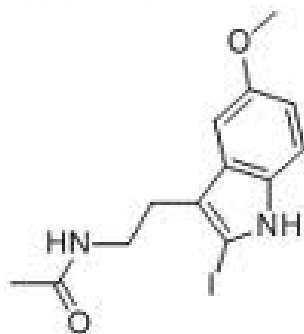


Figure 85 : Structure chimique de la 2-[¹²⁵I]-mélatonine.

Dans le milieu réactionnel sans ligand endogène, le radioligand se fixe sur les sites de liaison spécifiques et aspécifiques permettant de mesurer la liaison totale. En condition saturante de mélatonine, qui se fixe uniquement sur les sites spécifiques, le radioligand va se fixer exclusivement sur les sites non spécifiques restants, permettant de déterminer la liaison non spécifique. Les liaisons totale et non spécifique sont mesurées expérimentalement pour chacune des concentrations d'une gamme croissante de radioligand. La liaison spécifique est calculée en soustrayant la valeur de liaison non spécifique à la liaison totale.

A partir de ces données, une courbe de saturation est définie en fonction de la relation entre la concentration de ligand et la liaison spécifique mesurée. Cette courbe permet de calculer la constante de dissociation (K_D généralement exprimée en picomolaire pour les récepteurs à la mélatonine) déterminée graphiquement (Figure 86). Cette dernière correspond à la

concentration en radioligand pour laquelle 50% des sites de liaison spécifiques sont occupés, elle reflète l'affinité du radioligand pour le récepteur et a été déterminée grâce à la méthode de Scatchard. Cette méthode permet aussi de calculer la valeur de Bmax qui correspond à la densité totale de récepteurs dans une préparation de membranes/lignée donnée. Elle est généralement exprimée en fentomole par mg de protéines pour les récepteurs mélatoninergiques.

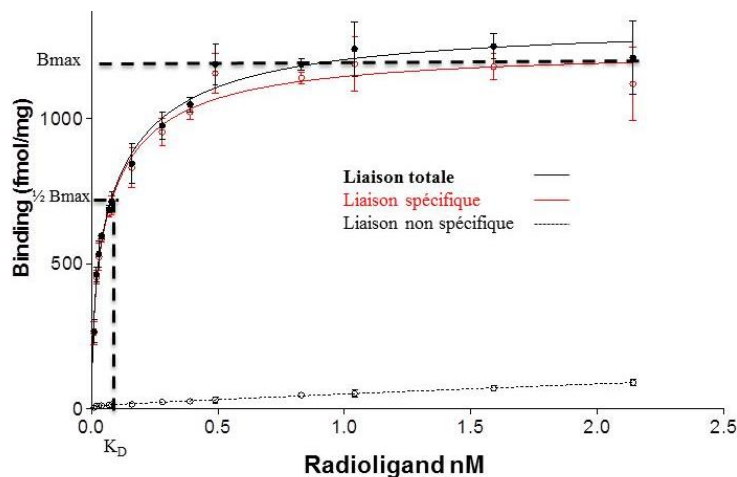


Figure 86 : Courbe de saturation représentant la liaison de la mélatonine iodée en fonction d'une concentration croissante de radioligand.

Expérience faite sur des cellules exprimant transitoirement le récepteur Mel1c de l'ornithorynque.

B. Expériences de compétition

Les tests de compétition permettent de déterminer l'affinité d'un ligand non radioactif pour le récepteur étudié. La liaison spécifique est déterminée en présence d'une quantité fixe de radioligand permettant d'occuper l'ensemble des sites de fixation et de concentrations croissantes de ligand froid. Le ligand non radioactif entre en compétition avec le radioligand pour la fixation sur les sites de liaison (Figure 87). La liaison totale est déterminée dans un milieu réactionnel en absence de produit et la liaison non spécifique en présence de mélatonine.

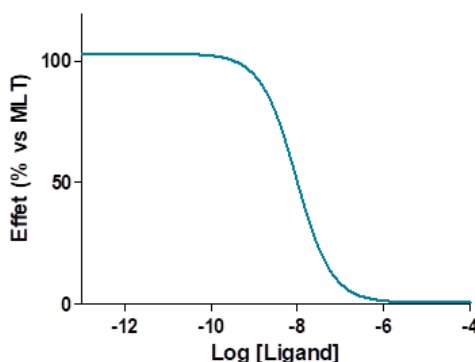


Figure 87 : Représentation du pourcentage de liaison totale en fonction du log de la concentration de ligand froid.

Cette représentation graphique permet de déterminer la concentration en ligand nécessaire au déplacement de 50% de la liaison maximale du radioligand (IC₅₀ : inhibitory concentration). La constante d'inhibition (K_i) a été calculé selon l'équation de Cheng-Prusoff :

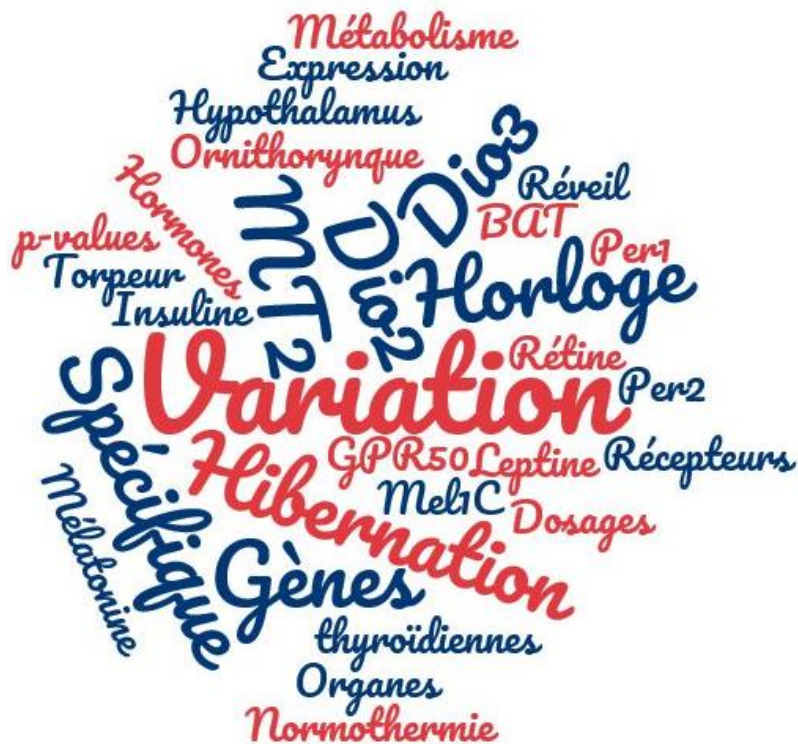
$$K_i = \frac{IC_{50}}{[1 + (\frac{L}{K_D})]}$$

Où L est la concentration de 2-[125I]-iodomélatonine, et K_D est la constante de dissociation.

Nous ne sommes savants que de la science
présente.

Michel Eyquem de Montaigne

CHAPITRE III : RESULTATS



Résultats - Avant- propos

Comme indiqué précédemment, les résultats de nos différentes études seront présentés dans la partie suivante sous forme de trois chapitres.

- **Chapitre 1: Gene expression profiling during hibernation in the european hamster**

Cet article a été soumis au journal Scientific reports en Février 2018.

- **Chapitre 2: “The molecular path” for cloning the European hamster melatonin receptors 1 and 2**

Nous avons mis en œuvre un grand nombre de stratégies afin de cloner entièrement le récepteur à la mélatonine MT2 du hamster d'Europe, qui ne possède pas de codon stop prématuré. Cet article, en cours d'écriture, résume les principaux résultats obtenus dans ce cadre.

- **Chapitre 3: Characterization of the mel1c melatoninerpic receptor in platypus (ornithorhynchus anatinus)**

Ce projet a été initié au cours de mon projet de fin d'étude de six mois, et complété durant ma thèse. Cet article est publié dans le journal *Plos One* en Février 2018.

GENE EXPRESSION PROFILING DURING HIBERNATION IN THE EUROPEAN HAMSTER

Célia Gautier^{1,2}, Béatrice Bothorel², Dominique Ciocca², Damien Valour⁴, Albane Gaudeau¹, Clémence Dupré¹, Giulia Lizzo¹, Chantal Brasseur¹, Isabelle Riest-Fery¹, Jean-Philippe Stephan¹, Olivier Nosjean^{1,3}, Jean A. Boutin^{1,3*}, Sophie-Pénélope Guénin^{1,+}, Valérie Simonneaux^{2,+,*}

¹PEX Biotechnologie Chimie & Biologie, Institut de Recherches Servier, Croissy sur Seine, France

²Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

³Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France

⁴PEX Méthodologie et Valorisation des Données, Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France

⁺ These authors contributed equally to this study

Corresponding authors: Jean A Boutin (jean.boutin@servier.com) and Valérie Simonneaux (simonneaux@inci-cnrs.unistra.fr)

Abstract

Hibernation is an exceptional physiological response to a hostile environment, characterized by a seasonal period of torpor cycles involving dramatic reductions of body temperature and metabolism, and arousal back to normothermia. The mechanisms regulating hibernation are poorly understood. Here we analysed the expression of genes involved in energy homeostasis and seasonal timing (melatonin receptors, circadian clock, and thyroid metabolism) using digital droplet PCR in various central and peripheral tissues sampled at different stages of torpor/arousal cycles in the European hamster. During torpor, the hypothalamus exhibited strongly downregulated gene expression, suggesting that hypothalamic functions were silenced during this period of reduced metabolic activity. During both torpor and arousal, many structures (notably including brown adipose tissue) exhibited altered expression of deiodinases, potentially leading to reduced thyroxine availability. During the arousal phase, all analysed tissues showed increased expression of the core clock genes *Per1* and *Per2*. Overall, our data indicated that the central hypothalamus and peripheral brown adipose tissue were the tissues most affected during the torpor/arousal cycle, and that clock genes may play critical roles in resetting the body's clocks at the beginning of the active period.

I. Introduction

Animals living in the wild must cope with seasonal variations in ambient temperature (T_a) and day length (photoperiod), which impact food availability. These seasonal variations necessitate major physiological adaptations, particularly for endotherms that have to maintain a relatively constant body temperature (T_b). As winter approaches, animals adapt to the decreasing T_a , photoperiod, and food resources by limiting their energy expenditure in various ways, including decreasing their metabolism, inhibiting reproduction, and insulating their body. The most extreme and efficient strategy is hibernation, an adaptive event observed in mammalian groups, including monotremes, bats, primates, and rodents (Geiser and Turbill, 2009; Heldmaier et al., 2004). Hibernation reportedly gives these animals a better chance of survival (Geiser and Turbill, 2009).

Hibernation is an exceptional physiological phenomenon comprising multiple phases within a two-switch model (Grabek et al., 2015; Heldmaier et al., 2004; Serkova et al., 2007). The summer-winter switch enables phases of controlled heterothermy that are required to enter a state of torpor. The second switch occurs within the winter period, and controls a series of hypothermia periods—torpor bouts, lasting from a few hours to several days depending on the species—that are interrupted by short spontaneous interbouts of normothermia. Torpor bouts are characterized by low T_b and drastically reduced metabolic activity, with diminution of heartbeat and respiration, altered fuel utilization, and reduction of costly cell processes. Arousal phases involve rapid rewarming and increased metabolic activity. During the normothermic interbouts, T_b and metabolic activity return to a basal level, possibly to clear metabolic waste (Geiser, 2011b). Hibernators are divided into two categories based on their energy saving strategy: fat-storing species (e.g. the marmot, *Marmota marmota*) exhibit an extensive fattening period prior to hibernation, while food-storing species (e.g. the European hamster, *Cricetus cricetus*) hoard food in a burrow and feed between torpor bouts. Although these strategies require different metabolic adaptations, they both involve fasting states that last from a few hours to several days or months (Florant et al., 2004; Geiser, 2004; M. Humphries et al., 2003).

In many species, the time of hibernation is controlled by seasonal changes in photoperiod and temperature (Canguilhem and Petrovic, 1974). Photoperiodic cycles influence the levels of melatonin, a neurohormone that is secreted by the pineal gland only during the night, with correspondingly greater production during long winter nights (Simonneaux and Ribelayga, 2003). Photoperiod-related changes in circulating melatonin are fundamental for seasonal functions, including hibernation (Hazlerigg and Simonneaux, 2015a). Intracerebroventricular infusion of melatonin prolongs hibernation bouts in golden-mantled ground squirrels (*Citellus lateralis*) (Stanton et al., 1987) and treatment with the melatonin antagonist S22153 reduces total hibernation duration in Syrian hamster (*Cricetus auratus*) (Pitrosky et al., 2003). Studies in mammals have characterized two melatonin receptors with high-affinity binding, MT_1 and MT_2 , and one with low-affinity binding, MT_3 (identified as quinone reductase 2; QR2) (Nosjean et al., 2000). Additionally, GPR50—an orphan receptor derived from Mel1c in amphibians and birds (Dufourny et al., 2008; Gautier et al., 2018b)—is reportedly involved in torpor in mice (Bechtold et al., 2012).

MT₁ is present at the highest density in the *pars tuberalis*, a region of the pituitary stalk where melatonin regulates the expression of thyroid-stimulating hormone (TSH) by specific thyrotrope cells (Dardente et al., 2003). TSH secreted during a long photoperiod activates deiodinase 2 (Dio2) and inhibits Dio3 in the tanycytes of the mediobasal hypothalamus, resulting in increased levels of active triiodothyronine (T3) (Dardente et al., 2014; Hanon et al., 2010; Lewis and Ebling, 2017; Nishiwaki-Ohkawa and Yoshimura, 2016). It is believed that melatonin effects on seasonal functions are enacted through seasonal changes in hypothalamic T3 (Hazlerigg and Simonneaux, 2015a; Murphy et al., 2012). This likely includes hibernation, since central administration of T3 reduces daily torpor in the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*) (Bank et al., 2017). Rhythmic melatonin expression and other biological rhythms depend on a circadian system comprising a master clock located in the suprachiasmatic nucleus (SCN), and secondary clocks within other central and peripheral structures (Dibner et al., 2010). Circadian rhythms are generated by transcriptional/translational feedback loops involving core clock genes, such as *Bmal1*, *Clock*, *Cry*, *Per*, and *Rev-Erba* (Ko and Takahashi, 2006). While the roles of circadian clocks during hibernation are unknown, during the torpor bout in hibernating European hamsters, clock genes (including *Per1*, *Per2*, and *Bmal1*) stop ticking and melatonin remains at a constant low level (Revel et al., 2007b).

During prolonged fasting in hibernating animals, energy is supplied almost exclusively by lipid oxidation, and this switch in fuel utilization from carbohydrates to lipids must be highly regulated (Buck and Barnes, 2000). During hibernation, the primary source of endogenous glucose production becomes hepatic gluconeogenesis using lactate, pyruvate, glycerol, and amino acids (Rui, 2014). In white adipose tissue, triglycerides are catabolized into glycerol and fatty acids, which are released into circulation (Lass et al., 2011). Glycerol is converted into glucose, while fatty acids are metabolized into β -hydroxybutyrate and acetoacetate. These ketone bodies and glucose are the only fuel substrates for the brain (Cahill, 2006).

This process also involves upregulation of silent information regulator 1 (SIRT1), which reduces adipogenesis by inhibiting the important adipogenic transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), and stimulates hepatic gluconeogenesis by promoting deacetylation of PPAR γ coactivator-1 alpha (PGC-1 α) (Picard et al., 2004; Rodgers et al., 2005). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) also influences energy store management by stimulating hepatic fatty acid oxidation (Kersten et al., 1999). PPAR α regulates the liver-derived fibroblast growth factor 21 (FGF21), which plays a major role in adaptive starvation responses, stimulating lipolysis in white adipose tissue and ketogenesis in liver tissue, and promoting torpor (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). Finally, previous studies indicate that thioredoxin-interacting protein (TXNIP)—a negative regulator of thioredoxin that is involved in hypothalamic homeostasis and hepatic gluconeogenesis (Blouet et al., 2012; Chutkow et al., 2008)—is up-regulated in the hypothalamus during torpor in GPR50 KO mice (Hand et al., 2013), Siberian hamsters (Hand et al., 2013), and ground squirrels (Schwartz et al., 2013).

Another essential part of hibernation is the arousal from torpor bouts, in which brown adipose tissue (BAT) plays a major role by increasing Tb through non-shivering thermogenesis. Thermogenesis in BAT occurs due to the mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1), which

uncouples the mitochondrial respiratory chain by catalysing the regulated re-entry of protons into the matrix, leading to reduced ATP synthesis and generation of heat (Cannon and Nedergaard, 2004). Indeed, in the thirteen-lined ground squirrel (*Ictidomys tridecemlineatus*), UCP1 is upregulated to a similar degree during both torpor and arousal compared to in the summer active state (Hampton et al., 2013; Scarpace et al., 1997).

Although a limited number of studies suggest general reductions of cellular metabolism in torpid states, the cellular and molecular pathways that drive the successive drops and rises in metabolic activity remain poorly understood. One approach to elucidating these mechanisms is to search for genes that display differential expressing patterns according to hibernation state. This approach implies that hibernators have no specific set of genes dedicated to hibernation, but rather rely on differential expression of genes that exist in most mammals (Srere et al., 1992). Such gene profiling could be performed using an unbiased wide transcriptomic analysis, such RNASeq (Cubuk et al., 2017b; Hampton et al., 2013; Schwartz et al., 2013), or a candidate genes approach (O'Hara et al., 1999). In our present study, we aimed to establish a molecular signature of hibernation by analysing the expression of genes with potential involvement in energy homeostasis and seasonal timing (melatonin receptors, thyroid metabolism, and clock machinery), in eight central and peripheral organs sampled during three different hibernation phases in the European hamster.

II. Results

Eight central and peripheral organs (cortex, hypothalamus, pituitary gland, retina, liver, heart, brown adipose tissue, and adrenal glands) were sampled at three different hibernation phases (normothermia, torpor, and arousal) in male European hamsters. The ddPCR results provided the absolute count of RNA copies encoding melatonin receptors, thyroid metabolism enzymes, clock proteins, and selected proteins involved in energy homeostasis. Using the ddPCR data, Kruskal-Wallis analysis was performed on genes expressed in different organs during the different hibernation phases, revealing that 61 genes showed a significant adjusted *P* value (Benjamini-Hochberg) according to the hibernation state (Table 9). All categories of genes and all organs displayed genomic modifications associated with the hibernation states, although with some differences between groups. Next, differential gene expression was analysed with regards to specific organs and functional groups of genes.

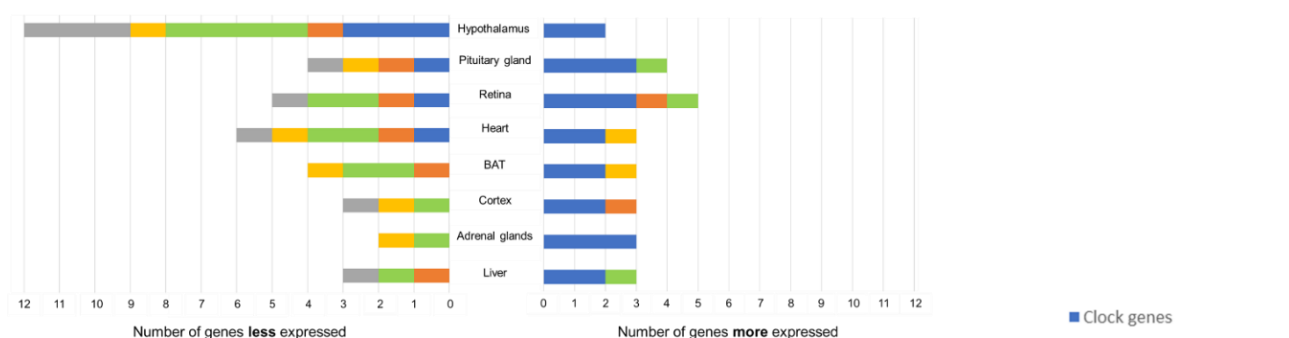
A. Organ-dependent gene profiling during hibernation cycles

In each central or peripheral organ, numerous genes were differentially expressed according to the hibernation phases (Figure 88). Hypothalamus samples clearly contained the highest number of genes with significant differences in expression. Large numbers of differential genes were also found in other nervous/neuroendocrine organs, including the pituitary gland and the retina, but not the cortex. On the other hand, genes expressed in the liver and adrenal glands appeared to be the least affected.

Further examination of whether gene expression was increased or decreased in a given hibernation state revealed that more genes were downregulated (39 genes) than upregulated (26

genes) in torpor and arousal compared to in normothermia (Figure 88a). Moreover, hypothalamus samples exhibited the highest number of downregulated genes (12 genes) in torpor and arousal compared to normothermia, while only 2 genes were upregulated. Most other organs showed similar numbers of upregulated and downregulated genes. A surprisingly low number of genes were differentially expressed when hamsters arose from torpor (Figure 88 ab). Overall these results highlighted the strong alteration of hypothalamic genes during hibernation, with downregulation of a strikingly large number of genes in torpor or arousal as compared to normothermia. During arousal, there was only a moderate alteration of gene expression while the hypothalamus, BAT and retina samples showed the greatest number of upregulated genes.

(a) Number of genes displaying significant variation during **Torpor** and **Arousal** compared to **Normothermia**



(b) Number of genes displaying significant variation during **Arousal** compared to **Torpor**

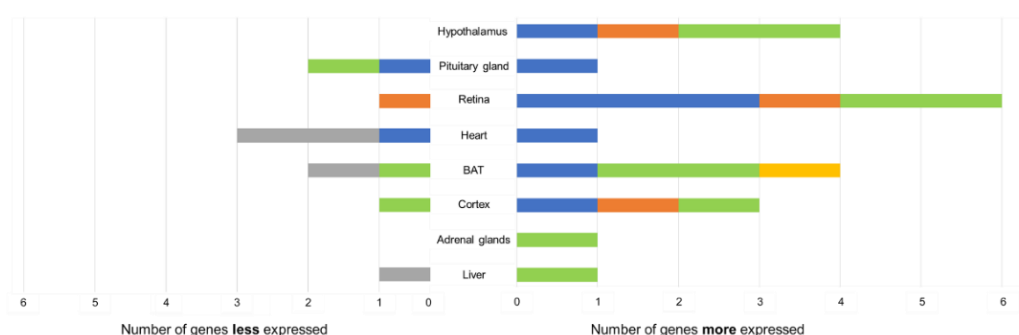


Figure 88 : Changes in the expression of functional families of genes in various tissues of the European hamster according to hibernation stage.

Data represent the number of genes per functional family that were downregulated (left side) or upregulated (right side) in eight central or peripheral tissues. (a) Gene expression during torpor and arousal compared to gene expression during normothermia. (b) Gene expression during arousal compared to gene expression during torpor.

B. Profiles of functional groups of genes during hibernation cycles

To determine whether some functional groups might be particularly relevant to the hibernation states, separate analyses were performed to determine the hibernation profiles of four categories of genes: clock system, melatonin receptors, thyroid hormone metabolism, and general metabolism.

1. Clock genes

The *Per1* and *Per2* genes showed large differential expression among the hibernation phases in all organs (Figure 89a). *Per2* was strongly upregulated during arousal compared to in the normothermia state in all investigated organs, and was upregulated to a less extent during arousal compared to torpor in five organs, including the hypothalamus, retina, and BAT. *Per1* expression was also markedly upregulated during arousal in all analysed organs and, to a lesser extent, during torpor compared to during normothermia. The other measured clock genes showed smaller variations. The *Bmal1* mRNA level was higher in arousal compared to normothermia in the pituitary gland and retina, and was higher in arousal compared to torpor in the retina. *Clock* and *Rev-Erba* were downregulated during arousal and torpor compared to during normothermia, particularly in nervous tissues for the *Clock* gene, and in the hypothalamus and heart for the *Rev-Erba* gene. Notably, in the hypothalamus, all clock genes were either downregulated or unchanged during torpor compared to normothermia, thus confirming the results of whole gene analysis (Figure 88).

2. Melatonin receptors encoding genes

Genes encoding melatonin receptors displayed variations during the hibernation cycle that were strongly dependent on the receptor subtype (Figure 89b). Notably, the MT₂ receptor showed the largest variations, with decreased expression in torpor and arousal compared to in normothermia in peripheral organs (liver, heart, and BAT), but increased expression in arousal compared to torpor in central tissue. The gene encoding QR₂ was downregulated during arousal compared to normothermia in nervous tissue (hypothalamus, retina and pituitary). The orphan receptor *GPR50* showed altered expression during arousal compared to normothermia, only in the cortex. MT₁ expression did not significantly vary during hibernation in any investigated organ.

3. Deiodinase genes

The genes encoding two enzymes involved in the thyroid hormone metabolism, *Dio2* and *Dio3*, displayed different hibernation profiles (Figure 89c). *Dio2* expression was markedly decreased in torpor and arousal compared to in normothermia, particularly in the hypothalamus, pituitary gland, BAT, and adrenal glands. In contrast, *Dio3* expression was increased during arousal compared to during normothermia and torpor in the BAT, and in during arousal compared to normothermia in the heart. Notably, in BAT during arousal, *Dio2* mRNA was

downregulated in association with upregulation of *Dio3* mRNA, suggesting reduced thyroid metabolism.

4. Genes involved in general metabolism

The hibernation profiles of genes involved in general metabolism revealed large differences among genes and organs, making it difficult to illustrate a general scheme (Figure 89d). A number of genes were downregulated in torpor compared to normothermia, including *FGF21* in the liver, *PPAR α* in central tissues, *PGC1 α* in the hypothalamus and retina, and *SIRT1* in the hypothalamus. The hypothalamus contained a number of downregulated genes (*PPAR α* , *PGC1 α* , and *SIRT1*). In contrast, the peripheral organs unexpectedly showed no change in metabolic gene expression between torpor and normothermia, with the exception of *FGF21* downregulation and *Ob-R* upregulation in the liver. A number of genes were upregulated in the arousal state compared to the torpor state, particularly *FGF21* in hypothalamus, retina, liver, and adrenal glands; *PPAR α* in central tissues; and *PGC1 α* and *SIRT1* in the BAT. Only *TXNIP* in the hypothalamus and heart, and *Ob-R* in the BAT were reduced in arousal compared to torpor. Unexpectedly, *UCP1* mRNA in the BAT did not vary according to the hibernation stage (not shown).

5. Housekeeping genes

Although this is not required in the ddPCR approach, we examined classical housekeeping genes to determine whether they were generally downregulated due to the torpor conditions. Our data (not shown) indicated no organ-dependent or stage-dependent common variations among the three investigated genes: *tubulin*, *actin*, and *G6PD*. These observations indicated that there was no general alteration of gene expression according to hibernation stage in any investigated organ.

C. Circulating hormones during the hibernation cycles

Hormones related to the functional groups of genes—including melatonin, T3, T4, glucose, insulin, and leptin—were assayed at the different hibernation states. The circulating concentrations of these hormones did not significantly differ among the three hibernation states (Table 10). Thus, we were unable to examine correlations between changes in circulating hormone levels and changes in gene expression.

(a) Clock genes

	Reference group: Normothermia		Reference group: Torpor
	Torpor	Arousal	Arousal
Per2	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
	BAT		
Per1	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
Bmal1	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
Clock	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
Rev-Erba	Heart		
	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		

(b) Melatonin receptors genes

	Reference group: Normothermia		Reference group: Torpor
	Torpor	Arousal	Arousal
MT1	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
	BAT		
MT2	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
QR2	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
GPR50	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		

(c) Deiodinases genes

	Reference group: Normothermia		Reference group: Torpor
	Torpor	Arousal	Arousal
Dio2	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
	BAT		
Dio3	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		

(d) Metabolism genes

	Reference group: Normothermia		Reference group: Torpor
	Torpor	Arousal	Arousal
FGF21	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
	BAT		
PPAR α	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
	Liver		
PGC 1 α	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
	Heart		
SIRT1	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
	Retina		
TXNIP	Heart		
	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		
	Pituitary gland		
Ob-R	Retina		
	Heart		
	Liver		
	BAT		
	Adrenal Glands		
	Cortex		
	Hypothalamus		

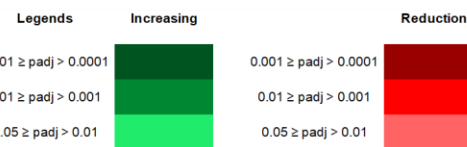


Figure 89 : Changes in the expression of individual genes in various tissues of the European hamster according to hibernation stage.

Genes are grouped according to their functional family: clock genes (a), melatonin receptor genes (b), deiodinase genes (c), and metabolism genes (d). In each table, the colour indicates significant upregulation (green), downregulation (red), or no change (grey) of the mRNA levels in the eight investigated tissues, after adjustment of their *P* values. Colour intensity is a function of the level of significance.

III. Discussion

In this study, we examined the molecular signatures of a set of genes related to seasonal timing and energy homeostasis, in association with three hibernation phases during a winter-like heterotherm period, from eight different organs of the well-established hibernating species, the European hamster.

Analysing the overall changes in functional families of genes revealed ubiquitous upregulation of the core clock genes *Per1* and *Per2*, and to a lesser extent *BMAL1* and *Clock*, upon arousal from torpor. This upregulation of clock genes is most likely associated with arousal from torpor rather than due to a shift in circadian fluctuations, since we previously determined that circadian clockwork stops ticking in the European hamster's SCN during torpor (Revel et al., 2007b). Our present results further showed the overall downregulation of *Bmal1*, *Clock*, and *Rev-Erba* in the hypothalamus of torpid hamsters, further indicating arrest of the circadian clock. The role of the master circadian clock during torpor remains a matter of discussion. Thirteen-lined ground squirrels exhibit markedly increased SCN activity during torpor and arousal, as indicated by c-fos expression (Bitting et al., 1994; Bratincsák et al., 2007). Moreover, in Djungarian hamsters (Ruby and Zucker, 1992) and ground squirrels (Ruby et al., 1996), SCN lesions do not prevent torpor states but only alter their timing. Altogether, these data indicate that the SCN clock is not essential for torpor onset but may play a crucial role in its temporal organization. Moreover, our findings indicate that *Period* genes may be essential for post-torpor re-entrainment of the clock.

Studies in various hibernating species report no night-time increase in melatonin during the torpor states, due to SCN clock arrest, with a subsequent rapid restoration of the nocturnal rhythm upon arousal (Darrow et al., 1986; Florant et al., 1984; Revel et al., 2007b; Vaněček et al., 1985). Researchers have used 2-¹²⁵I-iodomelatonin binding to examine changes in melatonin receptor density during hibernation in the brains of hedgehogs (Gauer et al., 1993c) and ground squirrels (Stanton et al., 1991), with both studies reporting decreased numbers of binding sites in the *pars tuberalis* during torpor compared to normothermia. Our present data showed that the gene encoding MT₁ was not differentially expressed according to hibernation phase in any of the investigated tissues. In contrast, MT₂ gene expression increased during arousal in central organs (cortex, hypothalamus, and retina), and decreased during torpor and arousal in peripheral organs (heart, liver, and BAT). A recent study investigated how the melatonin receptor antagonist luzindole influences the brain of the hibernating ground squirrel, and demonstrated that melatonin receptor signalling promotes neuroprotection and optimizes mitochondrial function during arousal from torpor (Schwartz et al., 2015). Therefore, the increased central MT₂ expression observed upon arousal indicates that this receptor may be involved in the neuroprotective function of melatonin during hibernation. This function is particularly notable in the retina, which expresses high levels of MT₂ and displays profound synaptic remodelling during hibernation (Luan et al., 2017; Merriman et al., 2016; Remé and Young, 1977).

Melatonin also reportedly activates arousal thermogenesis through peripheral actions (Cipolla-Neto et al., 2014; Heldmaier et al., 1981; McMillan and White, 2015; Tan et al., 2011);

however, our data did not reveal significant changes in MT_2 and MT_1 expressions in any peripheral organs, including BAT. Moreover, mice bearing a mutation in the melatonin-related transport protein *GPR50* display enhanced propensity to fasting-induced torpor (Bechtold et al., 2012; Ivanova et al., 2008), but we found that *GPR50* gene expression did not vary among the hibernation stages of the European hamster. Similarly, we found no variations in the expression of QR2 (the MT_3 binding site), suggesting either that the enzyme plays a minor role in this context, or that it is not regulated through variation of gene expression. Altogether, our present data indicated that the gene encoding MT_2 was most substantially altered according to the hibernation cycles, with opposite patterns in central and peripheral organs.

The adaptation to winter physiology, especially torpor, requires reduced availability of thyroid hormones, particularly T3 (Bank et al., 2017; Barrett et al., 2007b; Klosen et al., 2013; Murphy et al., 2012). Our present data showed that the *Dio2* enzyme that converts T4 to T3 was decreased in central structures (hypothalamus and pituitary gland) and peripheral organs (BAT and adrenal glands) during torpor and arousal, while the *Dio3* enzyme that degrades T3 was increased during torpor in the heart and BAT. These alterations lead to reduced T3 concentrations during torpor and arousal. Two recent studies in the Djungarian hamster demonstrate that increasing peripheral (Bank et al., 2015b) or intra-hypothalamic (Bank et al., 2017) T3 resulted in reductions of torpor induction and torpor bout duration and depth, confirming the pivotal role of T3 in torpor regulation.

Torpor induction is associated with a switch in energy utilization from carbohydrates to lipids (Buck and Barnes, 2000). In the present study, we followed the changes in expression of *FGF21* and its upstream regulator *PPAR α* , since they reportedly play major roles in adaptive starvation responses and torpor promotion (Badman et al., 2007; Inagaki et al., 2007). Indeed, during torpor, *FGF21* expression was decreased in the liver and *PPAR α* expression was decreased in the cortex, hypothalamus, and retina. Upon arousal, *FGF21* expression was increased in the hypothalamus, retina, liver, and adrenal glands; and *PPAR α* expression was increased in the cortex, hypothalamus, and retina. *SIRT1* and *PGC1 α* are involved in gluconeogenesis and thermogenesis (Picard et al., 2004; Puigserver and Spiegelman, 2003), and both were downregulated in the hypothalamus during torpor, and upregulated in the BAT during arousal, likely in response to increasing energy demand. *TXNIP* is involved in hypothalamic homeostasis and hepatic gluconeogenesis (Blouet et al., 2012; Chutkow et al., 2008), and is reportedly upregulated in the hypothalamus during various types of torpor (Hand et al., 2013; Schwartz et al., 2013). In our present analysis of the European hamster hypothalamus, *TXNIP* gene expression was not higher during torpor compared to normothermia, but was significantly reduced during arousal, possibly to adjust the central metabolic demand when the animals awoke from torpor. Altogether, our findings indicated that selected genes involved in metabolic pathways were generally downregulated during torpor and upregulated during arousal, particularly in the hypothalamus. However, these variations in metabolic gene expression were not associated with detectable changes in circulating levels of metabolic and thyroid hormones.

Comparison among the various investigated central and peripheral organs revealed that each organ displayed a specific hibernation gene profile, potentially indicating different

functions of these organs during the hibernation cycle. In particular, the hypothalamus and BAT warrant closer analysis. These tissues are thought to play critical roles in hibernation, and previous studies report thorough transcriptomic analysis at different hibernation stages.

Little is known about the genes responsible for the highly efficient fat burning activity that occurs during the hibernation arousal process. BAT generates heat, notably in newborns and hibernating mammals, and the thermogenesis process involves norepinephrine β -oxidation of free fatty acids under control of the hypothalamus via the sympathetic nervous system. It appears that thyroid hormones are also involved in this process since T3 influences BAT thermogenesis either directly or indirectly through central sites. A recent analysis of BAT in the thirteen-lined ground squirrel demonstrates differential expression of 14% of the examined genes across four collection points throughout the year and hibernations stages (Hampton et al., 2013). Comparing the transcriptomes of torpid and aroused squirrels revealed that a few genes encoding transcription factors were significantly downregulated during torpor, notably including BHLHE40, which is involved in circadian rhythms (Honma et al., 2002). Our analysis of European hamster BAT confirmed that *PGC1 α* and *SIRT1* were upregulated during arousal compared to torpor. We further observed that the *Dio2/Dio3* mRNA ratio decreased during arousal, indicating reduced local availability of T3 in BAT. In agreement with the reported BHLHE40 increase in squirrel BAT, we observed higher expression of *Period* genes during arousal in European hamsters, supporting a putative role of BAT molecular clock machinery during arousal from torpor.

The hypothalamus coordinates a number of biological functions, including thermal and metabolic processes, circadian organization, sleep, reproduction, and the control of both hibernation and daily torpor (Bratincsák et al., 2007; Jastroch et al., 2016). During torpor, minimal functional brain activity persists to prevent nervous tissue damage and to allow the animal to rapidly and completely recover from hypothermia. Recent studies involved RNASeq analyses of the hypothalamus and cerebral cortex from thirteen-lined ground squirrels (true hibernator) (Schwartz et al., 2013), and of the hypothalamus from Djungarian hamsters (daily torpidators) (Cubuk et al., 2017b), at various stages of torpor or interbout. The results showed different strategies implemented in the hypothalamus and cerebral cortex during hibernation. In the hypothalamus, the differentially expressed genes are involved in protection against DNA damage, protein turnover through ubiquitination, feeding and satiety signalling, seasonal timing mechanisms, and fuel utilization. In the cerebral cortex, the candidate genes are involved in synapse remodelling and plasticity. Among Djungarian hamsters entering torpor, about 1% of the 27,830 identified genes in the hypothalamus are differentially expressed, most of which are involved in metabolic and cellular functions. The majority of the top 20 most downregulated genes encoded transcription factors, which may be responsible for the general suppression of protein synthesis during torpor.

In our study, the European hamster hypothalamus showed the greatest number of candidate genes that were differentially expressed during the hibernation stages. Most were downregulated during torpor/arousal compared to normothermia—particularly genes involved in metabolic processes (*PPAR α* , *PGC1*, *SIRT*, *TXNIP*, and *Dio2*) and genes involved in the core circadian clock (*Bmal1*, *Clock*, and *Rev-erba*). During arousal from torpor, we observed

upregulation of some metabolic (*PPAR α* and *FGF21*) and circadian (*Per2*) genes, as well as *MT2*. Altogether, our data support the metabolic silencing of the hypothalamus during torpor, and suggest the involvement of new timing components in the hibernation processes.

Studies using various transcriptomic approaches have indicated that a rather limited number of genes are differentially expressed during hibernation, depending on species, organs, and hibernation stages. Thus, it appears likely that posttranscriptional and posttranslational mechanisms are also involved in the dramatic changes in body temperature and in other physiological variables that accompany hibernation. A recent large-scale proteomic analysis reveals the surprising relative stability of the proteome throughout the extreme physiological changes of hibernation (Grabek et al., 2015). Most of the observed protein changes are rather limited to seasons, i.e. between the homeothermic and heterothermic periods. If even some of the limited differences in protein abundance according to torpor/arousal cycle are attributed to protein modifications, this indicates that the total protein pool is extremely stable across the hibernation season, despite prolonged fasting and wide variations in metabolic levels.

This stability is not completely unexpected, since the profound temperature-mediated suppression of both transcription and translation machinery during torpor drastically limits the ability to synthesize new gene products. Across the available proteomic screens of hibernator tissues, cytoskeleton regulation was the most consistent signal, possibly associated with the temperature-induced neural retraction and cytoskeletal depolymerisation. This suggests that the most dramatic protein changes associated with the torpor/arousal cycle may be due to post-translational modifications. Notably, protein acetylation rather than phosphorylation appears to be a key component of the torpor/arousal switch. Protein acetylation is globally increased in winter heterothermy relative to summer homeothermy, and acetylation levels are higher during torpor within the torpor/arousal cycle (Grabek et al., 2015; Hindle et al., 2014).

Hibernation is a key process enabling animals to survive harsh natural conditions. Identifying the complex molecular mechanisms orchestrating the extreme changes in hibernation could provide important contributions to the development of therapeutic strategies to improve medical outcomes in a number of conditions, including hypothermic injury, organ transplantation, stroke recovery, cardiac arrest muscle disease, and other ischemia/reperfusion insults. Numerous studies have investigated how torpid animals tolerate cerebral ischemia following dramatic reductions of blood flow and oxygen concentration, display reversible rapid and pronounced synaptic flexibility in which synapses retract during torpor and rapidly re-emerge upon arousal, and retain skeletal muscle mass despite prolonged immobilization and lack of nutrition (Bouma et al., 2012; Dave et al., 2012; Ivakine and Cohn, 2014). There remains much to be learned about the cellular, molecular, and systems-wide mechanisms that protect heterothermic mammals during torpor/arousal cycles, which may guide discovery of new therapeutics.

Strikingly, the previously performed transcriptomic, proteomic, and metabolic studies indicate large inter-species and inter-tissue differences in the involved genes and proteins, highlighting the importance of analysing different hibernating species. Our present study is the first to report gene profiling during torpor/arousal cycles in several organs of the European

hamster. We identified generally downregulated expression of hypothalamic genes, especially those involved in metabolic activity, during the torpor stage, as well as decreased thyroid hormone synthesis in most organs, especially the BAT, during the torpor/arousal stages. Furthermore, we report general upregulation of the core circadian clock genes *Per1* and *Per2* upon arousal, suggesting a possible resetting of body clocks at the start of the active period.

IV. Material and methods

A. Animals

European hamsters (*Cricetus cricetus*) are a well-established hibernating species (Canguilhem and Marx, 1973). The adult male hamsters used in this study were bred in-house (Chronobiotron CNRS-UMS 3415). Animals were individually maintained in cages, and food and water were provided *ad libitum* throughout the study. At the start of the experiment, each hamster was administered isoflurane anaesthesia, and intraperitoneally implanted with a ThermoChron iButton (DS1922L; Maxim, Dallas, TX) to monitor its body temperature.

From July 6th to September 14th in 2015, 24 hamsters were subjected to a short photoperiod (SP) comprising 10 hours of light and 14 hours of dark, with the lights on at 8:00. This induced a winter phenotype characterized by low body weight (mean, 375.6 ± 12 g) and complete gonadal regression confirmed by scrotal palpation. Starting on September 15th, the animals were transferred to a climatic room maintained at 8 °C to induce deep torpor bouts characteristic of European hamster hibernation (Figure 90). Individual hibernating behaviour was followed daily for 3 weeks, after which the animals were euthanized by CO₂ inhalation during the daytime between 10:00 and 17:30. The animals were euthanized during three different phases of hibernation bouts (n = 8/group): normothermia (stable high Tb of ~36 °C for at least 3 days), torpor (stable low Tb of ~9 °C for at least 3 days), or arousal (increasing Tb of between 21–36 °C). The experiment ended on October 28th.

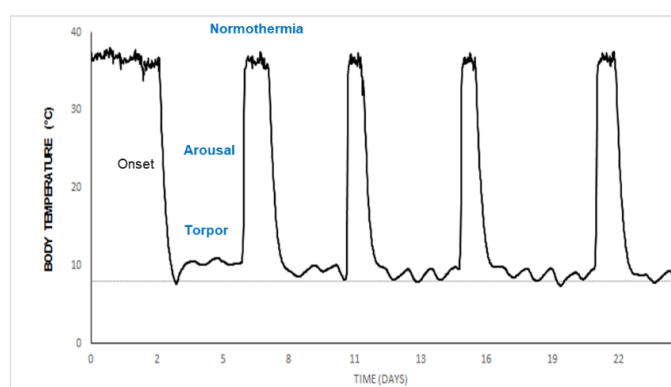


Figure 90 : Typical hibernation pattern of a male European hamster.

The graph shows body temperature variations, measured by intra-peritoneal iButton, over 25 consecutive days in a hamster maintained with a short photoperiod (10 hours of light and 14 hours of dark) at an ambient temperature of 8 °C (dashed line). Tissues were sampled at three different phases of a characteristic hibernation cycle, as determined by body temperature: torpor (8–10°C), arousal (21–31°C), and normothermia (33–36 °C).

Blood was collected and centrifuged at 1,500 *g* for 15 min, and then the plasma was stored at −20 °C until hormonal assay. Eight central and peripheral organs—namely, the cerebral cortex, hypothalamus, pituitary gland, retina, liver, heart, brown adipose tissue, and adrenal glands—were rapidly removed, rinsed in cold Ringer’s solution, frozen in liquid nitrogen, and then stored at −80 °C until gene analysis.

All experimental procedures were approved by a local ethical committee, and authorized by the French direction de la recherche et de l’innovation (authorization number 01546.02). Prior to this study, a preliminary experiment was performed with fewer animals per group, allowing adjustment of the procedure and selection of tissues and genes of interest. Although the results were generally similar, only the data from the second (2015) experiment are presented in this manuscript, due to their greater statistical strength.

B. RNA extraction

Total RNA was extracted using the RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer’s protocol. Briefly, a sample of each organ (100 mg when possible) was added to 1 mL QIAzol Lysis Reagent, along with one 5-mm stainless steel bead (Qiagen, Valencia, CA, USA). The tissue samples were disrupted, and homogenized for 2 min at 20 Hz using the tissue lyser. Then the homogenates were incubated at room temperature (RT) for 5 min, followed by addition of 200 µL chloroform (Sigma, St. Louis, USA). Next, the homogenates were centrifuged at 12,000 *g* for 15 min at 4 °C. The upper aqueous phase containing RNA was transferred to a new tube, and final step was performed using the QIAcube protocol: RNeasy lipid Animal tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA was stored at −80 °C until use.

C. Cloning of genes of interest

Since few *Cricetus cricetus* gene sequences are published (*Database Resources of the National Center for Biotechnology Information*), the genes of interest were partially sequenced (about 500 bp) to enable the design of specific ddPCR assays.

European hamster hypothalamus total RNA (5 µg) was converted into cDNA using oligo dT primers and the PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA) following the manufacturer’s instructions. The polymerase chain reaction (PCR) was performed using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) following the manufacturer’s protocol. The 50-µL reaction mix comprised 1 µL template cDNA, 5× Q5 reaction buffer, 10 mM dNTPs, 10 µM forward primer, 10 µM reverse primer, Q5 high-fidelity DNA polymerase 0.02 U/µL, and 5× Q5 high GC enhancer. Sequences extracted from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were used to design 21 gene-specific primer pairs (Table 7). Amplicons were separated in 1% agarose gels stained with ethidium bromide, and the gel bands were visualized using U Genius (Syngene, Frederick, USA). If multiple bands were observed, the PCR products were purified using the high pure purification kit (Roche Mannheim, Germany). The eluted DNA was inserted into a blunt pJET vector using

the CloneJET PCR cloning kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), and transformed into DH10 β chemically competent *Escherichia Coli* cells (NEB, Ipswich, MA, USA).

Forward and reverse sequencing reactions were performed using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) using vector primers for amplification. Sequencing products were purified using the BigDye XTerminator® Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), and analysed using an ABI 3730 XL Automated Sequencer (Applied Biosystems). Data analysis was performed using Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA). The *Cricetus cricetus* sequences of the nineteen non-published genes of interest were partially cloned and sequenced, and the results have been submitted to GenBank (Table 7).

Genes	Reference sequences for primers design ¹	Forward Primer Sequences ²	Reverse Primer Sequences ³	<i>Cricetus cricetus</i> GenBank Accession Numbers ⁴
Per1	NM_001034125.1: <i>Rattus norvegicus</i> period circadian clock 1 (Per1)	TGTGCACCCCTGGAGCCGCAAGG	TTTCTTGGCCCCCACAGGAAGT	MG598318: [<i>Cricetus cricetus</i>] period circadian clock 1 (Per1) mRNA, partial CDS
Bmal1	AB012600: <i>Rattus norvegicus</i> mRNA for BMAL1b	TAAAACGGATATAACCCCTGGGC CTGCCCTCTGGAGAAGGTGGCCC	TCTGGTTCCCCCTGGAATGCCTG ACCCAGCCCCGCATCTGCTTCCA	MG598320: [<i>Cricetus cricetus</i>] Bmal1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like (Arntl) mRNA, partial CDS
Rev-Erba	XM_003498212.2: <i>Cricetulus griseus</i> nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2 (Nr1d2)	GCTCTAACTCTGATGCCAACGG	GCTTTTGAGGTTTTCTTGCTCCAG	MG598307: [<i>Cricetus cricetus</i>] Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2) mRNA, partial CDS
Clock	XM_016980269: <i>Cricetulus griseus</i> clock circadian regulator (Clock)	TCAATTGTTGACAGAGATGACAGTAG	TCTATTGTTCTCGAAGCATGTGAC	MG598315: [<i>Cricetus cricetus</i>] circadian locomotor output cycles protein kaput (Clock) mRNA, partial CDS
Per2	XM_007622995: <i>Cricetulus griseus</i> period circadian clock 2 (Per2)	ACTGTGATGACAATGGGAAGGAGCT	ATGGAGGCAACTTGGTTAGAGATGT	MG598316: [<i>Cricetus cricetus</i>] Period circadian protein 2 (Per2) mRNA, partial CDS
MT₁	U14110.1: <i>Phodopus sungorus</i> melatonin receptor (Mel-1a)	ATGAAGGGCAATGGTAGCACTCTGCTCAAT GCC	CCGTATATAATTGCATTGAGGCAGCT G	MG598322: [<i>Cricetus cricetus</i>] Melatonin receptor 1A (Mtnr1a) mRNA, complete CDS
MT₂	NM_145712.2: <i>Mus musculus</i> melatonin receptor 1B (Mtnr1b)	TTGTTTGTGGTGAGTCTGGTCTTGG	GCCCATAGACAATGACGTTAAGGCA G	MG598323: [<i>Cricetus cricetus</i>] Melatonin receptor 1B (Mtnr1b) mRNA, partial CDS
GPR50	XM_007631612: <i>Cricetulus griseus</i> G protein-coupled receptor 50 (Gpr50)	CCGAAGTGGCTGTATCTTGACG	TCATACAGCCATCTCATCAGAA	MG598317: [<i>Cricetus cricetus</i>] G protein-coupled receptor 50 (Gpr50) mRNA, partial CDS
QR2	XM_007638944.1: <i>Cricetulus griseus</i> NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2 (Nqo2)	TGGCAGGTAAGAAAGTGCTCATC/ TCACTGGTTCCCTCTCTAATCCTG	TCTTCAGCCGCTTCGCCCATGATGC/ TCTTCAGCCGCTTCGCCCATGATGC	KT992792: [<i>Cricetus cricetus</i>] NAD(P)H dehydrogenase quinone 2 mRNA, partial CDS
Tubulin	NM_001243978: <i>Cricetulus griseus</i> tubulin, alpha 1A (Tuba1a)	ACACCTTCTTCAGTGAGACAGGCG	CCCAAAGATGTCAATGCTGCC	MG598321: [<i>Cricetus cricetus</i>] tubulin alpha 1B (Tuba1b) mRNA, partial CDS
Actin	NM_001244575: <i>Cricetulus griseus</i> actin beta (Actb)	CCCATTGAACACGGCATTGTC	CGACATCCGCAAAGACCTCTATG	MG598319: [<i>Cricetus cricetus</i>] actin beta (Actb) mRNA, partial CDS
SIRT1	XM_005070811.1: <i>Mesocricetus auratus</i> sirtuin 1 (Sirt1)	GTCATAGGTTAGGTGGTGAATATGCC	CACAGGAAGTAGAGGATAAGATGTC GTC	MG598314: [<i>Cricetus cricetus</i>] sirtuin 1 (Sirt1) mRNA, partial CDS
TXNIP	XM_003498621.2: <i>Cricetulus griseus</i> thioredoxin interacting protein (Txnip)	CGACTCAGGAGGCAAAGAAAAAC	CAATCACCAGGGGAAGGTCAAG	MG598310: [<i>Cricetus cricetus</i>] Thioredoxin interacting protein (Txnip) mRNA, partial CDS.
PPARα	XM_007621010.1: <i>Cricetulus griseus</i> peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara)	GAATAAGTGCCAATACTGCCGC	CATACGCTATCAGCATCCCGTC	MG598312: [<i>Cricetus cricetus</i>] Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara) mRNA, partial CDS
PGC1α	XM_007620649.1: <i>Cricetulus griseus</i> peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (Ppargc1a)	TTTGATGTGTGCCTTCTTGC	GGTGTAACGGTAGGTGATGAAACC	MG598311: [<i>Cricetus cricetus</i>] Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (Ppargc1a) mRNA, partial CDS.
FGF21	XM_007638697.1: <i>Cricetulus griseus</i> fibroblast growth factor 21 (Fgf21)	TGGACTGGATGAAATCTGGAGTTG	AAGGTCCCACCATGCTCAGTGG	MG598309: [<i>Cricetus cricetus</i>] Fibroblast growth factor 21 (Fgf21) mRNA, partial CDS
Ob-R	XM_007632623.1: <i>Cricetulus griseus</i> leptin receptor (Lepr)	GCCTGTCTTCCAGAGAATAACCTTC	CGGCACTCACTTTACTCATTGGC	MG598308: [<i>Cricetus cricetus</i>] Leptin receptor (Lepr) mRNA, partial CDS
UCP1	NM_001281332.1: <i>Mesocricetus auratus</i> uncoupling protein 1 (Ucp1), mRNA	TCTACGATACTGTCCAGGAGTACTTC	CAGTCCACCGTCTGCCTCGACT	MG598313: [<i>Cricetus cricetus</i>] Uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA, partial CDS

Table 7 : Sequences of the forward and reverse primers used to clone European hamster genes of interest

. To obtain the sequences of the unpublished genes of interest, forward² and reverse³ primers were designed using published sequences¹. These sequences have been submitted to GenBank⁴.

D. Digital droplet PCR

Primers and probes for the digital droplet PCR assay were designed using the Universal Probe Library (UPL) assay design centre: https://lifescience.roche.com/en_fr/brands/universal-probe-library.html (Roche Mannheim, Germany). Previously cloned *Cricetus cricetus* sequences were used as references. For technical reasons, custom assays from Biorad (Hercules, CA, USA) were used for the *clock* and *fgf21* genes.

RNA samples were directly partitioned using the One-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (Biorad, Hercules, USA). One-step RT-PCR reactions were carried out in a total volume of 22 μL , including 2–3 μL RNA (based on the RNA concentration), 5.5 μL super mix, 2.2 μL reverse transcriptase (20 U/ μL), 1.1 μL DTT (300 mM), 0.6 μL forward and reverse primers, 0.55 μL probes, and molecular grade RNase-free water (Table 8). Droplet generation was performed using an automated droplet generator (Biorad, Hercules, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. The thermal cycling conditions comprised 60 min reverse transcription at 50°C, and 10 min enzyme activation at 95 °C; followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 sec, and extension at the specific gene annealing temperature for 70 sec (Table 8); and finally 10 min enzyme deactivation at 98 °C using the CFX96 touch real-time PCR detection system (Biorad, Hercules, CA, USA). All steps used a ramp rate of 2 °C/sec. Subsequently, the droplets were analysed using the QX200 droplet reader (Biorad, Hercules, CA, USA). Figure 91 shows an example of ddPCR results for *Per2* mRNA data measured in the hypothalamus.

Legend Figure 91

Using ddPCR, the exact number of *Per2* mRNA copies was quantified in hypothalamus tissue samples obtained from European hamsters at three different stages of the hibernation cycle (n = 8 from each stage): normothermia, torpor, and arousal. The graph on the left side depicts the calculated concentration of *Per2* mRNA copies/ μL for each animal in each hibernation stage. The graph on the right side shows the fluorescence intensity of droplets in terms of the droplet number for each sample. QuantaSoft software was used to calculate the numbers of droplets containing *Per2* mRNA (blue) or not containing *Per2* mRNA (grey) in each sample.

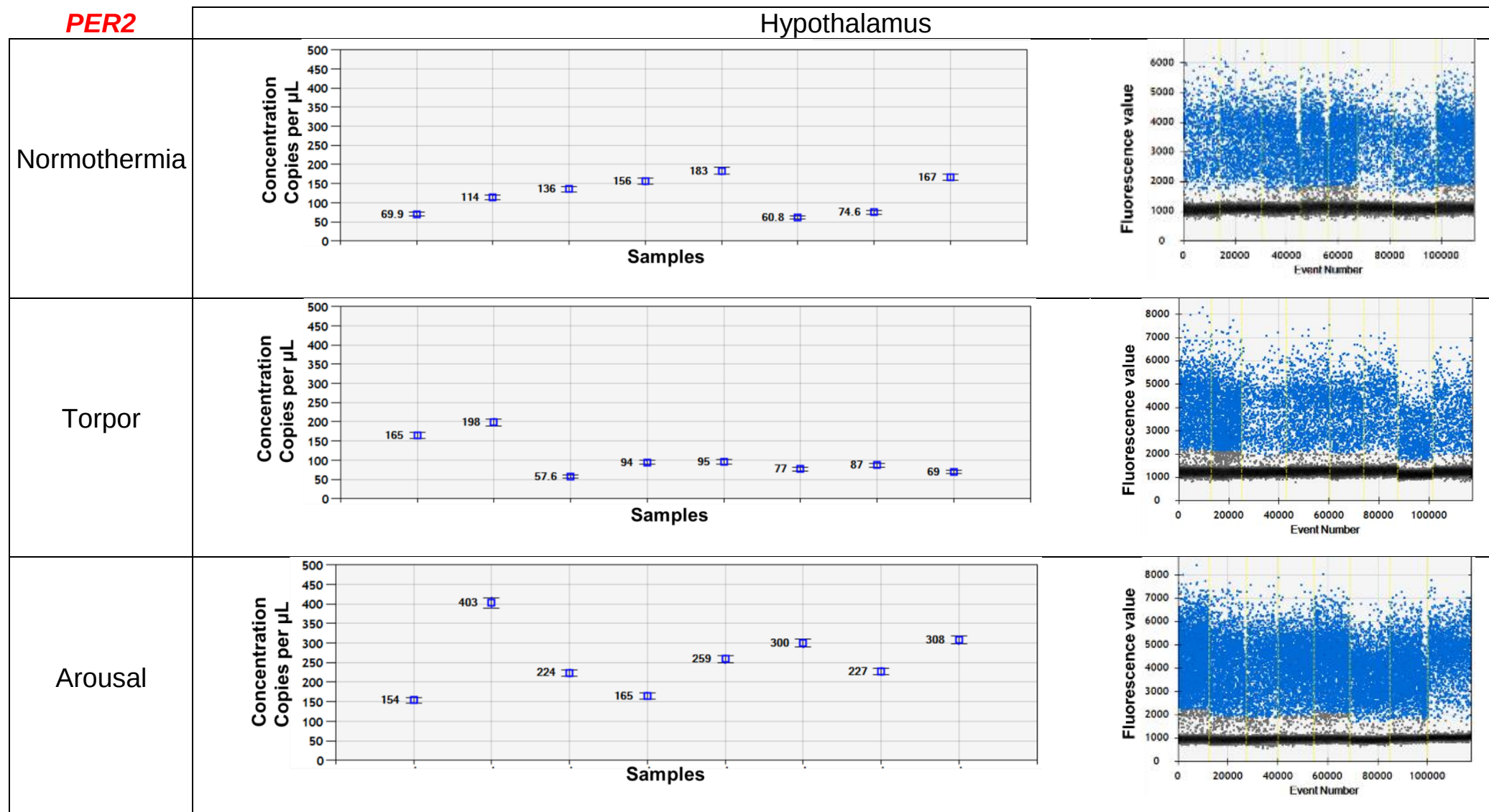


Figure 91 : Typical example of digital droplet PCR (ddPCR) mRNA quantification.

Genes	Probes ¹	Probe References ²	Forward Primer Sequences ³	Primer Reverse Sequences ⁴	RNA Quantity (ng) ⁵	Annealing temperature (°C) ⁶
<i>Per1</i>	UPL 63	4688627001	CCAGCACAACAAAGCGTAAA	TCAGAGGCTGAGGAAGCAGT	1	57
<i>Bmal1</i>	UPL 56	4688538001	CCAACCTTCCCACAGCTTAC	CCTGGAATGCCTGGAACA	5	57
<i>Rev-Erba</i>	UPL 150	4694368001	TGTCTGTCAGTGGAATGTCA	CTCTGTTTCTCACGCTTAGGAAT	1	57
<i>Clock</i>	AATGAAGTTACACTCTCAGATACAT	NA	CCACAAGATCAGATGGTA	TAGCGATCATGACAGATG	50	51
<i>Per2</i>	UPL 161	4694481001	CTTCTTGTCTGCAGGGAGGT	TGTCCTTATCAGTTCTTTGTGTGC	10	55
<i>MT1</i>	UPL 145	4694317001	CCCTCTGCTACGTGTTCTG	GAGTCCGGTTTGCAGATTG	150	59
<i>MT2</i>	UPL 131	4694155001	TGTGGTGAGTCTGGTCTTGG	AGGATCAGTGGGTAAGGGTACA	100	57
<i>GPR50</i>	UPL 86	4689119001	GCTGGCTCTTCTCTAAGCA	GGCTGGTAGCAGGCTTAATG	150	55
<i>QR2</i>	UPL 68	4688678001	AAGACAGCTCTGACCAGTGACA	CTAGATCAGCTTCTTGACCTTC	5	59
<i>Tubulin</i>	UPL 78	4689011001	GAGCGGCTCTCTGTGCGATTA	GGGGCTGGGTAGATGGAG	0.01	59
<i>G6PD</i>	UPL 30	4687639001	TGTGGCAAAGCCCTGAAT	TGCCACATCTCGGAACTGTA	5	55
<i>Actin</i>	UPL 9	4685075001	GCTATGAGCTGCCTGATGG	GGCTGGAAAAGAGCCTCA	0.1	57
<i>SIRT1</i>	UPL 68	4688678001	GAAAGTGCTGGCCCAATAGA	GATTACCATCAAGCCGCTTACTA	5	57
<i>TXNIP</i>	UPL 125	4693604001	CCTTGCTGATCTATGTTAGTGTCC	TCACCAGGGGAAGGTCAA	1	57
<i>PPARα</i>	UPL 56	4688538001	CGGTGTGTATGAAGCCATATTC	ATCAGCATCCCGTCTTTGTT	1	57
<i>PGC1α</i>	UPL 41	4688007001	GTAGGCCCAGGTATGACAGC	CCTTTCAGATTCCCGTTTCTC	1	57
<i>FGF21</i>	ACACTGAAGTCCACCTGG	NA	ACCTCTACACAGATGACA	GGTTGTTGGCAAAGAAC	100	58
<i>Ob-R</i>	UPL 113	4693477001	CGCAGGAGATCAGACCAATC	ATTGATGGCCAGAACCGTAA	100	57
<i>Dio2</i>	UPL 22	4686969001	CCACCTTTCAGTAGGCAACTG	AGTCGGCCACTGATGAGAAC	10	57
<i>Dio3</i>	UPL 135	4694198001	GCACCTAACTCGGAGGTCAT	ATAGTCGAGGATGCGCTGTC	100	57
<i>RBM3</i>	UPL 65	4688643001	TGGAAGCGGAAGATATGACA	TCTCTGGACCGCCCATATC	1	57
<i>UCP1</i>	UPL 21	4686942001	GGCAACCTACTGAGGTCGTG	ATCGGGGTTTGATCCCATA	0.1	57

Table 8 : Primer/probe sequences, RNA quantity, and annealing temperatures for digital droplet PCR (ddPCR).

Each ddPCR reaction requires probes^{1,2}, forward³ and reverse⁴ primers, and determination of the optimal RNA quantity⁵ and annealing temperature⁶ were determined.

E. Hormone analysis

Circulating hormone concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Plasma melatonin was extracted with chloroform, and then measured using an RIA that was previously validated in European hamsters (Garidou et al., 2003). The thyroid hormones T3 and T4 were extracted with a 2:1 mixture of chloroform:methanol, purified by anion exchange chromatography, eluted with 70% acetic acid, and then measured by RIA as previously described (Reyns et al., 2003). Plasma leptin was measured using a direct multi-species RIA kit (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), insulin using a hamster ELISA kit (Crystal Chem, Downers Grove, USA), and plasma glucose concentration using the colorimetric glucose GOD-PAP method (Biolabo, Maizy, France).

F. Data and statistical analysis

Raw ddPCR data were analysed using QuantaSoft software v. 1.5.38.1118 (Biorad, Hercules, USA). Raw data were normalized against the initial quantity to obtain equivalent copy numbers for 100 ng total RNA. Statistical analyses were performed using R Program Writer software 3.3.1 (<http://www.r-project.org/>). Within-dataset variability was explored using two-dimensional principal component analysis (PCA) with the FactoMineR package, to identify the subset of genes showing the greatest differential expression in relation to several factors, including the organ and the hibernation phase. Data analysis was performed for each organ, considering the main factors influenced by expression of the genes.

Using R software, Kruskal-Wallis analysis was performed on normalized counts to determine the global effect of hibernation phases on individual gene expression in a given tissue type. Then raw *P* values from each model were adjusted for multiple testing, using Benjamini-Hochberg correction to control the false discovery rate. Genes were considered differentially expressed if the adjusted *P* values were below 0.05. Dunn's post-hoc analysis test was used to compare further subgroups of hibernation phases.

The results of hormone measurements are presented as mean $\pm$ SD. Data were analysed using the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. Statistical significance was set at $P \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Supplementary tables

Organs	Genes	Adjusted <i>P</i> values
Heart	Per2	0.002
Liver	MT2	0.006
Liver	ObR	0.006
Liver	Tubulin	0.006
BAT	Dio2	0.008
BAT	Per2	0.008
Retina	FGF21	0.008
Retina	Per2	0.009
Retina	PPAR α	0.009
Hypothalamus	PGC1 α	0.01
Hypothalamus	PPAR α	0.01
Hypothalamus	Tubulin	0.01
Hypothalamus	Actin	0.011
Hypothalamus	G6PD	0.011
Hypothalamus	Per2	0.011
Hypothalamus	Bmal1	0.011
Hypothalamus	RBM3	0.011
Hypothalamus	Rev-Erba	0.011
Hypothalamus	MT2	0.012
BAT	PPAR α	0.013
Adrenal glands	FGF21	0.013
Adrenal glands	Per2	0.013
Cortex	Per2	0.014
BAT	Dio3	0.014
Hypothalamus	Clock	0.015
Hypothalamus	QR2	0.015
Hypothalamus	SIRT1	0.015
BAT	MT2	0.016
Liver	Per1	0.018
Heart	Per1	0.019
Heart	Tubulin	0.019
Hypothalamus	Dio2	0.019
Pituitary gland	Per1	0.022
Pituitary gland	Dio2	0.025
Pituitary gland	Per2	0.025
Pituitary gland	QR2	0.025
Retina	Bmal1	0.028
Retina	MT2	0.028
Retina	Per1	0.028
Retina	QR2	0.028
Retina	Tubulin	0.028
Hypothalamus	Per1	0.031
Pituitary gland	Bmal1	0.032
Pituitary gland	Tubulin	0.032
Adrenal glands	Per1	0.036
Cortex	Per1	0.037
BAT	Per1	0.038
Hypothalamus	TXNIP	0.038
Heart	Rev-Erba	0.039
Pituitary gland	Rev-Erba	0.041
Pituitary gland	Clock	0.041
Pituitary gland	FGF21	0.041
Pituitary gland	TXNIP	0.041
Liver	Per2	0.041
Heart	Actin	0.042
Heart	Dio2	0.042
Heart	TXNIP	0.042
Hypothalamus	FGF21	0.042
BAT	SIRT1	0.045
Liver	FGF21	0.048
Cortex	Dio2	0.049

Table 9 : The 61 genes showing significant differential expression according to hibernation state (Kruskal-Wallis, adjusted *P* values ≤ 0.05) in an analysed tissue. Genes are ranked by adjusted *P* values.

	Normothermia	Torpor	Arousal
T3 (pmol/ml)	1,20 ± 0,18	1,08 ± 0,20	1,02 ± 0,12
T4 (pmol/ml)	28,19 ± 4,85	19,31 ± 2,68	17,69 ± 3,54
Glucose (mmol/ml)	5,70 ± 2,69	3,42 ± 0,78	4,32 ± 1,74
Insulin (ng/ml)	1,70 ± 0,99	0,80 ± 0,41	1,76 ± 1,38
Leptin (ng/ml)	28,30 ± 8,05	14,28 ± 4,99	27,69 ± 7,06
Melatonin (pg/ml)	23,16 ± 27,78	18,83 ± 10,22	37,67 ± 38,71

Table 10 : Plasma hormone levels (means± SEM) of European hamster during the hibernation cycle (n=5-8).

Acknowledgements

We thank Dr. Pierre Ducrot for his contribution to our data analysis.

Author contributions

C.G., B.B., D.C., A.G., C.D., G.L., C.B., I R.F., J.P.S., O.N., performed research; C.G., D.V., J.A.B., V.S. and S.P.G analysed data; and G.C., J.A.B., S.P.G. and V.S. designed the research and wrote the paper.

Additional Information

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests

Data availability: The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author (Jean A Boutin jean.boutin@servier.com) upon reasonable request.

Supplementary information accompanies this paper.

“THE MOLECULAR PATH” FOR CLONING THE EUROPEAN HAMSTER MELATONIN RECEPTORS 1 AND 2

Célia Gautier^{1,2}, Emilie Dufour¹, Clémence Dupré¹, Giulia Lizzo¹, Sarah Caignard¹, Isabelle Riest-Fery¹, Chantal Brasseur¹, Céline Legros¹, Philippe Delagrangé¹, Olivier Nosjean^{1,3}, Valérie Simonneaux², Jean A. Boutin^{1,3}, Sophie-Pénélope Guenin¹.

¹ PEX Biotechnologie Chimie & Biologie, Institut de Recherches Servier, Croissy sur Seine, France

² Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

³ Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France

*Corresponding author: Email: jean.boutin@servier.com (JAB)

Abstract

For many years, it was interesting to have as many as possible diverse sequences encoding melatonin receptors MT₂, from various species. After having published the basic molecular pharmacology of human, rat, mice and sheep MT₁ and MT₂ receptors, we started a series of cloning from other animals such as birds, bats or viper, as well as platypus. The goal beyond was to be able to advance on the route of receptor crystallization for which a deep knowledge of the sequence/stability relationship might greatly help such difficult processes. Because some hamster genera have been shown to express a non-functional melatonin receptor MT₂, we aimed here at completing that observation with one more gender of hamster: European hamster (*Cricetus cricetus*). Indeed, we observed that unlike other hamsters, particularly the Siberian hamster, European hamster does not have a stop codon in the sequence of this particular melatonin receptor. We thus embarked in a tedious task of cloning that particular, functional receptor. We succeeded partially in this task, with a complete exon 2 and fragment of the exon 1. If MT₁ was expressed and characterized for its molecular pharmacology, the MT₂ sequence was only partial (from putative amino acids 12 to 38 and 77 to 323). We thus designed a chimeric MT₂ receptor using a consensus sequence for the elusive part of the receptor that we were not able to clone. This chimeric construct binds melatonin in a nanomolar range. This work lays the basis for further attempts to access the complete natural sequence of European hamster MT₂ receptor. The present work is the first to show that all the hamsters are not natural knock-out for this receptor.

I. Introduction

Melatonin is a neurohormone, produced only at night by the pineal gland of all mammals (Klein, 1985). It is also present in the plant kingdom where it seems to play an active antioxidant role (Kolář et al., 1997; Nawaz et al., 2016). In mammals, its main role is the transmission of the night/day rhythm from the central clocks to the peripheral organs (Coomans et al., 2015; Lincoln et al., 2006). As such, it is a key player for many physiological processes and it has been shown that melatonin may very well be having many positive effects on numerous pathologies including depression, leading to development of the melatonin receptor-targeting antidepressive drug agomelatine (Valdoxan®) (de Bodinat et al., 2010; Millan et al., 2003). The message of melatonin is transferred into cells essentially by two G-Protein-coupled receptors, MT₁ and MT₂, the molecular pharmacology of which has been reported in human, rat, mice, sheep, among others (Audinot et al., 2008; Cogé et al., 2009; Devavry et al., 2012; Jockers et al., 2008). It is also possible that these actions are also mediated by two other protein targets: an elusive nuclear receptors (Becker-André et al., 1994; Jan et al., 2011) well as a cytosolic protein identified as MT₃ binding site (Nosjean et al., 2000).

The need for a complete description of the receptors in different species was made important due to the attempt of finding agonists that would have therapeutic properties, and their mechanism of action (Liu et al., 2016). It might seem fallacious to turn descriptive experiments into a Noah ark-type of description on a given pharmacological system, but it must be recalled that in some instances differences in molecular pharmacology between various laboratory species or with human turn into a nightmare for the pharmacologist, see for example histamine H₃ receptor pharmacology throughout species (Chen et al., 2003) or adenosine receptor species-dependent characteristics if agonists and antagonists (Alnouri et al., 2015).

Furthermore, the search for structural biology data on receptors, led also to the scrutiny of the sequence/stability relationship between receptor sharing a common function but dispersed in various species. Indeed, the thermostability of those melatonin receptors which, by definition, share the affinity for melatonin is interesting because it could help finding more stable receptor that would be favorable to crystallization. This idea prompts us to clone different melatonin receptors from different species (viper, birds, bats, platypus) in order to conduct not only a particular study on thermostability of those receptors, but also a process of purification, as we recently published (Logez et al., 2014, 2016).

As mice and rats are nocturnal animals it was also important to be able to possess information onto a diurnal species, such as sheep on which depressive models have been described. Sheep was considered by the melatonin community as a natural knock-out for MT₂. After the publication of a paper on a non-common sheep strain (Xiao et al., 2007), we embarked in the painful cloning of the ovine MT₂ receptor in that species and ended up by describing its molecular pharmacology (Cogé et al., 2009).

But one of the earliest works on melatonin receptors was done on yet another animal species: the hamster. Hamster is a family of rodents belonging to the subfamily *Cricetinae*. It contains 25 species gathered in 6 or 7 genera. These animals are crepuscular in the wild and remain underground during the day, essentially to avoid predators. They can be found almost

everywhere in the world. The genera are *Mesocricetus* (e.g. Syrian or golden hamster), *Phodopus* (e.g. Djungarian hamster), *Cricetus* (e.g. European hamster), *Cricetulus* (e.g. Chinese hamster), *Allocricetulus* (e.g. Mongolian hamster), *Cansumys* (e.g. Gansu hamster) and *Tscheskia* (e.g. Korean hamster). Neumann *et al* have carefully studied their genetic relationship (Neumann *et al.*, 2006). Weaver *et al* initiated in 1990 the cloning of MT receptors in Siberian hamsters. If they found the MT₁ to be complete and operational, the MT₂ was not (Weaver *et al.*, 1996). It comprises two nonsense mutations within the coding region, preventing it to be functional. Therefore, ever since this seminal work, hamster has been considered as a natural knock-out of MT₂ receptor, despite the fact that the family comprises several genera and that all were not checked for these mutations.

In the present work, we were interested in finding if the European hamsters (*Cricetus cricetus*), a well-established hibernator (Canguilhem and Marx, 1973) were mutated in the same way. After finding that the stop codon was absent from its sequence, we attempted to clone this missing receptor. To do so, we tested numerous reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) conditions. We only partially succeeded, as the full sequence was not obtained despite the many attempts made, but we managed to construct a chimeric sequence, based at 85% on the cloned *Cricetus cricetus* MT₂ sequence, and a few amino acids at the N-terminus built upon a consensus sequence obtained from various closely related animals. We also cloned and characterized of the *Cricetus cricetus* melatonin MT₁ receptor.

II. Materials and Methods

A. Animals, tissue collection

1. European hamster

European hamsters (*Cricetus cricetus*) are well-established hibernator bred in-house (Chronobiotron, CNRS-UMS 3415). Adult male hamsters were individually maintained in cages with food and water given *ad libitum* during all the study. Some hamsters were maintained in long photoperiod (14 h light and 10h dark) at 20°C ambient temperature. Animals were euthanized by CO₂ inhalation during the day. Other animals were transferred to a short photoperiod consisting of 10 h light and 14h dark (lights on at 8 am) to induce a winter phenotype characterized by low body weight and complete gonadal regression attested by scrotal palpation. At the beginning of the experiment, each hamster was intraperitoneal implanted under isoflurane anesthesia with a thermochron iButtons (DS1922L, Maxim, Dallas, TX) in order to follow its body temperature. Hibernating animals were euthanized by CO₂ inhalation, during torpor phases illustrated by low body temperature (8-10°C). For both groups, organs (brain, retina, hypothalamus, heart, liver) were rapidly removed, rinsed in cold Ringer, frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until gene analysis. Experimental procedures were verified by a local ethical committee and authorized by the French Direction de la Recherche et de l'Innovation (authorization number 01546.02).

2. Siberian hamster

Males Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) were bred in-house (Chronobiotron, CNRS-UMS 3415). Adult male hamsters were individually maintained in cages with food and water given *ad libitum* during all the study. Hamsters were maintained in short photoperiod (10 h light and 14 h dark) at 20°C ambient temperature. Animals were euthanized by CO₂ inhalation. Brain and retina were rapidly removed, rinsed in cold Ringer, frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C until cloning.

B. RNA extraction

Total RNA was extracted using the RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer’s protocol. Briefly, 100 mg of each organ (when possible) were added to 1ml QIAzol Lysis Reagent and one 5 mm stainless steel bead (Qiagen, Valencia, CA, USA). Tissues were disrupted, homogenized using the tissue lyser for 2 min at 20 Hz, and homogenates were incubated at room temperature (RT) for 5 min. then 200µL of chloroform (Sigma, St. Louis, USA) were added. After incubation for 5 min at RT, the homogenates were centrifuged at 12000g for 15 minutes at 4°C. The upper aqueous phase containing RNA was transferred to a new tube and the end of the protocol was performed using the QIAcube’s protocol: RNeasy lipid: Animal tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA). Total RNA extracted were stored at -80°C until use.

C. Cloning of *Phodopus sungorus* MT₂ receptor

Phodopus sungorus retina total RNA (1 µg) were converted into cDNA using SMARTer® RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 5’/3’ Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA) according to the manufacturer instructions. cDNAs were used in PCR amplification reactions with the SMART® RACE kit universal primer mix (UPM) and gene specific antisens exon 2 primers (5’ GACGTGGTGGTAGGTTGCACTGT 3’) designed on the *Phodopus Sungorus* (U57555) sequence. PCR reaction was performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) following the manufacturer’s protocol. PCR conditions were as follows: 5 cycles: 94 °C 30 sec, 72°C 3 min, 5 cycles: 94 °C 30 s, 70°C 30 s, 72 °C 3 min, and 25 cycles: 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min. Using a dilution of the first PCR product (1/10), a second PCR was performed using the KAPA 2G Robust PCR Kit (Kapa Biosystems Wilmington, USA). The following reverse primer 5’ CTGGCTTTGTAGTGGGCCTCTC 3’ was used with the UPM primers as forward. The last PCR reaction was performed, in the same way, using a dilution of the second PCR product and the following primers as reverse 5’ CTGGCTTTGTAGTGGGCCTCTC 3’ or 5’ CATCCAAGGCCAGACTCACCACAA 3’. To confirm the results obtained by 5’RACE experiments, primers were designed on the sequence obtained. Forward primers were designed around the putative start methionine and reverse primers on the end of the exon 2.

Phodopus sungorus brain total RNA (5 µg) providing were converted into cDNA with oligo dT using PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio USA, Mountain View,

USA) according to the manufacturer's instructions. PCR reaction was performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) following the manufacturer's protocol with the following primers (Table 11).

Forward primers	Reverse primers
ATGCCTGAGAACAGTTCTGTGCCAATTGCTGCG	CCAGATTCACAGGTAGCAGAAGGATAC
GCTGCGAGGCTGGTGGGCTGGCAGTGCGCT	CCGTAGACAATGGCGTTAAGGCAGCT

Table 11 : Primers used to confirm the sequence of the *Phodopus sungorus* MT₂ receptor obtained by 5'RACE.

D. Cloning of *Cricetus cricetus* MT₁ receptor

Cricetus cricetus liver or heart total RNA were converted into cDNA with oligo dT primers using PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA) according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers for MT₁ gene were designed from *Phodopus sungorus* (U14110), *Mus musculus* (NM_008639) and *Cricetulus griseus* (XM_003507458) sequences (Table 12). PCR reactions were performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) or Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Forward primers	Reverse primers
TGCGCTGCGGTGAGACACCCAGGGGACC	GCGTTCCTGAGCTTCTTGTGTC
ATGAAGGGCAATGGTAGCACTCTGCTCAATGCC	GCGTTCCTGAGCTTCTTGTGTC
ATGAAGGGCAATGGTAGCACTCTGCTCAATGCC	CCGTATATAATTGCATTGAGGCAGCTG
CCGCTACTGCTACATTTGCCACAGTCTC	CCGTATATAATTGCATTGAGGCAGCTG
CAGGAAATATATTGTGGTGAG	TAAACAGAGTCCACCTTTA
GTACTTTTGTCTATTTGCTGGGC	AAGACCCCAACCAGTGTGGATAATC

Table 12 : Pair of primers used for the amplification of the *Cricetus cricetus* MT₁ gene.

E. Cloning of *Cricetus cricetus* MT₂ receptor

1. Cloning of a partial fragment of *Cricetus cricetus* exon 1 MT₂ receptor

Cricetus cricetus hypothalamus total RNA (5 µg) providing from hibernating animal were converted into cDNA with oligo dT using PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA) according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers for MT₂ gene were designed from both *Phodopus sungorus* (see above) and *Peromyscus maniculatus bairdii* (XM_006990545.1) sequences. The primers sequences were for the forward primers 5' ATGCCTGAGAACAGTTCTGTGCCAATTGCTGCG 3' (labelled F0); 5' GCTGCGAGGCTGGTGGGCTGGCAGTGCGCT 3' (labelled F3) and for the reverse primer 5' GAGCACAGAGAGGATGACAAGGA 3' (labelled R198). Forward primers are designed on the on the start codon while the reverse primer is designed in the transmembrane domain 1.

PCR reactions were carried out in 50µL using the KAPA HiFi HotStart PCR Kit (Kapa Biosystems Wilmington, USA) containing 2µL cDNA, KAPA HiFi Buffer GC 1X, dNTP 0.3mM, primers 0.3µM, KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase 0.5 U. PCR conditions were as follows: 95 °C 5 min, 10 cycles: 98 °C 20 s, 72°C–1 °C/cycle 15 s, 72 °C 1 min, and 30 cycles: 98 °C 20 s, 65 °C 15 s, 72 °C 1 min, followed by 1 min at 72 °C. When needed a second amplification was performed using the same conditions and primers and the first PCR product used as template (1:10).

In order to complete the sequence of the exon 1, we designed reverse primers before the putative intron. Primers were designed from both *Phodopus sungorus* and *Peromyscus maniculatus bairdii* (XM_006990545.1) sequences. PCR reactions were carried out with the F0 and F3 forward primers using the same conditions described just above (Table 13).

Forward primers	Reverse primers
ATGCCTGAGAACAGTTCTGTGCCAATTGCTGCG (F0)	CGCAGCTTGCGGTTCTGAGCAC
	CGCGTTCCGCAGCTTGCGGTTCC
GCTGCGAGGCTGGTGGGCTGGCAGTGCGCT (F3)	CGCAGCTTGCGGTTCTGAGCAC
	CGCGTTCCGCAGCTTGCGGTTCC

Table 13 : Primers used in order to amplify the exon 1 of *Cricetus cricetus* MT₂, reverse primers located on exon 1 primers.

Other reverse primers were designed in the transmembrane domain 4 and in the 3'UTR region of the transmembrane domain 7. The forward primer was designed in the transmembrane domain 1. Oligonucleotide primers for MT₂ gene were designed from both *Phodopus sungorus* (see above) and *Peromyscus maniculatus bairdii* (XM_006990545.1) sequences (Table 14). *Cricetus cricetus* hypothalamus total RNA (5 µg) providing from hibernating animal were converted into cDNA with oligo dT using Super Script III First Strand Synthesis System for RT PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed in 50 µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA).

Forward primers	Reverse primers
TGTCGTGGGGAACCTCCTTGTCATCCTC	AGAGTGAGGAGCCAGACGAGGGTGATG
	CAAGGCAGCATTTGGAAGATTCATGGAAGCAG

Table 14 : Primers used in order to amplify exon 1, reverse primers located on the exon 2.

2. 5'RACE cloning of *Cricetus cricetus* MT₂ receptor

Cricetus cricetus brain total RNA (1 µg) providing from non-hibernating animals were converted into cDNA according to the manufacturer's instructions SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA). Briefly, RNA, and 5'-CDS Primer A were incubated at 72°C for 3 minutes and 42°C for 2 minutes. RT-PCR reactions were performed in 20 µL with 2 µL of 5X First Strand Buffer, 1µL DTT 20mM, 1 µL dNTP Mix 10mM, 1µL of the SMARTer IIA oligo, 0.25µL RNase Inhibitor, and 1µL SMARTScribe Reverse Transcriptase. This mix was incubated at 42°C for 90 minutes and 70°C for 10 minutes.

PCR reactions were performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) following the manufacturer's protocol. Two rounds were carried out using the NUP primer as forward (5µL) and the following primer as reverse (2.5µL) 5'CAAAGAAATTGGGCACCAAGGCCACCAG 3' for the first round and the following reverse for the second round 5'GCACCAGTAGCGGTTGATAGCAATGG 3'. PCR conditions for the first round were as follows 98°C 3min, 10 cycles: 98°C 10 s, 75°C–1 °C/cycle 30s, 72 °C 30 s, and 30 cycles: 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, followed by 4 min at 72 °C. And as follow for the second round Tm: 65°C and 30 s of elongation. Another PCR reactions were performed using the same conditions that described above, but with the following reverse for the first round 5' GCACCAGTAGCGGTTGATAGCAATGG 3' and 5'GATGTTGAAGACAGAGCCAATGATGC 3' for the second round.

3. Further attempts to clone *Cricetus cricetus* exon 1 MT₂ receptor

One of the major challenges was to design appropriate primers both specific but also PCR melting temperature adapted. In the following section, primers were designed on Chinese Hamster Ovary MT₂ receptors sequence. The Chinese Hamster Ovary MT₂ receptor sequence (XM_007636225.1) is quite different from the other melatonin receptors. Indeed, the 5'UTR region is longer, about 22 amino acids, than the other receptors and the start methionine is not directly followed by the PENS like patterns. This particular specific pattern is conserved in many species (Figure 92). An extra nucleotide before the putative start codon could induce the loss of the methionine. This difference may be explained by a genetic degeneration in the cell line sequenced, or a sequencing error. This fact will be taken into account for the design of the primers based on this species.

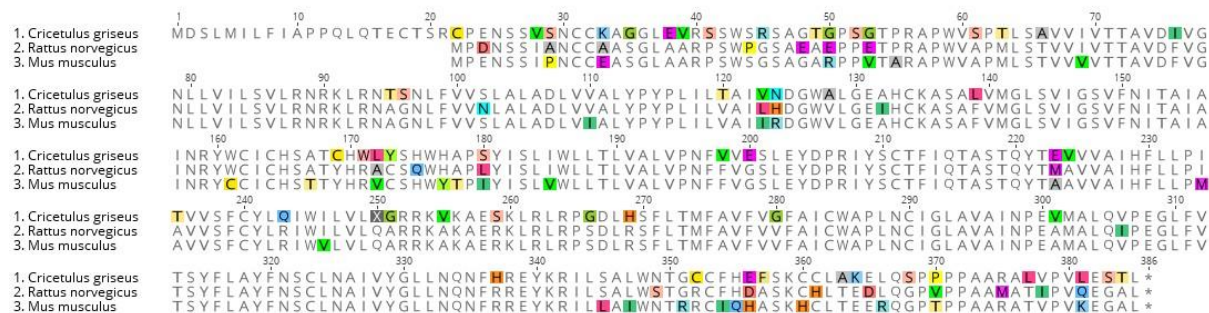


Figure 92 : Alignment of the *Rattus norvegicus* (NM_001100641.1), *Mus musculus* (AB377276.1) and *Cricetus griseus* (XM_007636225.1) melatonin receptor MT₂ amino acid sequences.

Protein alignment of *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* and *Cricetus griseus* MT₂ receptor. Differences between sequences are highlighted (each amino acid is depicted by an associated color and by its single letter symbol).

Cricetus cricetus retina total RNA (5 µg) from hibernating animal were converted into cDNA with oligo dT and random hexamers according to the manufacturer's instructions PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA). PCR reactions were performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA,USA) following the manufacturer's protocol: template cDNA 2µl, 5X Q5

Reaction Buffer 1X, 10 mM dNTPs 200 µM, 10 µM Primers 0.5 µM, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.02 U/µl, 5X Q5 High GC Enhancer 1X. PCR conditions were as follows: 98 °C 3 min, 35 cycles: 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, followed by 2 min at 72 °C. Long forward primers were designed from the CHO MT₂ receptor (XM_007636225.1) sequence, around of the start codon region (Table 15). The reverse primer was designed from the 3' end coding region of the *Cricetus cricetus* receptor.

Forward Primers	Reverse primer
ACCCCCACAGTTGCAAACAGAATGCA CATCCG	ATTAGAGGATCCTCTTGTACTCCCTG CGGAAGTTCTGGTTC
CAGAATGCACATCCGATGCCCTGAGA ACA	
TCCGATGCCCTGAGAACAGCTCTGT	
ATGCCTGAGAACAGCTCTGTCTCCAAT TG	

Table 15 : Primers designed on the CHO melatonin receptor 2 sequence in order to amplify the exon 1 of the *Cricetus cricetus* MT₂ receptor.

We also tried to obtain the sequence of the MT₂ receptor using genomic DNA as a template. Genomic DNA was extracted using AllPrep® DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA). DNAg 3µl, 5X Q5 Reaction Buffer 1X, 10 mM dNTPs 200 µM, 10 µM Forward Primer 0.5 µM, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.02 U/µl, 5X Q5 High GC Enhancer 1X. PCR conditions were as follows: 98 °C 3 min, 40 cycles: 98 °C 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, followed by 2 min at 72 °C. Forward and reverse primers were designed on non-coding regions located on the 5'UTR (forward primers) and intron regions (reverse primer) of the *Cricetulus griseus* melatonin receptor 1B pseudogene (NG_051276.1) (Table 16) in order to flank the coding region.

Forward sequences	Reverse sequences
GCCTCTTCCTAGCACTTCGCTAG	GTGGGATGTGAAAGGATCTAAG
CTGCGCGGTGAGGGGGCAGCGGG	GTGGGATGTGAAAGGATCTAAG
GCCCCAAGCAGTACTCACCTTG	GTGGGATGTGAAAGGATCTAAG
GCTTAGTCCCGATGCCCTGAG	GTGGGATGTGAAAGGATCTAAG

Table 16 : Primers sequences used for exon 1 amplification on gDNA.

Several bands were amplified and PCR products inserted into the linear cloning plasmids pJazz using the BigEasy Kit (Lucigen, Middleton, USA) according to the manufacturer's instructions. This vector provides several advantages whenever the target DNA is difficult to clone in conventional vectors, particularly for GC rich gene. First of all, PCR products were purified using the High Pure Purification kit (Roche, Mannheim Germany). Eluted fragments were end repaired using the Lucigen's DNATerminator® End Repair Kit (Lucigen, Middleton, USA), purified, inserted into the plasmid pJazz, and finally transformed into BigEasy TSA™ Electrocompetent Cells.

4. Cloning of *Cricetus cricetus* MT₂ receptor Exon 2 and 3'UTR

The following PCR reactions were performed to obtain the sequence of the exon 2 of *Cricetus cricetus* MT₂ receptor. *Cricetus cricetus* liver total RNA (1 µg) providing from non-hibernating animal into cDNA with oligo dT using PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA) according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed in 50µL final with Phusion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The following primers were used: forward primer 5' TTGTTTGTGGTGAGTCTGGTCTTGG 3' and reverse primer 5' GCCCATAGACAATGACGTTAAGGCAG 3'. PCR conditions were as follows: 98 °C 30 sec, 40 cycles: 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, followed by 10 min at 72 °C.

Cricetus cricetus brain total RNA (1 µg) providing from non-hibernating animal were converted into cDNA with a modified oligo (dT) primer 3'CDS Primer A according to the manufacturer's instructions SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Takara Bio USA, Mountain View, USA). PCR reactions were performed in 50µL final with Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) following the manufacturer's protocol. For the first round, the following primers were used: forward primers 5' CAGAGGTGATGGCTCTCCAGGTCCCAG 3' and the UPM primer from the commercial kit. PCR conditions were as follows: 98 °C 3 min, 40 cycles: 98 °C 10 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s, followed by 2 min at 72 °C. The second round was performed, in a comparable way, using this first PCR as template (2µL) and the following primers 5' TGTCACCAGCTACTTCCTAGCTTACTTCA 3' and the NUP primer (2µL) from the commercial kit.

F. Subcloning and sequencing

Amplicons were separated in 1% agarose gels stained with ethidium bromide; the gel bands were revealed with U Genius (Syngene, Frederick, USA). In the case of several bands were observed, PCR products were purified using the High Pure Purification kit (Roche Mannheim Germany). Eluted DNA were inserted into blunt pJET vector using CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and transformed into DH10β chemically competent *Escherichia Coli* cells (NEB, Ipswich, MA, USA).

Forward and reverse sequencing reactions were performed with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) using the same primers than for amplification or vector primers. When needed, due to the high GC content, sequencing reactions were carried out with 10% DMSO. Sequencing products were purified using BigDye XTerminator® Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and run on an ABI 3730 XL automated sequencer (Applied Biosystems). Data were analyzed with both Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA) and Geneious Pro 5.6.7 (Biomatters, Auckland, NZ).

G. Establishment of transient CHO-FlpIN MT₁ cell lines

CHO-Flp-In cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were cultivated in the presence of zeocin (0.1 mg/ml). The cells were cotransfected with *Cricetus cricetus* (MG598322) MT₁/pCDNA5-FRT (*Cricetus cricetus* MT₁) and Flp recombinase expression pOG44 plasmid using PEIpro (Invitrogen, Carlsbad, CA). CHO cells stably expressing *Cricetus cricetus* MT₁ were selected using hygromycin (0.6 mg/ml). CHO-Flp-In- *Cricetus cricetus* MT₁ cells were grown in HAM F12 with 2 mM glutamine and supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were selected using antibiotic pressure (hygromycin) for 72 h. The resistant cells were pooled and the presence of the transgene confirmed by RT-PCR (not shown) using 500,000 cells. After confirmation of the presence of the transgene, the cells were amplified up to 2 x 10⁹ cells. This material was used to prepare the cell membranes used in further pharmacological experiments.

H. Membrane preparations

This standard procedure was used as previously described for CHO cells expressing the sheep MT₂ receptor (Cogé et al., 2009). Briefly, CHO cells expressing *Cricetus cricetus* MT₁ melatonin receptor were grown to confluence, harvested in phosphate buffer containing 2 mM EDTA, and centrifuged at 1000g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was suspended in 5 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 2 mM EDTA and homogenized using a Kinematica polytron. The homogenate was then centrifuged (20,000g, 30 min, 4°C) and the resulting pellet suspended in 75 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 2 mM EDTA and 12.5 mM MgCl₂. The protein content was determined according to the method of Lowry et al. (Lowry et al., 1951) using the Bio-Rad kit (Bio-Rad Hercules, USA). Aliquots of membrane preparations were stored in binding buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4 containing 5 mM MgCl₂ and 1 mM EDTA) at –80°C until use.

I. Establishment of transient COS7 chimeric MT₂ cell lines

1. Design Chimeric MT₂ receptor

A chimeric MT₂ receptor was engineered using the different sequences that we succeeded to amplify (full exon 2 and partial exon 1) (Figure 93). The chimeric structure is based on the typical structure of the melatonin receptor MT₂ with two exons. We deduced the unknown sequences using the consensus of six MT₂ mammalian receptor sequences: *Marmotta marmotta* (XM_015489993), *Cricetulus griseus* (XM_007636225), *Rattus rattus* (NM_001100641), *Peromyscus maniculatus bairdii* (XM_006990545), *Microtus ochrogaster* (XM_005347416), *Mus musculus* (AB377226).

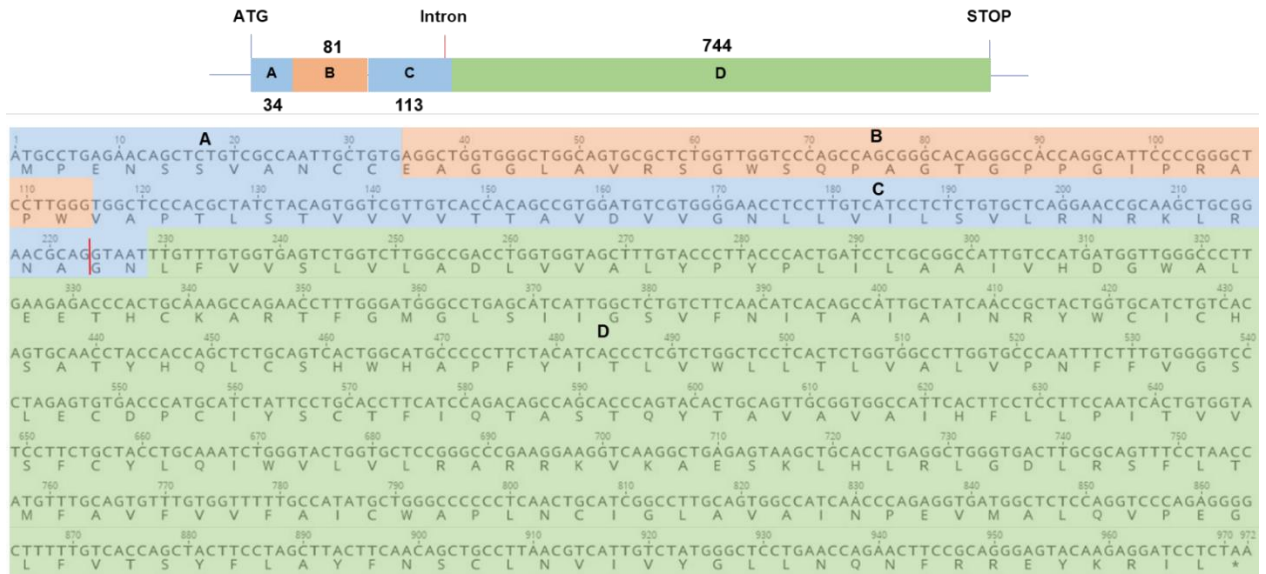


Figure 93 : Sequence of the engineered chimeric melatonin receptor 2.

The part A and C in blue are the result of consensus of six MT₂ mammalian receptor sequences. The part B (in orange) and D (in green) are respectively the sequence of our exon 1 fragment and the sequence of exon 2.

The comparison of our exon 1 sequence with *Peromyscus maniculatus bairdii* shows the presence of an extra base located in the position 77. In order to conserve the reading frame, we deleted this extra base of our sequence (Figure 94).

2. Establishment of the transient COS7 chimeric MT₂ cell line

The coding sequence for the *Cricetus cricetus* chimeric melatonin receptor was synthesized by Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) and subcloned into the pCIneo expression vector (Promega Madison, Wisconsin, USA). COS7 cells obtained from the American Type Culture Collection were maintained in DMEM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Nucleofection of COS7 cells was performed according to the manufacturer's instructions using the Nucleofector machine (Amaxa, Cologne, Germany). Adherent COS7 cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, and gently resuspended in V nucleofection solution to a final concentration of 7×10^6 cells/100 μ l. Next, 5 μ g of pCIneo/MT₂ vector was mixed with 100 μ l of the COS7 cell suspension, transferred to a 2.0 ml electroporation cuvette, and nucleofected using program W-001 and an Amaxa Nucleofector apparatus. Just after the nucleofection, 500 μ l of media supplemented with 20% (v/v) fetal calf serum was added to the cell suspension and cultured in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator for 20 minutes. Fourteen million cells were transferred to a T225 flask containing 50 ml of media supplemented with 20% (v/v) fetal calf serum and cultured in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator. Two days after transfection, the cells were harvested in PBS, pelleted, and stored at -80°C until use.

J. Whole cell and membrane 2-[¹²⁵I] -Iodomelatonin Binding Assay

We used these assays exactly as described previously (Audinot et al., 2003). In brief, membranes were incubated for 2 hours at 37°C in a final volume of 250 μ l of a binding buffer containing 50 pM 2-[¹²⁵I]-melatonin for competition experiments. Non-specific binding was defined with 10 μ M melatonin. The reaction was stopped by rapid filtration through GF/B Unifilters, followed by three successive washes with ice-cold buffer. For saturation assays, the density of binding sites (B_{max}) and the dissociation constant of the radioligand (K_D) were calculated according to the Scatchard method. Data were analyzed by using the program PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). A similar protocol was used when the binding was performed on whole cells, as described by Legros et al. (Legros et al., 2014b).

III. Results

A. The European hamster Receptor Gene MT₁ encodes a functional Receptor

We successfully amplified the complete coding sequence of the European hamster MT₁ receptor. The deduced amino acid sequence of the European hamster MT₁ receptor is 96% identical with the *Phodopus sungorus* (Genebank accession number: AAB17722) melatonin receptor 1 (Figure 95). This sequence was submitted to the GenBank database (MG598322). *Cricetus cricetus* MT₁ is organized in a similar way as any melatonin receptor described in other vertebrates.

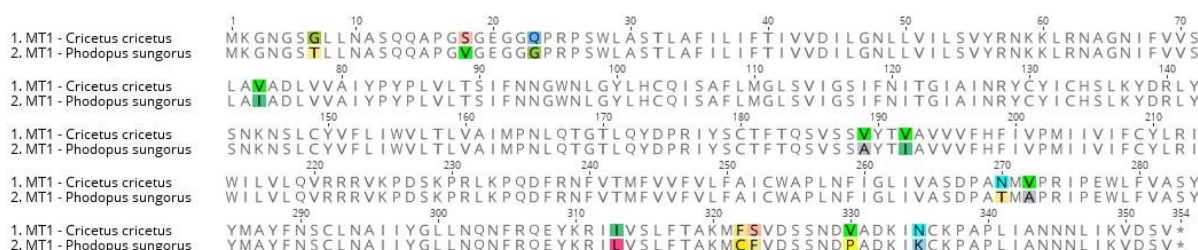


Figure 95 : Alignment of the deduced amino acid sequences of the *Cricetus cricetus* and the *Phodopus Sungorus* (AAB17722) melatonin receptor 1.

Protein alignment of *Cricetus cricetus* and *Phodopus sungorus* MT₁ receptor. Each amino acid is depicted by its single letter symbol. Differences between both sequences are highlighted (each amino acid is depicted by an associated color).

Next, we prepared membranes from cellular material and attempted to measure the binding of 2[¹²⁵I]-iodomelatonin. Saturations were obtained and showed specific bindings. The saturation curve (Figure 96) was similar to those obtained under similar conditions for the melatonin receptors that have been cloned, expressed, and characterized in our laboratory. The expression levels of the *Cricetus cricetus* MT₁ receptor from stably expressed in CHO cells is 3406 fmol/mg of protein. This level is in the upper range of expression for melatonin receptors (MT₁ and MT₂ receptors) from more classical species we generated previously, with expression levels ranging from 80 to 2650 fmol/mg of protein in rats and humans (Audinot et al., 2008). The dissociation constant (K_D) was 127 pM, in line with data obtained from other MT₁ receptors either from rodents, from sheep or from man (Audinot et al., 2003, 2008; Cogé et al., 2009; Weaver et al., 1996).

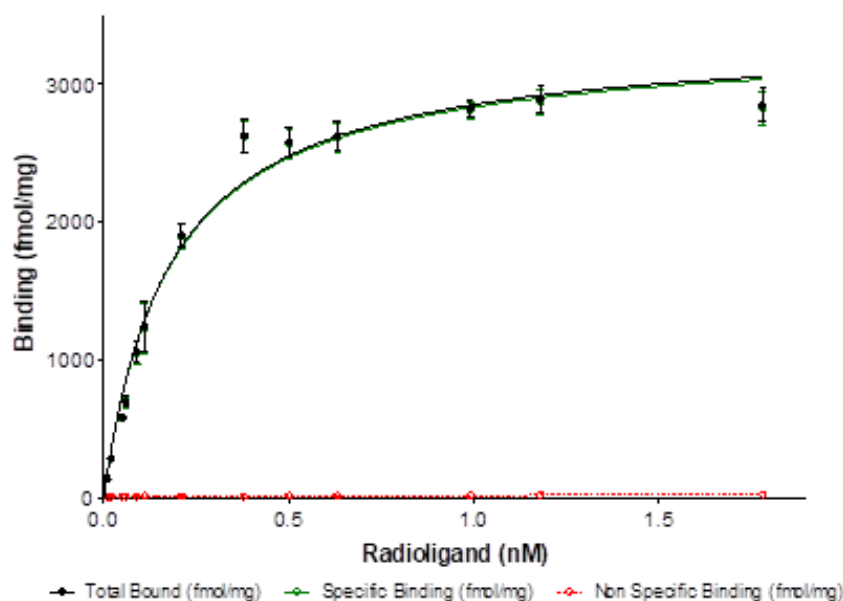


Figure 96 : Saturation binding experiments for 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin.

Membranes from CHO-FlpIN cells transfected with *Cricetus cricetus* MT₁ receptor were used to measure the binding at MT₁ receptors. Red line represents non-specific binding, black line represents total binding and green line represents specific binding. The expression level of the *Cricetus cricetus* MT₁ receptor stably expressed in CHO cells was 3406 fmol/mg of protein and the K_D was 127 pM.

Then, we focused on the stable expression in CHO cells of the *Cricetus cricetus* MT₁ receptor. This receptor was expressed at workable levels, and a pharmacological profile for a series of 19 ligands was performed and compared to the human melatonin receptors MT₁ and MT₂ (Table 17). Basically, no major differences were recorded. All the compounds behaved similarly in both species, and there was no major difference with other molecular pharmacology profiles reported for MT₁.

Legends Table 17

The chemical names of the compounds are as follows:

Luzindole: N - acetyl - 2 - benzyltryptamine; 4P - PDOT : N - [(2S,4S) - 4- phenyl - 1,2,3,4 - tetrahydronaphthalene - 2 - yl] propanamide; D600 , methoxyverapamil; S20928, (N - [2 - (1 - naphthyl) ethyl] cyclobutanecarboxamide); S21278, N - [2 - (6 - methoxybenzimidazol - 1 - yl) ethyl] acetamide; S22153, N - [2 - (5 - ethylbenzothiophen - 3 - yl) ethyl] acetamide; S73893, N - [3 - methoxy - 2 - (7 - methoxy - 1 - naphthyl) propyl] acetamide; S75436, 2 - fluoro - N - [3 - hydroxy - 2 - (7 - methoxy - 1 - naphthyl) propyl] acetamide; S27128-1, N - [(8 - methoxy - 6 - nitro - 1H - indol - 3 - yl) ethyl] acetamide; DIV880: 2 - (2 - [(2 - iodo - 4,5 - dimethoxyphenyl) methyl] - 4,5 - dimethoxy phenyl ; SD6: N - [2 - (5 - methoxy - 1Hindol - 3 - yl) ethyl] iodoacetamide; S70254: 2 - iodo - N - 2 - [5 - methoxy - 2 - (naphthalen - 1 - yl) - 1H - pyrrolo[3,2 - b] pyridine - 3 - yl]] acetamide.

Binding experiments were done with 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin as a radioligand. Experiments were run in triplicate, at least twice using different batches of membranes from stably transfected CHO cells. Concentration isotherms were obtained using 10 concentrations of each products from 10⁻¹³ to 10⁻⁴ M.

	Hamster MT1	Human MT1	Human MT2
MLT	8,62	9.6	9.3
2I-MLT	9,58	10.7	9.8
6 Chloro MLT	8,38	8.7	9.6
Luzindole	5,54	6.6	7.6
4PPDOT	5,98	6.8	8.9
S 20098	9,15	9.9	9.9
FLN68/ramelteon	9,64	10.1	10.3
D600 (+/-)	5,87	7.0	<5
S20928	5,44	7.1	7.0
S21278	4,38	6.2	6.2
S22153	7,19	8.2	8.0
S70254	5,96	7.0	9.0
S73893	7,52	8.4	8.1
S75436	8,05	7.9	8.9
S27128	8,75	8.9	9.2
Div 880	5,86	6.1	8.0
SD6	9,42	9.9	9.9
SD1881	8,16	8.8	8.6
SD1882	6,84	7.8	7.9
SD1918	6,81	7.3	7.3

Table 17 : Molecular pharmacology of MT1 receptors from *Cricetus cricetus*. Comparison with the human MT₁ and MT₂ melatonin receptors.

B. Cloning of *Phodopus sungorus* exon 1 MT₂ receptor

Melatonin receptors contains two exons separated by a long intron (~30,000 bp). The first exon encodes transmembrane domain 1 while the exon 2 encodes for the other six transmembrane domains. Some amino acids of this transmembrane domains are very conserved in all species. Weaver *et al* cloned an incomplete fragment of the melatonin receptor 2 corresponding to the exon 2 and showed that the *Phodopus sungorus* melatonin receptor does not encode a functional protein due to the present of two nonsense mutations in the coding sequence (Weaver et al., 1996). In this species, the protein is truncated just after the transmembrane domain IV.

Two different amplicons (amplicons A and B) were isolated from *Phodopus sungorus* retina using 5'RACE experiments (Figure 97) and confirmed by PCR. The exon 2 acid nucleic sequence of both amplicons is identical to the *Phodopus sungorus* published sequence (Figure 97A). In 5' of exon 2, 324 bases and 135 bases were respectively amplified for the amplicons A and B. Differences between both amplicons are observed in the beginning of the amplicon B. The *Peromyscus maniculatus bairdii* MT₂ sequence presents less differences when compared to the amplicon A than with the amplicon B (Figure 97B). Interestingly, two additional bases were found in position 318 in both amplicons compared to the *Peromyscus maniculatus bairdii* MT₂ sequence.

“The molecular path” for cloning the European hamster melatonin receptors 1 and 2

position 318-Figure 97B) near the putative intron, a correct deduced amino acid sequence was observed.



Figure 98 : Alignment of the deduced amino acid sequences of both amplicons A and B and *Phodopus sungorus* MT₂ receptor.

The figure A represents the deduced amino acid sequences (first frame) of both amplicon A and B aligned with the *Phodopus Sungorus*. The figure B represents another frame. Amino acid colored in green are different. Transmembrane domains are squared in red and stop codon in blue. The MPEN is represented with a green barre. Each base is depicted by its single letter symbol.

C. The *Cricetus cricetus* MT₂ receptor seems to be functional

1. Cloning of *Cricetus cricetus* exon 2 MT₂ receptor

We successfully amplified the exon 2 until the poly adenylation tail of the *Cricetus cricetus* MT₂ receptor. Surprisingly, the *Cricetus cricetus* melatonin receptor MT₂ is not a Natural knockout. Indeed, no premature nonsense mutation was observed in the deduced amino acid sequence. This receptor owns seven transmembrane domains like the human, rat or mouse receptors but it is shorter (40 amino acid left) compared to *Rattus rattus*, *Mus musculus* and *Peromyscus maniculatus bairdii* melatonin receptor 1B (MT₂) sequences (Figure 99).

Chapitre III : Résultats

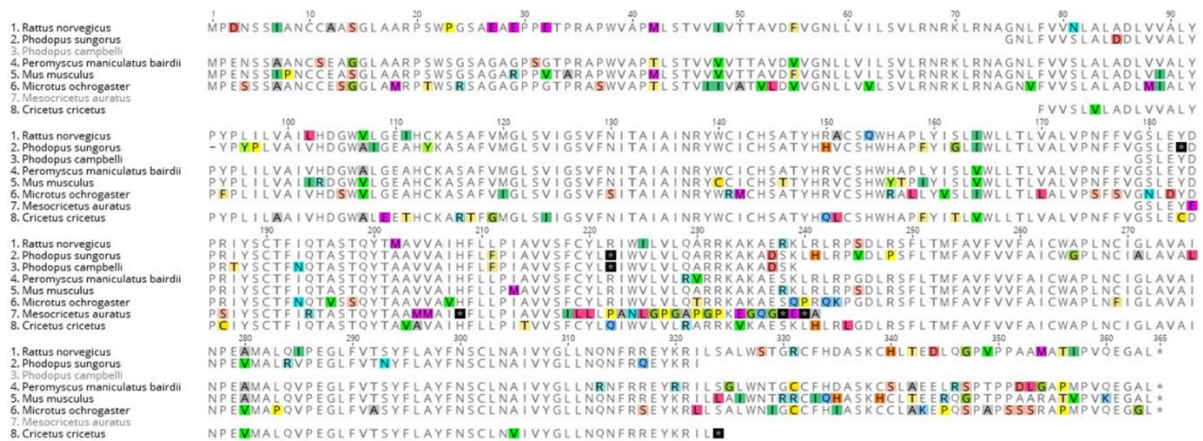


Figure 99 : Comparison of the deduced amino acid sequences of different rodent species.

Nucleotide sequences for a range of rodents were downloaded from NCBI (National Center for Biotechnology Information): *Rattus norvegicus* (NM_001100641.1), *Mus musculus* (AB377276.1), *Peromyscus maniculatus bairdii* (XM_006990545.1), *Phodopus sungorus* (U57555.1), *Phodopus campbelli* (U57556.1), *Mesocricetus auratus* (AY145849.1), *Microtus ochrogaster* (XM_005347416.1). Stop codon are highlighted in black. Each amino acid is depicted by its single letter symbol. Differences between both sequences are highlighted (each amino acid is depicted by an associated color).

2. Cloning of *Cricetus cricetus* exon 1 MT₂ receptor

We have been able to isolate an incomplete region of the exon 1 of the *Cricetus cricetus* melatonin receptor using a couple of primers (labelled previously F0, F3 and R198) located around the presumed start methionine and the region before the predicted intron position. We amplified and sequenced an amplicon of 143 bp instead of the expected 198 bp (Figure 100), a sequence 55 bp shorter than both *Peromyscus maniculatus bairdii* and *Phodopus sungorus* sequences.

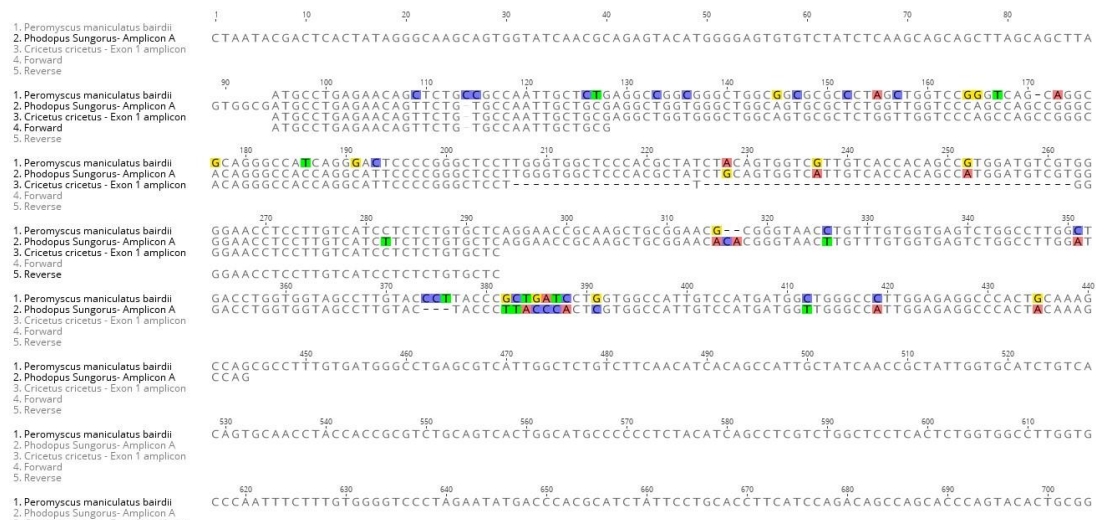


Figure 100 : Alignment of the exon 1 *Cricetus cricetus* cloned sequence with the *Peromyscus maniculatus bairdii* and *Phodopus sungorus* melatonin receptor 2 sequences.

Each amino acid is depicted by its single letter symbol. Differences between both sequences are highlighted (each amino acid is depicted by an associated color).

“The molecular path” for cloning the European hamster melatonin receptors 1 and 2

The sequence of our amplicon presents an additional base (C) in position 171 (Figure 100) compared to the *Peromyscus maniculatus bairdii* sequence. Our exon 1 sequence presents 75.5% of homology with the *Peromyscus maniculatus bairdii*, 69.4% with the *Mus musculus* and 68.7% with *Rattus rattus* nucleic acid sequences. These figures could translate a real close proximity with the other rodent sequences.

In spite of the utilization of different forward and reverse primers covering both the exon 1 and exon 2 sequences, we were unable to amplify a complete exon 1 sequence. The difference in size observed could be due to a technical aspect like a stem loop. This loop could induce the polymerase to dissociate from the template. The 2D DNA structure of *Peromyscus maniculatus bairdii* melatonin receptor 1B exon 1 and the whole receptor sequence shows many hairpins in this region which could confirm this stem loop hypothesis (Figure 101).

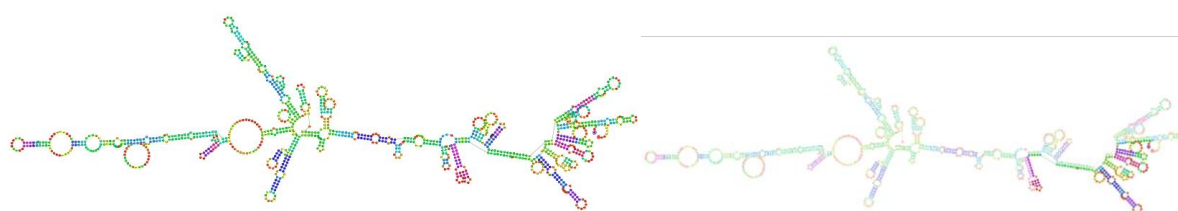


Figure 101 : Fold *Peromyscus maniculatus bairdii* melatonin receptor 1B sequence: whole sequence (left) - Exon 1 (right). Geneious Pro 5.6.7.

The 2D DNA structure of *Peromyscus maniculatus bairdii* melatonin receptor 1B exon 1 and the whole receptor sequence. This structure showing a plethora of hairpin can explain the difficulty to obtain the complete sequence of our exon 1 amplicon.

Different amplicons were isolated from 5'RACE experiments, two examples are presented on the Figure 102 (A and B). The sequence of the exon 2 was as expected. None of the different 5' region amplified were as expected. Indeed, some amplicons like the amplicon 1 (Figure 102A) presents a possible start methionine but no transmembrane domain. We also observed some amplicon with a stop codon in the 5' region without start methionine (Figure 102B).

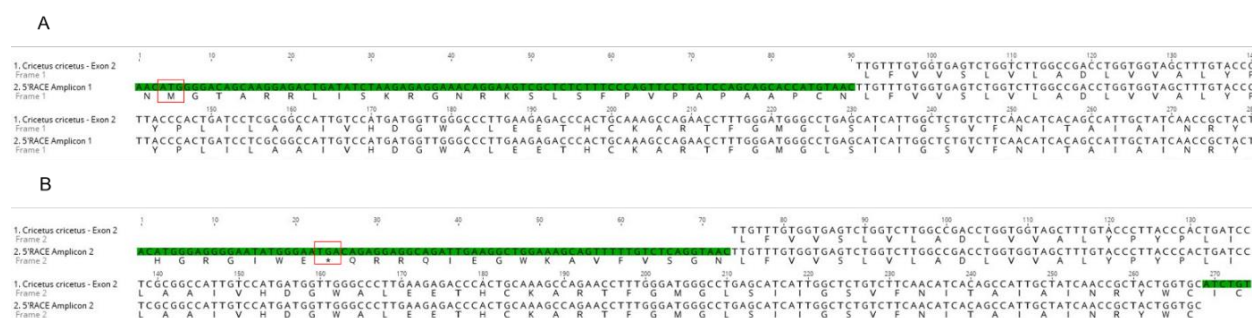


Figure 102 : Examples of sequences obtained using 5'RACE experiments in order to obtain the exon 1 sequence of the melatonin receptor 2.

Nucleotides in green are not similar. The deduced amino acid of the amplicon 1 shows a methionine in 5' of the exon 2 but pattern of a transmembrane domain 1 was not observed while the amplicon 2 shows a codon stop in 5' of the exon 2 but no methionine.

Interestingly, two other amplicons sequenced presented the exon 2 region as expected but with an upstream sequence homologous of the *Cricetulus griseus* melatonin receptor 1B (MT₂) pseudogene (NG_051276.1). Furthermore, at least some intronic regions seem to be conserved in these amplicons.

We tried to amplify the exon 1 from MT₂ receptor with primers designed from non-coding regions using gDNA as template. Several PCR products were amplified, all of them were subcloned but none of the sequences obtained were specific. The same result was observed for PCR reactions done with primers designed on the coding region of the CHO sequences.

3. Molecular pharmacology

Next, we attempted to measure the binding of 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin on whole COS7 cells transfected with *Cricetus cricetus* chimeric MT₂. Saturations were obtained and showed a very low specific binding. The saturation curve (Figure 103) was not similar to those obtained under similar conditions for the melatonin receptors that have been cloned, expressed, and characterized in our laboratory. The linearization of the Scatchard plot gives a B_{max} of 47.57 fmol/mg protein and a K_D value of 5 nM. The expression is low, according to our previous experiences with other MT₂ from different species. The K_D value compares poorly with previous data from other species such as 0.041 nM for ovine MT₂ (Cogé et al., 2009), 0.08 nM for human MT₂ (Audinot et al., 2003), 0.022 nM for mouse MT₂ (Devavry et al., 2012) and 0.13 nM for rat MT₂ (Audinot et al., 2008). This variability is essentially due to the nature of the host cells (HEK, CHO).

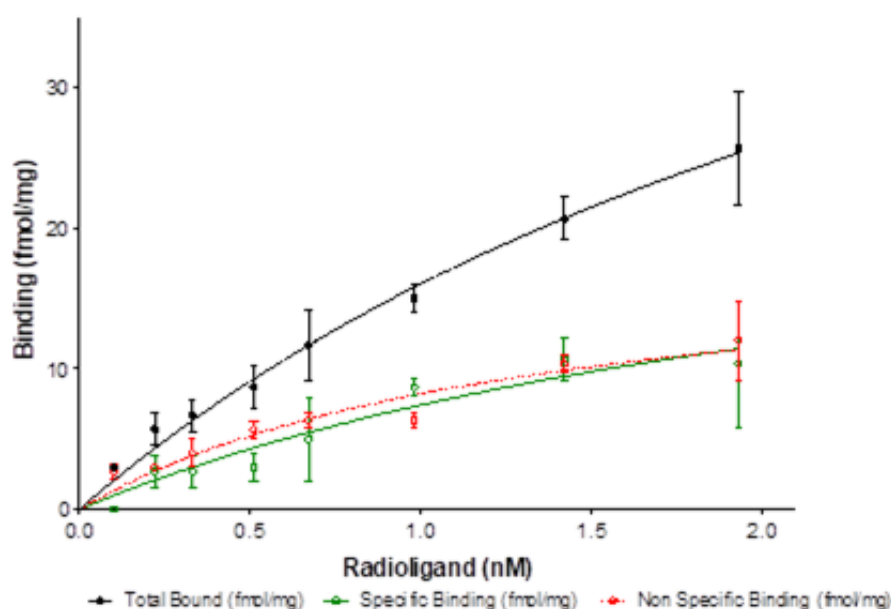


Figure 103 : Saturation binding experiments for 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin.

Whole COS7 cells (50 000) transfected with *Cricetus cricetus* chimeric MT₂ receptor were used to measure the binding at chimeric MT₂ receptors. Red line represents non-specific binding, black line represents total binding and green line specific binding.

IV. Discussion

In mammals, melatonin is mainly involved in the transmission of circadian and seasonal information. This neurohormone acts essentially by two G-Protein-Coupled Receptors, MT₁ and MT₂. It is well admitted that melatonin transmits photoperiodic and seasonal signals mainly through MT₁ (Yasuo et al., 2009). Weaver *et al.* showed that MT₂ from the Siberian hamster was not functional due to nonsense mutations in the coding region of the receptor cDNA (Weaver et al., 1996). Here we analyzed the functionality of both MT₁ and MT₂ in the European hamsters.

The European hamster MT₁ was cloned, overexpressed in CHO cells and its binding capacity studied. The alignment of the *Cricetus cricetus* receptor with *Phodopus sungorus* MT₁ showed high similarity at the amino acid level. The affinity of this receptor (127 pM) for the melatonin is in the same range than those usually observed for melatonin receptors expressed in similar way (Jockers et al., 2008).

Technical cloning difficulties curbed studies of melatonin receptors. For instance, for a long time, it was believed that ovine MT₂ gene had evolved into a pseudogene that produced no mRNA (Barrett et al., 2003). But finally, Cogé *et al.* showed the existence of a functional MT₂ receptor in sheep (Cogé et al., 2009). We used different 5'RACE conditions to complete the published sequence of the Siberian hamster MT₂. Two different amplicons were cloned, and though the acid nucleic sequence was close to the *Peromyscus maniculatus bairdii* sequence, the deduced amino acid was not as expected. Interestingly, compared to the *Peromyscus maniculatus bairdii* sequence, the amplicons cloned contain, among others, two extra bases in 5' of the presumed intron. These bases could induce the observed frameshift and be due to intronic conservation.

The exon 2 of the *Cricetus cricetus* MT₂ was cloned and surprisingly our sequence does not contain a single premature codon stop. Using tissues from hibernating hamster, an incomplete sequence of the exon 1 was amplified. This fragment was shorter than expected, and in spite of multiple trials, it was not possible to determine if the exon 1 of the *Cricetus cricetus* MT₂ is shorter than MT₂ from other species or if the missing sequence is due to technical problems. Indeed, the presence of plethora of hairpins in the exon 1 structure could explain the difficulty to obtain the complete sequence of the exon 1 amplicon. The chimeric MT₂ receptor engineered shows poor affinity for melatonin. This result indicates that the full length *Cricetus cricetus* MT₂ receptor could be functional and bind melatonin. Using 5' RACE, transcripts with intronic conservation in 5' of the exon 2 were amplified and deduced amino acid were not as expected. These experiments were done on non-hibernating hamster tissues and should be reproduced on tissues from hibernating hamsters in order to determine if these transcripts are only found in non-hibernating animals.

The impact of the chimeric construct onto the expression level (in the lowest one for MT₂ expression in our laboratory) and onto the melatonin affinity (5 nM, about 50 times poorer than the usual laboratory species MT₂ cloned in our laboratory) is certainly important. Nevertheless, the elements we discovered and particularly the absence of a stop codon

impairing the expression of a functional receptor, like in most of the other hamster species, are important. We also believe that by introducing this artifact inside the receptor (that is the artificial N-terminal sequence), we just proved that the rest of the construct is functional. More molecular biology work will be needed to decrypt the head of the European hamster MT₂ receptor.

Our data suggest that transcripts with intronic conservation are expressed in both non-hibernating *Cricetus cricetus* and *Phodopus sungorus*. These transcripts could be mainly expressed in order to regulate the WT-coding gene MT₂. The functional MT₂ could be expressed only during specific physiological state such as hibernation. Indeed, we show in previous study that MT₂ is regulated during the hibernation cycle in European hamster (Gautier et al., 2018a). This regulation way using pseudogene transcripts expression would permit a rapid increment of a functional MT₂ receptor when European hamster enters in hibernation. Indeed, both the entry and the end of hibernation are very fast processes (few hours) during which major adaptations are observed concerning metabolism, body temperature... These profound modifications have to be highly regulated and pseudogene regulation facilitates a very specific and rapid gene regulation. Thus, Sano *et al* (Sano et al., 2015) showed a hibernation-specific alternative splicing for the cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of Syrian hamsters. They demonstrated that the full length CIRP was expressed during the hibernation state, therefore a C terminally truncated was also expressed in non-hibernating animals. This truncated form could play a dominant-negative role over the full length CIRP (Sano et al., 2015). This kind of regulations could be of major importance and determinant for key genes implicated during hibernation.

To conclude, we show that the exon 2 of the *Cricetus cricetus* MT₂ does not contain premature stop codon. And our study suggests than MT₂ transcripts with intronic conservations are expressed, maybe only during particular physiological state(s), in both *Cricetus cricetus* and *Phodopus sungorus*. Finally, the premature stop codon presents in the *Phodopus sungorus* MT₂ sequence could be due to a reading frame shift induced by intronic conservations.

CHARACTERIZATION OF THE MEL1C MELATONINERGIC RECEPTOR IN PLATYPUS (*ORNITHORHYNCHUS ANATINUS*)

Short title: Platypus Mel1c Molecular Pharmacology

Célia Gautier^{1,2}, Sophie-Pénélope Guenin¹, Isabelle Riest-Fery¹, Tahlia Jade Perry³, Céline Legros¹, Olivier Nosjean^{1,4}, Valérie Simonneaux², Frank Grützner³, Jean A. Boutin^{1,4,*}

¹ PEX Biotechnologie Chimie & Biologie, Institut de Recherches Servier, Croissy sur Seine, France

² Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Strasbourg, France

³ School of Biological Sciences, The University of Adelaide, Australia

⁴ Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France

*Corresponding author: Email: jean.boutin@servier.com (JAB)

Acknowledgments

JAB is thankful to Dr. Laurent Ripoll for numerous helpful discussions and M. Xavier Deguercey for his help. Frank Grützner is supported by an Australian Research Council Fellowship. Tahlia J. Perry is supported by an Australian Postgraduate Award.

Abstract

Melatonin is a neurohormone produced in both animals and plants. It binds at least three G-protein-coupled receptors: MT₁ and MT₂, and Mel1c. Mammalian GPR50 evolved from the reptilian/avian Mel1c and lost its capacity to bind melatonin in all the therian mammal species that have been tested. In order to determine if binding is lost in the oldest surviving mammalian lineage of monotremes we investigated whether the melatonin receptor has the ability to bind melatonin in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), and evaluated its pharmacological profile. Sequence and phylogenetic analysis showed that platypus has in fact retained the ancestral Mel1c and has the capacity to bind melatonin similar to other mammalian melatonin receptors (MT₁ and MT₂), with an affinity in the 1 nM range. We also investigated the binding of a set of melatoninerigic ligands used previously to characterize the molecular pharmacology of the melatonin receptors from sheep, rats, mice, and humans and found that the general profiles of these compounds make Mel1c resemble human MT₁ more than MT₂. This work shows that the loss of GPR50 binding evolved after the divergence of monotremes less than 190MYA in therian mammals.

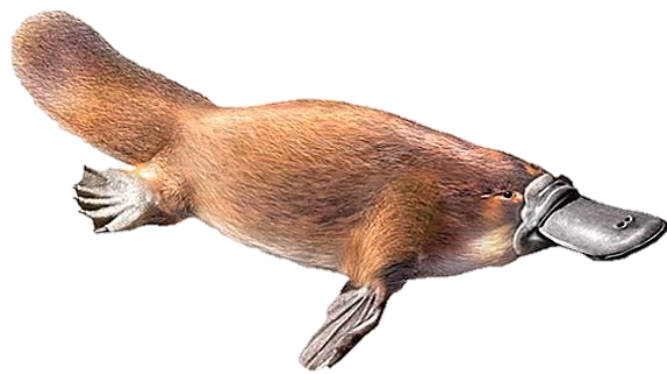


Figure 104 : Ornithorynque nageant dans l'aquarium de Sydney. Stefan Kraft (2004).

I. Introduction

Melatonin is a neurohormone produced by the pineal gland and maintains the circadian information through diffusion in the blood circulation to peripheral organs. Melatonin exists in almost all living organisms, and its actions are mediated by binding to two membrane receptors (MT₁ and MT₂) [1], a nuclear receptor [2] (although this observation has been challenged [3]), or a protein (quinone reductase 2; QR2) [4]. If the MT₁ and MT₂ receptors bind melatonin with an affinity of 1 nM and below, QR2 has an affinity for melatonin in the 10 μ M range. In mammals, a third receptor exists: the melatonin-related receptor (MRR), recently renamed GPR50 [5,6], that does not bind melatonin but could regulate the activity, specificity, and signaling pathways of MT₁ via dimerization [1]. GPR50 is thus an orphan receptor because its ligand, if any, is unknown. Mel1c has been described as a melatonin-binding receptor in amphibians, birds, and fish [5]. Dufourny *et al.* [7] demonstrated that the melatonin-related receptor or GPR50 in mammals is likely the protein that evolved from Mel1c on the basis of phylogenetic and sequence analyses. However, this discovery raised the question of why this receptor no longer binds melatonin in mammals.

Although the melatonin binding capacity of Mel1c and pharmacological profiles (e.g., in chicken) have been known for quite a long time [8-10], in depth comparative molecular pharmacological evidence is lacking. In fact, the few data available on the activity of the Mel1c receptor, particularly from *Xenopus laevis*, are functional ones, with some compounds using a cell-based assay, pigment aggregation in melanophores [9,11-14]. Further to this, some data is available on binding recorded using chicken brain membranes (see for example, Sugden [15] or Pegurier *et al.* [16]).

Genes involved in reproduction undergo accelerated evolution [17-19], and it seems that the evolution of genes, when fast, is often linked to reproduction. In this sense, we assumed that the passage from eggs to viviparity could be accompanied by many different changes, including from a melatonin-binding Mel1c (in amphibians and birds) to a sequence-related non-melatonin binding GPR50. In that sense, we wanted to better understand the evolution of Mel1c to GPR50 binding in mammals by investigating the oldest surviving monotreme lineage. Monotremes (platypus, echidna) are the oldest surviving mammals and provide unprecedented insight into mammalian evolution regarding, for example, the evolution of sex chromosomes [20,21].

Here we analyzed the evolution and function of the melatonin receptor Mel1c/GPR50 in the iconic egg-laying platypus. Interestingly, we found that the platypus Mel1c receptor shares high similarity with bird and other vertebrate Mel1c, while the therian ortholog GPR50 is more diverged. Furthermore, we found that platypus Mel1c binds melatonin while this binding has been lost in other mammals. Further, we analyzed if this change resulted in other pharmacological responses, which is not the case. Overall this work provides novel information about the functional evolution of this enigmatic receptor.

II. Materials and Methods

A. Reagents and ligands

The radioligand 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin (specific activity: 2200 Ci/mmol) was purchased from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). Melatonin was obtained from Sigma (St Louis, MO) and 4-phenyl-2-propionamidotetraline (4P-PDOT) and 2-benzyl-N-acetyltryptamine (luzindole) from Tocris (Bristol, UK). Compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a stock concentration of 10 mM and stored at -20°C.

B. RNA extraction and cDNA synthesis

Platypus specimens were killed with an intraperitoneal injection of pentobarbitone sodium (Nembutal) or pentobarbital (Lethabarb) at a dose of 0.1mg g⁻¹. Tissue samples were snap-frozen. RNA was extracted from whole brain tissue using TRIzol (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions.

The RNA was resuspended in nuclease-free water and stored at -80°C. The cDNA was synthesized from 3 µg RNA using Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Briefly, RNA was treated with DNase I (Roche) to remove genomic DNA, and then incubated with 50 ng of random hexamers and 0.5 µl of 10 mM dNTPs for 5 min at 65°C. After incubation, 2 µl of 5× First-strand RT buffer, 0.5 µl of 0.1 M dithiothreitol (DTT), 0.5 µl of RNaseOUT™ (40 U/µl), and 0.5 µl of SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/µl) were added and the mixture incubated at 25°C for 10 min. This was followed by incubation at 50°C for 50 min and the final termination at 85°C for 5 min. Finally, 0.2 µl of RNase H (Biolabs, 5 U/µl) was added to each tube and incubated at 37°C for 20 min. The cDNA was stored at -20°C.

All experimental approaches were performed according to the University of Adelaide biosafety and ethics committee regulations (Institutional Biosafety Committee, Dealing ID 12713) concerning this and the previous experiments of Dr. Grützner's laboratory. Platypus samples were collected in 2002 (AEEC permit R.CG.07.03, Environment ACT permit LI 2002 270, NPWS permit A193) and 2008 (AEC permit N°. S-49-2006) at the Upper Barnard River (New South Wales, Australia).

C. Cloning of platypus Mel1c receptor

PCR reactions were performed in a final volume of 50 µl using Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Ipswich, MA, USA) following the manufacturer's protocol with 2 µl of platypus brain cDNA using the primers described in (Table 18). The PCR conditions were as follows: 98°C for 3 min, followed by 10 cycles of 98°C for 10s, 65°C–1°C/cycle for 30s, 72°C for 30 s, and then 30 cycles of 98°C for 10s, X°C for 30s, 72°C for 30 s, and finally 2 min at 72°C.

Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*)

Amplicons	Forward primer sequences (5' – 3')	Reverse primer sequences (5' – 3')	Annealing temperature (°C)
Exon 1	ATGCCGGGAGCCGGAAC GGGACCTGCCCGGGCT	CGTTGCGGAGCTTTCTGTT CCTCAGC	60
Exon 2	GCAACGCCGGGAACATCTT TGTGATCAG	TTACACATGGATTTCAGCTT GATTTTCTTTG	58

Table 18 : Primers used in order to amplify the platypus Mel1c receptor.

Amplicons were separated on 1% agarose gels stained with ethidium bromide and the gel bands revealed with U Genius (Syngene, Frederick, USA). PCR products were purified using the High Pure Purification kit (Roche Mannheim Germany). Eluted DNA were inserted into the blunt pJET vector using the CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and transformed into DH10 β chemically competent *Escherichia coli* cells (NEB, Ipswich, MA, USA). Forward and reverse sequencing reactions were performed using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and pJET1.2 Sequencing Primers. Sequencing products were purified using the BigDye XTerminator® Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and run on an ABI 3730 XL automated sequencer (Applied Biosystems). Data were analyzed by Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA).

D. Phylogenetic analysis

All phylogenetic analyses were undertaken using Geneious V10.0.2 (<http://www.geneious.com>, [22]). Platypus (*O. anatinus*), chicken (*G. gallus*) and the clawed frog (*X. laevis*) nucleotide sequences were imported into Geneious and translated to protein sequences. Nucleotide sequences for a range of therian mammals (group consisting of eutherians and marsupials) were downloaded from NCBI (National Center for Biotechnology Information); names and GenBank accession numbers are shown in Table 19. Introns were removed and coding regions were translated according to their individual start and stop positions. DNA and protein alignments were undergone using ClustalW algorithm. Phylogenetic tree was built using Neighbour-Joining method, with Jukes-Cantor substitution model, 1000 bootstrap replicates and no outgroup was selected.

Scientific Name	Common Name	GenBank Accession Number
<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzee	736267
<i>Bos Taurus</i>	Cow	530065
<i>Sus scrofa</i>	Pig	100620104
<i>Canis lupus familiaris</i>	Dog	492213
<i>Dipodomys ordii</i>	Ord's kangaroo rat	105992838
<i>Monodelphis domestica</i>	Gray short-tailed opossum	100025945
<i>Phascolarctos cinereus</i>	Koala	110199994
<i>Sarcophilus harrisii</i>	Tasmanian devil	100913368

Table 19 : Therian mammals used for phylogenetic analysis.

E. Establishment of the transient COS7/3HA-Mel1c cell line

Coding sequences for the platypus (XM 001512887), *X. laevis* (U67880), and *G. gallus* (NM 205361.1) Mel1c melatonin receptors were synthesized by Genecust (Dudelange, Luxemburg) and subcloned into the pCIneo expression vector (Promega Madison, Wisconsin, USA).

COS7 cells obtained from the American Type Culture Collection were maintained in DMEM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. Nucleofection of COS7 cells was performed according to the manufacturer's instructions using the Nucleofector machine (Amaxa, Cologne, Germany). Adherent COS7 cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized, and gently resuspended in V nucleofection solution to a final concentration of 7×10^6 cells/100 μ l. Next, 5 μ g of pCIneo/Mel1c vector was mixed with 100 μ l of the COS7 cell suspension, transferred to a 2.0 ml electroporation cuvette, and nucleofected using program A024 and an Amaxa Nucleofector apparatus. Just after the nucleofection, 500 μ l of media supplemented with 20% (v/v) fetal calf serum was added to the cell suspension and cultured in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator for 20 minutes. Fourteen million cells were transferred to a T225 flask containing 50 ml of media supplemented with 20% (v/v) fetal calf serum and cultured in a humidified 37°C, 5% CO₂ incubator. Two days after transfection, the cells were harvested in PBS, pelleted, and stored at -80°C until use.

F. Indirect immunofluorescence

COS7 cells transiently expressing platypus (*O. anatinus*), *X. laevis*, or *G. gallus* Mel1c receptors were seeded at 50,000 cells per well in eight-well Lab-Tek chamber slides (Nunc, Naperville, IL) in 0.5 ml of medium. Cells were fixed by treatment with 4% formaldehyde in PBS for 15 min then incubated with glycine (100 mM) in PBS for 10 min at room temperature (RT). The cells were blocked with 0.2% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 5 min at RT. For visualization of HA epitope-tagged Mel1c receptors, cell surface receptors were stained using a mouse monoclonal anti-HA antibody (0.25 μ g/ml) for 30 min at 37°C in PBS containing 0.2% BSA. After washing in PBS supplemented with 0.2% BSA, cells were blocked with a solution of 0.2% BSA and 10% fetal calf serum. The cells were then incubated in a humidified chamber for 60 min at 37°C with secondary antibody (1 μ g/ml Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse antibody; St Louis, MO). The cells were washed twice with PBS/0.2% BSA and coverslips applied using Vectashield® Mounting medium containing 4', 6'-diamidino-2-phenylindole to stain nuclei (Vector Lab, Burlingame, CA).

Fluorescence microscopy was performed using a Zeiss Axiovert 200M microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Immunofluorescent images were captured by an AxioCam MR3 camera and AxioVision software (Zeiss, Oberkochen, Germany).

G. Establishment of stable CHO-FlpIn Mel1c cell lines

CHO-Flp-In cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) were cultivated in the presence of zeocin (0.1 mg/ml). The cells were cotransfected with either platypus (cloned sequence that will be submitted to GenBank) Mel1c/pcDNA5-FRT (platypus Mel1c) or *X. laevis* (NM 001087919.1) Mel1c/pcDNA5-FRT (clawed frog Mel1c) and Flp recombinase expression pOG44 plasmid using PEIpro (Invitrogen, Carlsbad, CA). CHO cells stably expressing platypus Mel1c or clawed frog Mel1c were selected using hygromycin (0.6 mg/ml). CHO-Flp-In-platypus Mel1c cells were grown in HAM F12 with 2 mM glutamine and supplemented with 10% fetal calf serum. Cells were selected using antibiotic pressure (hygromycin) for 72 h. The resistant cells were pooled and the presence of the transgene confirmed by RT-PCR (not shown) using 500,000 cells. After confirmation of the presence of the transgene, the cells were amplified up to 2×10^9 cells. This material was used to prepare the cell membranes used in further pharmacological experiments.

H. Membrane preparation

This standard procedure was described in a previous experiment with CHO cells expressing the sheep MT₂ receptor [23]. Briefly, CHO cells expressing either the platypus or clawed frog Mel1c melatonin receptor were grown to confluence, harvested in phosphate buffer containing 2 mM EDTA, and centrifuged at 1000g for 5 min at 4°C. The resulting pellet was suspended in 5 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 2 mM EDTA and homogenized using a Kinematica polytron. The homogenate was then centrifuged (20,000g, 30 min, 4°C) and the resulting pellet suspended in 75 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 2 mM EDTA and 12.5 mM MgCl₂. The protein content was determined according to the method of Lowry *et al.* [24] using the Bio-Rad kit (Bio-Rad SA, Ivry-sur-Seine, France). Aliquots of membrane preparations were stored in binding buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.4 containing 5 mM MgCl₂ and 1 mM EDTA) at -80°C until use.

I. 2-[¹²⁵I] -melatonin binding assay

This approach has been described very often by our laboratory and others. Briefly, membranes were incubated for 2 hours at 37°C in a final volume of 250 µl of binding buffer containing 50 pM 2-[¹²⁵I] -melatonin for competition experiments. The results were expressed as K_i, taking into account the concentration of radioligand used in each experiment. Non-specific binding was defined with 10 µM melatonin. The reaction was stopped by rapid filtration through GF/B Unifilters, followed by three successive washes with ice-cold buffer. Data were analyzed by using the program PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). For saturation assays, the density of binding sites (B_{max}) and the dissociation constant of the radioligand (K_D) were calculated according to the Scatchard method. For competition experiments, inhibition constants (K_i) were calculated according to the Cheng-Prusoff equation: $K_i = IC_{50} / [1 + (L / K_D)]$, where IC₅₀ is the measured 50% inhibitory concentration, L is the

concentration of 2-[¹²⁵I] -iodomelatonin, and K_D is the dissociation constant. A similar protocol was used when the binding was performed on whole cells, as described by Legros *et al.* [25].

III. Results

A. Cloning of platypus Mel1c receptor

The two amplicons isolated from exons 1 and 2 are depicted in Figure 105A. They were fully sequenced. Figure 105B shows the complete nucleotide sequence of the gene. The alignment between the predicted and experimental sequences is shown. The platypus Mel1c sequence fits the predicted sequence XM_001512887 (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_001512887) except for a single mutation in position 44 (T>C). This mutation changes the nature of the amino acid encoded by this triplet at position 15 (L>P).

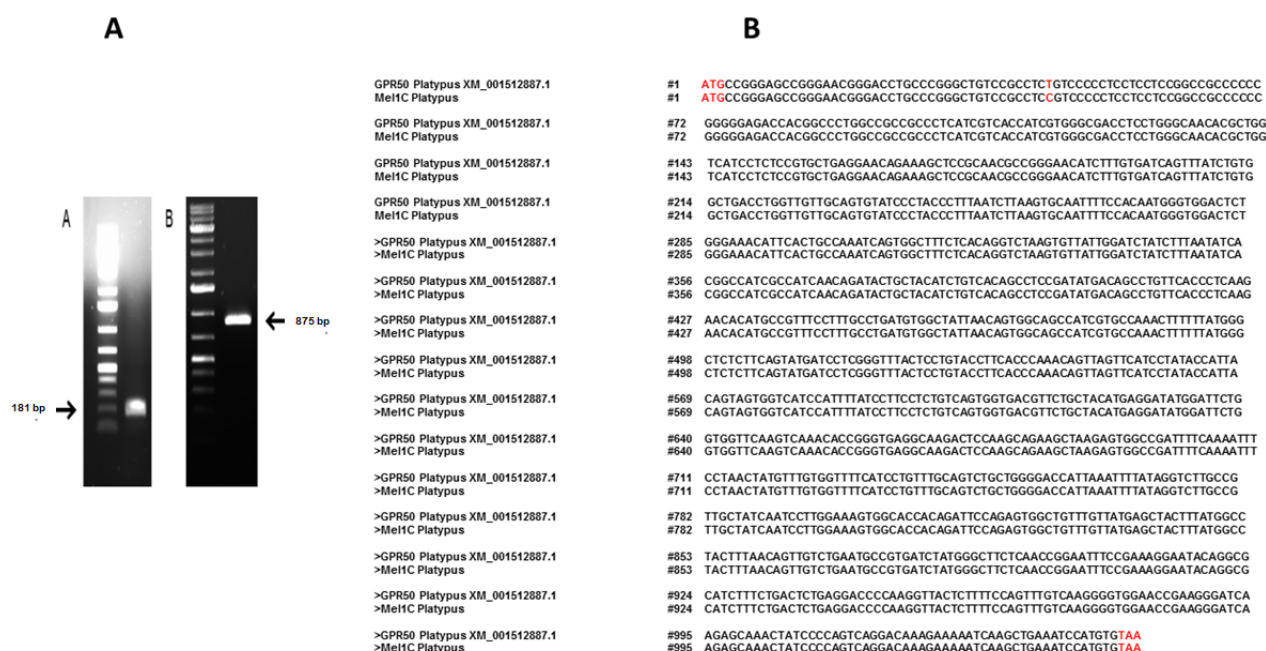


Figure 105 : Cloning of Mel1c from platypus brain and comparison of the actual and predicted sequences.

The cloning was performed using the predicted sequence XM_001512887. A, lane 1: Exon 1 amplicon, 181 bp; lane 2: Exon 2 amplicon, 875 bp. B, Comparison of the obtained sequence. In red: ATG starting codon and TAA stop codon. At position 44, a single mutation from the predicted sequence changes one amino acid in the protein sequence at position 15 (L>P).

B. Gene organization and phylogenetic analysis

Platypus Mel1c is organized in a similar way as any melatonin receptor described in other vertebrates. Platypus Mel1c contains two exons [separated by a long intron (~30,000 bp) (Figure 112A)] that encode the transmembrane domain 1 and the other six transmembrane domains. Protein alignment with chicken and the clawed frog shows that Mel1c in platypus is well conserved at the amino acid level. From Thr44 to Ala352, amino acid sequence identity

was comprised between 72 and 78 % for the 3 receptors. (see Table 20 and Figure 112B). Interestingly, the Mel1c family has much more variation at the nucleotide level throughout these species (Figure 112C).

	Gallus gallus Mel1C	Homo Sapiens GPR50	Platypus Mel1C	Xenopus Laevis Mel1C
Gallus gallus Mel1C		46,10%	78,40%	78,70%
Homo Sapiens GPR50	46,10%		48,60%	39,10%
Platypus Mel1C	78,40%	48,60%		72,30%
Xenopus Laevis Mel1C	78,70%	39,10%	72,30%	

Table 20 : Comparison of Mel1c sequences in platypus, xenopus and chicken to the human gpr50.

When Mel1c is aligned with the human sequence of GPR50 (the therian ortholog of Mel1c), the divergence between the two is apparent (Figure 106A). Phylogenetic analysis shows platypus clustering with chicken and the clawed frog Mel1c to the exclusion of an array of therian mammal GPR50 (Figure 106B), showing here that platypus has retained the ancestral Mel1c gene and its ortholog GPR50 evolved after the divergence of monotremes from therian mammals. Although GPR50 has lost its capacity to bind melatonin, the sequence has been conserved in mammals (Table 20), with a major difference being that the sequence of human GPR50 has 270 additional amino acids compared to the platypus (Figure 106A), rendering the C-terminus of GPR50 one of the longest known G-protein-coupled receptors (GPCRs).

A recent study has highlighted the importance of the second extracellular domain (E2) of melatonin receptors in their ability to bind to melatonin [26]. Therefore, we also looked at this region between Mel1c and GPR50 in all species used for phylogenetic analyses. Here we found that platypus, chicken and the clawed frog contained a Gln (Q) at position 18 of E2 (Figure 106C), which was shown by Clement *et al.* [26] to be important for the binding function of melatonin receptors. However, all eutherian species contained a Thr (Y) at this position instead, while the marsupials had Thr (Y; opossum), His (H; koala) or Pro (P; Tasmanian devil) (Figure 106C). If this Gln in E2 is in fact important for binding in melatonin receptors, then the lack of it in all therian mammals tested here supports that hypothesis and also suggests the transition from Mel1c to GPR50 occurred between the divergence of monotremes and therian mammals - 190 to 160 million years ago (MYA).

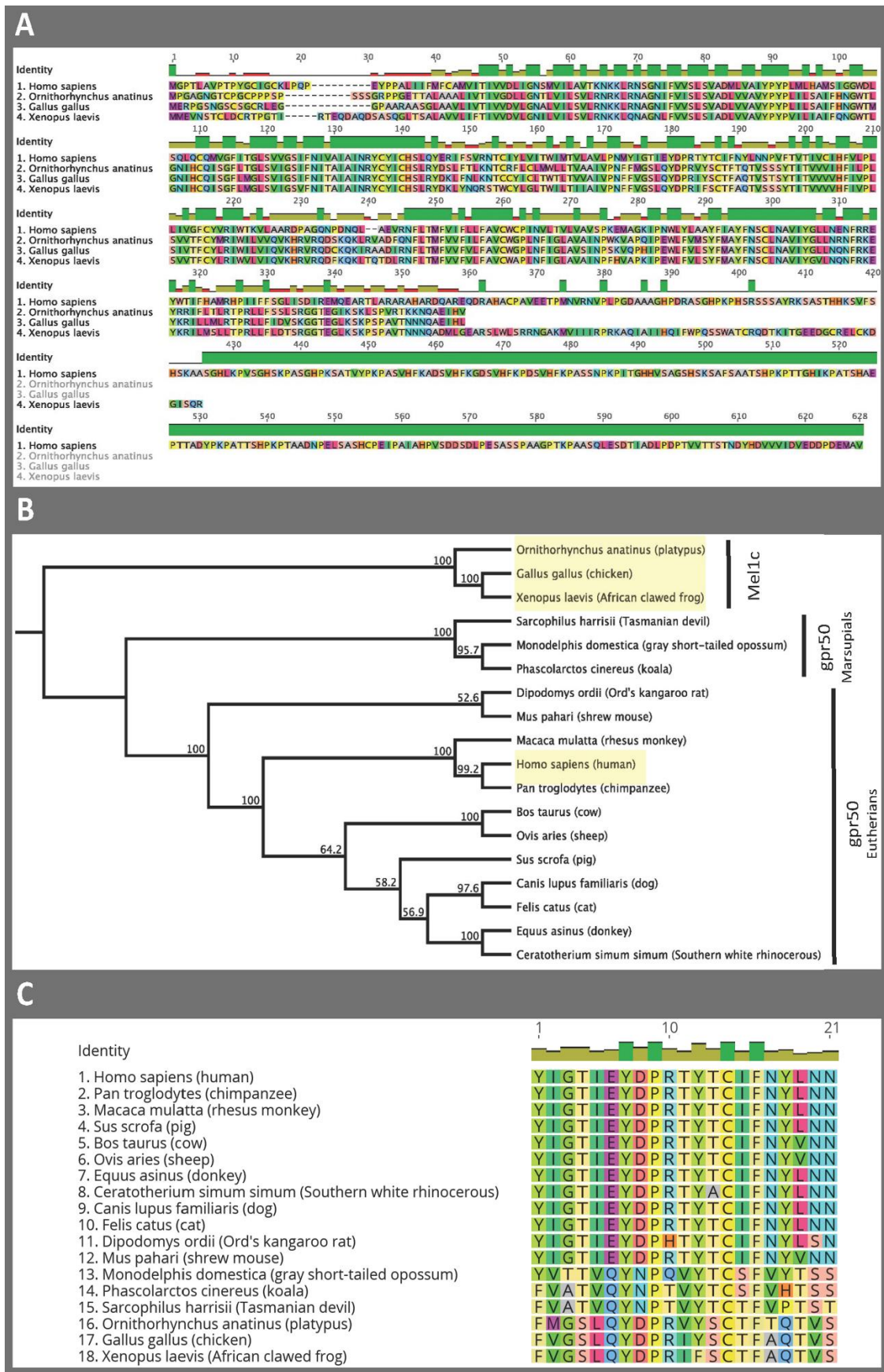


Figure 106 : Platypus has retained ancestral Mel1c showing that the ortholog GPR50 evolved after the divergence of monotremes from therian mammals.

[A] Protein alignment of human (*Homo sapiens*) GPR50 with platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), chicken (*Gallus gallus*) and the clawed frog (*Xenopus laevis*) Mel1c. Each amino acid is depicted by its single letter symbol and an associated color. Identity bar above alignment denotes the similarity at each amino acid position between the four species: green = all homologous; yellow = three species homologous; red = two species homologous; no bar = no homology. Every 50 amino acid positions are labeled. [B] Neighbour-Joining phylogenetic tree showing platypus clustering together with chicken and the clawed frog Mel1c while marsupial GPR50 and eutherian GPR50 form their own distinct clusters. Bootstrap support values are shown for each node. The four species from protein alignment in panel A are highlighted in yellow. [C] Amino acid sequence of the second extracellular loop (E2) of Mel1c and GPR50 for all species used in the phylogenetic tree from panel B. Each amino acid is depicted by its single letter symbol and an associated color. Identity bar above alignment denotes the similarity at each amino acid position between all species: green = all homologous; yellow = some species homologous. Every 10 amino acid positions are labeled.

C. Expression and subcellular localization of recombinant platypus, clawed frog and chicken Mel1c receptors in COS7 cells

Mel1c from *G. gallus* and *X. laevis* was synthesized according to the reported predicted sequences and built in the same expression vector as platypus Mel1c. The first step was to determine whether they are expressed and active in a cellular model. We started by fusing the N-terminus of the three sequences to a 3HA flag, for which potent antibodies exist. For this particular purpose, the transient expression of the receptors into COS7 cells led to the images in Figure 107. Immune staining of non-permeabilized COS7/3HA-Mel1c cells with a fluorescent anti-HA antibody revealed major expression of platypus, *X. laevis*, and *G. gallus* Mel1c receptors at the plasma membrane. No fluorescent signal was detected from native COS7 cells.

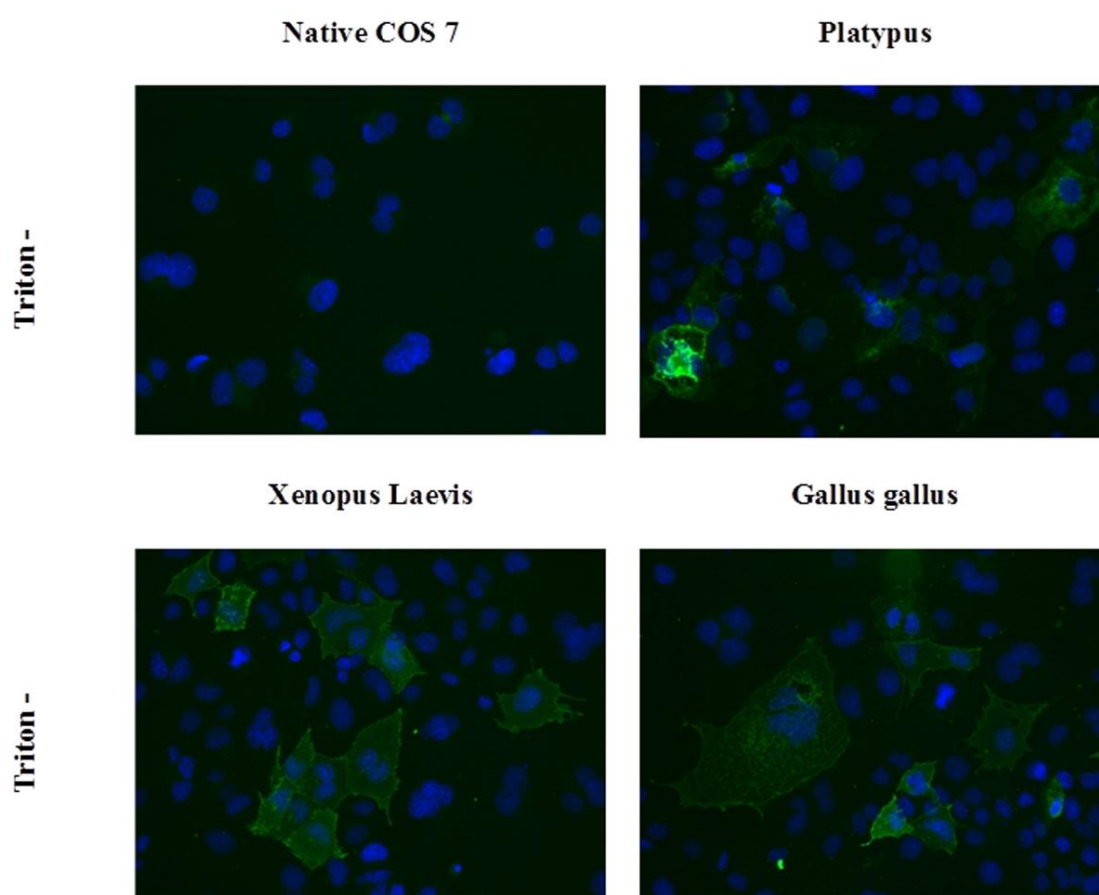


Figure 107 : Expression of Mel1c receptors in COS7 cells.

Subcellular localization of HA epitope-tagged Mel1c receptors. Immunofluorescence studies were performed with transfected COS7 cells. COS7 cells and COS7 expressing 3HA-platypus Mel1C or 3HA-*X. laevis* Mel1C or 3HA-*G. gallus* Mel1C receptors were probed with mouse monoclonal anti-HA antibody directed against the N-terminal epitope tag present on recombinant receptor. Experiments were carried out with paraformaldehyde-fixed and non-permeabilized cells. The fluorescence images were obtained by using Alexa 488-conjugated goat anti- mouse IgG secondary antibody. COS7 cell nuclei were stained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole. Native COS7 cells were used as a negative control.

D. Melatonin binding

Next, we prepared membranes for clawed frog, platypus, and chicken from cells overexpressing their respective Mel1c receptors and attempted to measure the binding of 2[¹²⁵I]-iodomelatonin. Saturations were obtained and showed specific bindings for all species tested. This was the first time that the Mel1c receptor from a mammal was shown to bind 2[¹²⁵I]-iodomelatonin. The saturation curves (Figure 108) for the three species were similar to those obtained under similar conditions for the melatonin receptors that have been cloned, expressed, and characterized in our laboratory. The expression levels of the Mel1c receptors from these species stably expressed in CHO cells were 18 fmol/mg of protein for clawed frog and 36 fmol/mg of protein for the platypus. These levels are in the lower range of expression for melatonin receptors (MT₁ and MT₂ receptors) from more classical species we generated previously, with expression levels ranging from 80 to 2650 fmol/mg of protein in rats and humans [27] and 300 to 700 fmol/mg of protein for mice [28]. In contrast, the K_D of the two Mel1c receptors for melatonin was 133 pM for clawed frog and 67 pM for platypus.

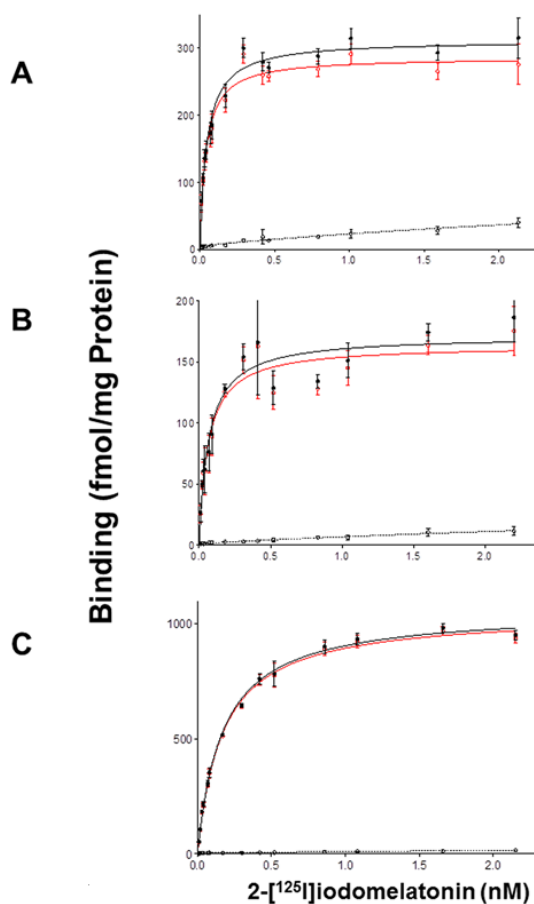


Figure 108 : Saturation binding experiments for 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin.

Membranes from COS7 cells transfected with platypus Mel1c (A), clawed frog Mel1c (B), and chicken Mel1c (C) were used to measure the binding at Mel1c receptors. Red line represents specific binding, black line represents total binding and dotted line represents non-specific binding.

E. Molecular pharmacology

To obtain stable expression of the receptor for future studies, a preliminary step involving transient expression of the receptor was performed. The Mel1c receptors from the three species were expressed in transiently transfected COS7 cells. A limited number of compounds were tested in order to gain a preliminary perception of the characteristics of Mel1c from these species. The profiles for chicken, clawed frog, and platypus are reported here for the first time. The comparative data are given in Table 21. The profiles comprise the binding affinities of a dozen compounds for the receptors of the three species. These profiles were quite similar, which was not surprising for the chicken and clawed frog, despite their evolutionary distance. However, the similarity with pharmacological profiles of the monotreme Mel1c was somewhat unexpected. Simple linear correlations between the sets of data (taken 2 by 2) led to $R^2 > 0.95$. These correlations translate a view of the proximity of the receptor affinities to some compounds from a pure biochemical point of view.

Products	pKi Platypus	pKi Xenopus laevis	pKi Gallus gallus
Melatonin	8,6	8,8	8,6
2-Iodomelatonin	10,2	10,0	9,8
S 70254	6,6	6,8	6,6
4P-PDOT	6,7	6,7	6,4
Agomelatin / S 20098	9,6	9,2	8,9
S 22153	7,6	7,0	6,7
Ramelteon / FLN68	10,1	10,1	9,8
Luzindole	5,9	5,7	5,4

Table 21 : Comparison of the molecular pharmacology of platypus, xenopus and chicken melatonin Mel1c receptors.

Binding experiments were performed with 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin as the radioligand using COS7 cells transiently transfected with the respective Mel1c gene. Experiments using two different transfections were performed separately. Each point was the mean of a triplicate determination. Concentration isotherm curves were obtained using 10 concentrations of each product from 10⁻¹³ to 10⁻⁴ M.

S70254, 2-iodo-N-2-[5-methoxy-2-(naphthalen-1-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-yl]] acetamide;

4P-P-DOT, N-[(2S,4S)-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl]propanamide;

Agomelatin® (S20098), N-(2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)ethyl)acetamide;

S22153, N-[2-(5-ethylbenzothiophen-3-yl)ethyl]acetamide;

Ramelteon® (FLN68), (S)-N-(2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno-(5,4)furan-8-yl)ethyl)propionamide;
Luzindole, N-acetyl-2-benzyl-tryptamine.

Because the profiles of the Mel1c bindings are similar between birds (chicken) and amphibians (clawed frog), it seemed important to proceed to studies using only the Mel1c from clawed frog. Thus, we focused on the stable expression in CHO cells of the platypus and clawed frog Mel1c receptors. These two receptors were expressed at workable levels, although other melatonin receptors were sometimes expressed at up to 2 pmol/mg of protein [27] depending on the method chosen for establishing the stable cell line. The last step of this characterization

was to obtain on this biological material, a pharmacological profile for a series of 19 ligands for these two species compared to the human melatonin receptors MT₁ and MT₂. The curves obtained for platypus Mel1c with the products are given in Figure 109A and for the clawed frog Mel1c in Figure 109B as examples.

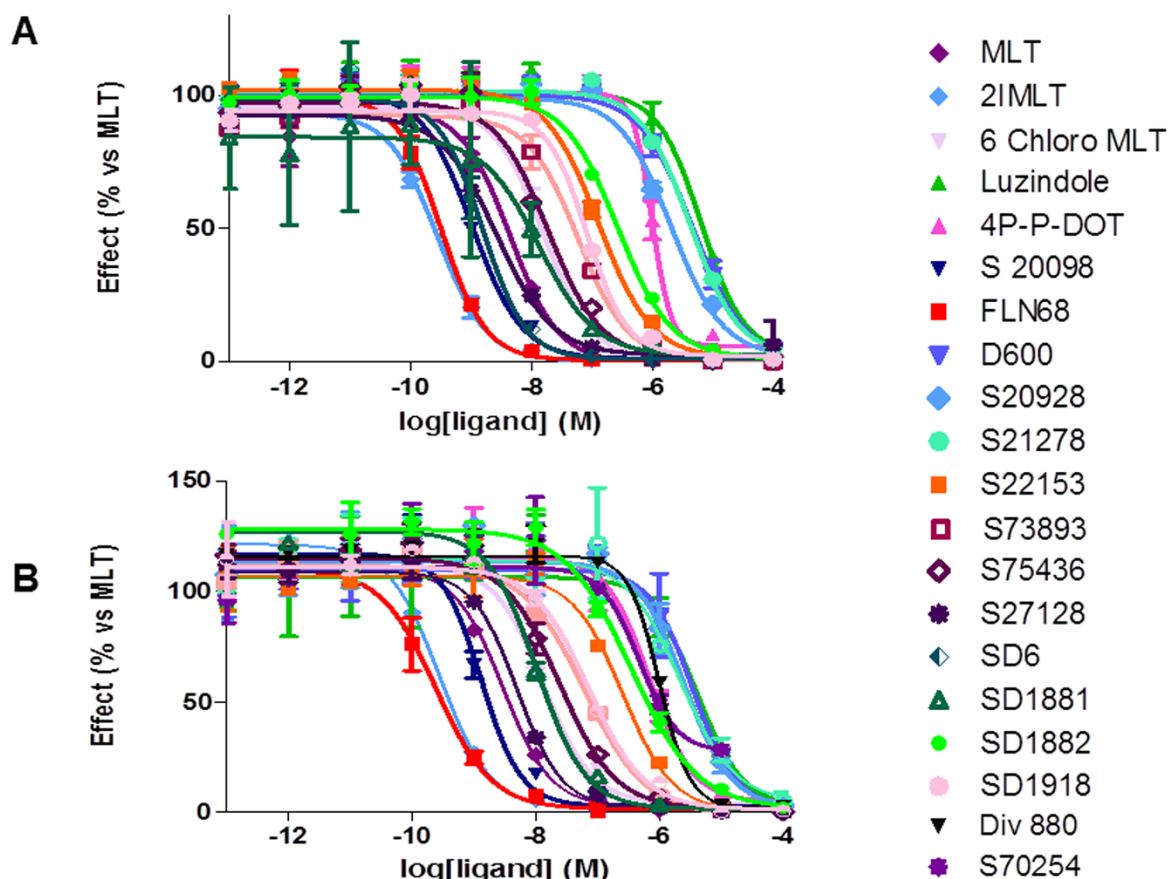


Figure 109 : Molecular pharmacology of the Mel1c receptors from platypus (A) and clawed frog (B).

The ligand was 2-[¹²⁵I] -iodomelatonin. Independent experiments were performed at least twice using different batches of membranes from stably transfected CHO cells and each point was obtained in triplicate. SD6, N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]iodoacetamide; 2IMLT, 2-iodomelatonin; 6-Cl- Chloro MLT, 6-chloromelatonin; Luzindole, N-acetyl-2-Br-MLT; 2-bromomelatonin, benzyltryptamine; 4P-P-DOT, N-[(2S,4S)-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl]propanamide; Agomelatin® (S20098), N-(2-(7-methoxynaphthalen-1-yl)ethyl)acetamide; Ramelteon® (FLN68), (S)-N-(2-(1,6,7,8-tetrahydro-2H-indeno-(5,4)furan-8-yl)ethyl)propionamide; D600, methoxyverapamil; 5HT, 5-hydroxytryptamine; S20928, N-[2-(1-naphthyl)ethyl] cyclobutanecarboxamide; S21278, N-[2-(6-methoxybenzimidazol-1-yl)ethyl]acetamide; S22153, N-[2-(5-ethylbenzothiophen-3-yl)ethyl]acetamide; S27128-1, N-[2-(2-iodo-5-methoxy-6-nitro-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide; S73893, N-[3-methoxy-2-(7-methoxy-1-naphthyl)propyl]acetamide; S75436, 2-fluoro-N-[3-hydroxy-2-(7-methoxy-1-naphthyl) propyl]acetamide; S77834S27128, N-[(8-[2-(2-iodo-5-methoxy-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d][7] annulen-106-nitro-1H-indol-3-yl)methylethyl]acetamide; S77840, 1-[(8-methoxy-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d][7]annulen-101H-indol-3-yl)methyl]urea ethyl]iodoacetamide; SD1881, N-[2-(6-iodo-5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamideiodomelatonin; SD1882, N-[2-(4-iodo-5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide; SD1918, N-[7-iodomelatonin; Div 880, 2-(7-iodo-5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide2-[(2-iodo-4,5-dimethoxyphenyl)methyl]-4,5-dimethoxy phenyl; S70254, 2-iodo-N-2-[5-methoxy-2-(naphthalen-1-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-yl]]acetamide. Concentration isotherms were obtained using 10 concentrations of each product from 10⁻¹³ to 10⁻⁴ M

Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus (Ornithorhynchus anatinus)

Nineteen compounds were tested, from the classic melatonin ligands to the more obscure D600, a specific MT1 ligand [25], and the marketed drugs Ramelteon® and Agomelatin®, as well as the iodinated derivatives of melatonin (e.g., 4-iodo, 2-iodo, or 6-iodo melatonin). The data were compared to that of the human MT1 and MT2 (Table 22).

Compounds	Platypus Mel1c	Xenopus Mel1c	hMT1	hMT2
Melatonin	8.7	8.7	9.6	9.3
2-iodomelatonin	9.9	9.7	10.7	9.8
6-chloromelatonin	8.1	8.1	8.7	9.6
Luzindole	5.6	5.6	6.6	7.6
4P-PDOT	6.2	6.1	6.8	8.9
Agomelatine® (S20098)	9.4	9.1	9.9	9.9
Ramelteon® (FLN68)	9.9	9.9	10.1	10.3
D600	5.7	5.7	7.0	<5
S20928	6.1	5.9	7.1	7.0
S21278	5.7	5.8	6.2	6.2
S22153	7.3	6.9	8.2	8.0
S73893	7.7	7.4	8.4	8.1
S75436	8.2	7.8	7.9	8.9
S27128	9.0	8.6	8.9	9.2
DIV880	ND	5.9	6.1	8.0
SD6	9.4	ND	9.9	9.9
SD1881 (6-iodomelatonin)	8.4	8.1	8.8	8.6
SD1882 (4-iodomelatonin)	7.0	6.6	7.8	7.9
SD1918 (7-iodomelatonin)	7.5	7.3	7.3	7.3
S70254	ND	6.33	7.0	9.0

Table 22 : Molecular pharmacology of Mel1c receptors in platypus and xenopus compared to the human MT1 and MT2 melatonin receptors.

ND: not determined. Luzindole, N-acetyl-2-benzyltryptamine; 4P-PDOT, N-[(2S,4S)-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl]propanamide; D600, methoxyverapamil; S20928, (N-[2-(1-naphthyl)ethyl]cyclobutanecarboxamide); S21278, N-[2-(6-methoxybenzimidazol-1-yl)ethyl]acetamide; S22153, N-[2-(5-ethylbenzothiophen-3-yl)ethyl]acetamide; S73893, N-[3-methoxy-2-(7-methoxy-1-naphthyl)propyl]acetamide; S75436, 2-fluoro-N-[3-hydroxy-2-(7-methoxy-1-naphthyl)propyl]acetamide; S27128-1, N-[(8-methoxy-6-nitro-1H-indol-3-yl)ethyl]acetamide; DIV880, 2-(2-[(2-iodo-4,5-dimethoxyphenyl)methyl]-4,5-dimethoxy phenyl); SD6, N-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethyl]iodoacetamide; S70254, 2-iodo-N-2-[5-methoxy-2-(naphthalen-1-yl)-1H-pyrrolo[3,2-b]pyridine-3-yl]acetamide. Binding experiments were performed with 2-[125I]-iodomelatonin as the radioligand, Experiments were run in triplicate, at least twice using different batches of membranes from stably transfected CHO cells. Concentration isotherms were obtained using 10 concentrations of each product from 10⁻¹³ to 10⁻⁴ M..

We obtained an almost perfect match between the results obtained with chicken Mel1c, which is a reference in this domain, and those obtained with the platypus Mel1c that was cloned and characterized here for the first time. The simplest correlation coefficient (R^2) was 0.98 (Figure 110).

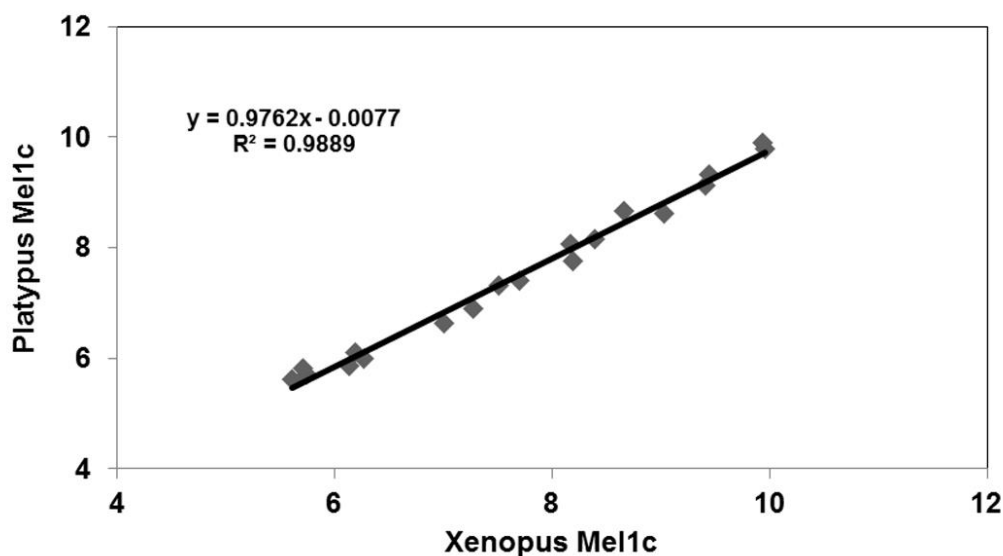


Figure 110 : Correlation between the data obtained from platypus Mel1c and those obtained with clawed frog Mel1c.

Data were obtained in a binding assay with 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin as the radioligand. See Figure 109.

At first glance, the data do not seem to differ from one species to another, with either the Mel1c receptor, as shown above with transiently expressed receptor (Table 21), or the human MT₁ and MT₂ receptors. In order to validate this observation, the data obtained with the clawed frog Mel1c receptor and platypus Mel1c receptor were plotted against the data obtained for MT₁ and MT₂ (Figure 111).

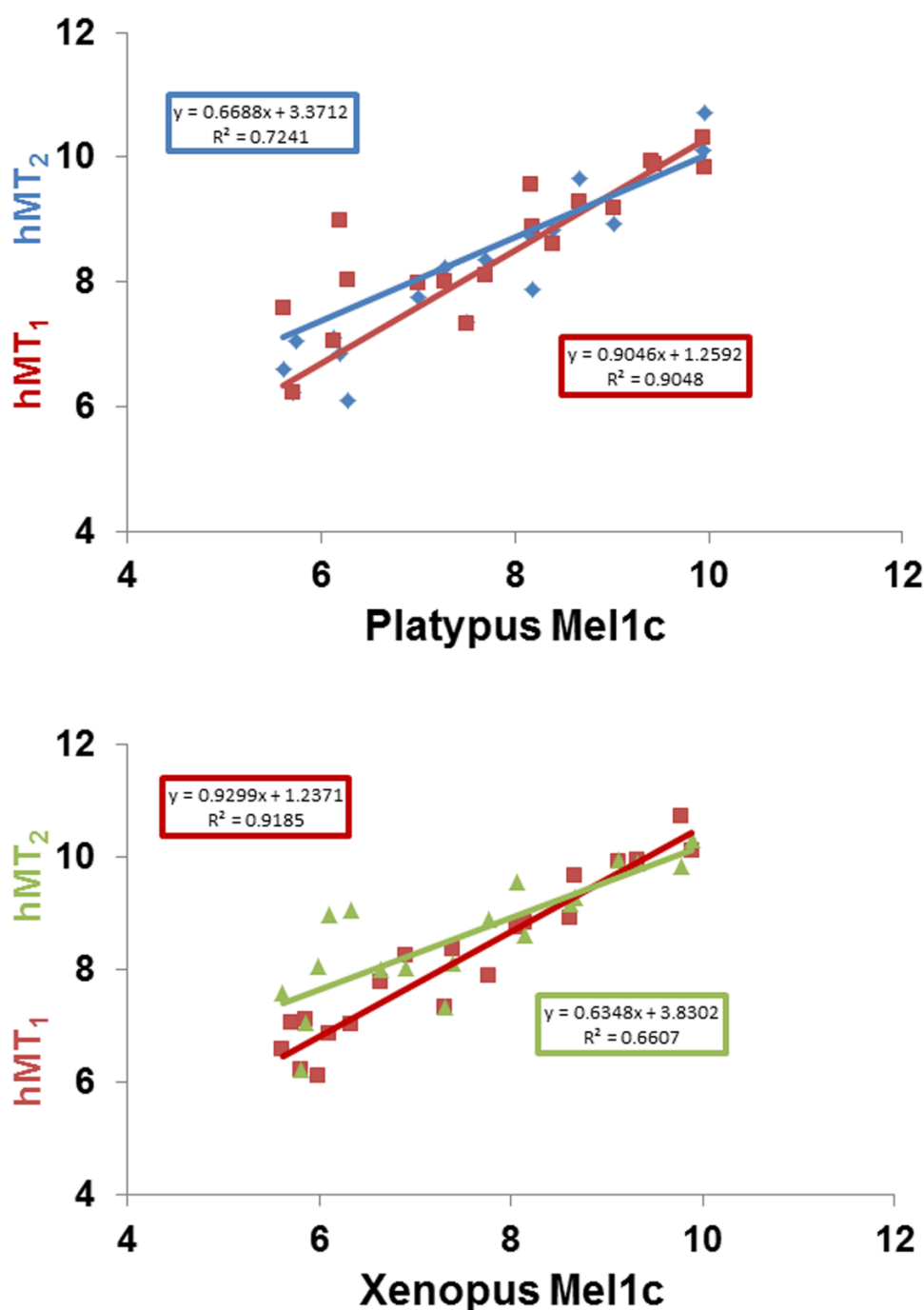


Figure 111 : Comparison of the correlations between the molecular pharmacology of platypus Mel1c (A) or clawed frog Mel1c (B) and human melatonin receptors MT1 and MT2

The correlation in red is between hMT₁ and platypus Mel1c; in blue, between hMT₂ and Platypus Mel1c (upper panel). The correlation in red is between hMT₁ and clawed frog Mel1c; and in green between hMT₂ and clawed frog Mel1c (lower panel.) See Figure 109 for data.

At first glance, Mel1c seems to behave identically towards this selection of compounds among the two species (human versus platypus), but it is quite different when the correlation coefficients are examined. Surprisingly, the Mel1c data correlate highly ($R^2 = 0.9$) with MT₁ and more poorly with MT₂ ($R^2 = 0.7$ for platypus and 0.6 for Clawed frog).

IV. Discussion

Platypus and echidna are the oldest surviving mammalian lineage, having diverged from other mammals approximately 190 MYA [29]. These species have an astonishing track record of informing us about the evolution of the mammalian genome [30] and individual genes (see for example Grutzner *et al.* [17], Cortez *et al.* [20], Tsend-Ayush *et al.* [31] and Hu *et al.* [32]). Comparing the GPCRs from different species can help us understand the structure of these receptors, as well as their binding characteristics [33]. To prepare for the expression, purification, crystallization, and characterization of receptors, a preliminary approach is to closely study the various receptors from diverse species. Natural sequences have evolved throughout these species; though maintaining specificity towards their natural ligand (see Li *et al.* for complete melatonin receptor evolutionary divergences [34]). They show that it is slightly different for the melatonin-related receptor (GPR50) and Mel1c.

The seminal work of Dufourny *et al.* [7] demonstrated from minute genetic analyses that the Mel1c receptor from amphibians and birds gave rise to GPR50 in mammals, which is still categorized as an orphan receptor because it does not bind melatonin or analogs, confirmed independently by us and others (C Ouvry & JA Boutin, unpublished). It has been a challenge for a long time to understand when GPR50 lost its binding during mammalian evolution and what this means for the function and evolution of melatonin and GPR50.

Studies of molecular evolution have been reported frequently in the literature. The trees of phylogenetic affiliation has been used to better understand the passage from one species to another, especially by studying species that seem far away from each other, as well as those that are closely related. Monotremes occupy a key position in mammalian phylogeny and the present paper attempted to determine the evolution and binding of melatonin. Therefore, whether the melatonin receptor cloned from platypus is in fact Mel1c or GPR50 was of interest.

The predicted sequence was very close to the actual sequence with a single mutation at position 44. The structure of the gene was as expected because of the common nature of all of the melatonin receptors throughout living species, two exons separated by a long intron of ~30,000 bp (Figure 112A). Alignment of the platypus receptor with chicken and frog Mel1c shows very high similarity at the amino acid level (Figure 112B). However, when including human GPR50 in the protein alignment, it is apparent that the platypus is much more similar to chicken and from than to human GPR50 (Figure 106A). Furthermore, phylogenetic analysis (including a range of eutherian and marsupial species) shows the platypus grouping with chicken and frog to the exclusion of all therian species (Figure 106B). This suggests that platypus does in fact have the ancestral Mel1c receptor and that the “mammalian” GPR50 evolved after monotremes diverged from therian mammals ~190 MYA. Of interest in the present study is the similarity of the melatonin binding Mel1c sequence throughout the millions of years of evolution between amphibians, birds and even monotremes (Figure 112B). In stark contrast is the highly variable GPR50 in therian mammals that have lost their ability to bind melatonin. This strongly suggests that the initial loss of binding allowed GPR50 to then continue to diverge in therian mammals.

There is still a lack of consensus on which specific amino acid changes in GPR50 have caused the lack of binding of this receptor to melatonin, despite many mutation and modeling studies on functional melatonin receptors (see Pala *et al.*, for review [35]). The majority of studies have focused on the transmembrane domains. However, Clement *et al.* proposed that the second extracellular loop (E2) in MT₁ is instead important for melatonin binding [26]. They found that Gln181 in hMT₁ was highly important for melatonin binding through a stabilizing interaction with Phe179. All melatonin-binding receptors investigated had Gln at this position, while human GPR50 instead had a Thr. Upon examination of the same E2 region of Mel1c in the platypus, chicken and frog we found there also to be a Gln at this same position (Figure 106C), while all eutherian species at this position contained Thr and the three marsupial species analyzed had Thr, His or Pro (Figure 106C). This supports the proposal from Clement *et al.* [26] that if Gln in the E2 region of melatonin receptors is important for binding melatonin, then the change of this amino acid to Thr (or His/Pro) may be responsible for the inability of GPR50 to be a functional melatonin receptor. As the marsupial species also lacked Gln, this further suggests that Mel1c changing to GPR50 occurred after the divergence of monotremes and before the therian split, giving a tighter timeframe of 190 - 160MYA. Further support for this hypothesis is that the marsupial GPR50 also has the characteristic elongated C-tail that eutherian GPR50 has [7]. Functional studies using marsupial GPR50 would need to be undertaken to verify its inability to bind melatonin before committing to this timeframe.

In order to confirm the observations, we found in the amino acid sequence for platypus melatonin receptor, we cloned platypus Mel1c for the first time and expressed it to study its binding capacity and function. The three Mel1c receptors studied here (from frog, chicken and platypus) were expressed at the cell surface. Considering the binding aspects, few data have been reported in the literature on the pharmacological profiles of receptors from uncommon species. Chicken and clawed frog Mel1c have been known for some time to bind melatonin [8,36]. To the best of our knowledge, few data have been published on the binding characteristics of Mel1c receptors from other species, and even less has been published regarding various molecules in a binding assay [9,10]. Pharmacological profiles have been published, but using a pigment aggregation *X. laevis* melanophore-based assay (i.e., a functional assay) rather than a molecular one [9,11]. Overall, with the few compounds that have been described in clawed frog Mel1c [36] and in chicken Mel1c [9,11], no major discrepancies were recorded here. Though the present work provides new information on the molecular pharmacology of platypus Mel1c, the ancestor of the GPR50 orphan receptor in mammals, the available data on the roles of those two receptors remains scarce. Interestingly, GPR50 is expressed strongly in specific brain areas (hypothalamo-pituitary regions [37-40] and ependymal cell layer of the third ventricle [41]) in many mammalian species, and Mel1c is widely expressed in the chicken brain [8]. Because we cloned the receptor from whole brain, one can conclude that Mel1c is also expressed broadly in this organ in the platypus. Furthermore, from the molecular pharmacology point of view, Mel1c is closer to MT₁ than to MT₂; its profile based on a set of 19 compounds as diverse as possible from the melatoninergic prospect is similar to human MT₁.

Complementing the initial work of Dufourny *et al.* [7], mammalian Mel1c from the platypus fills a gap in terms of sequence and gene structure, as well as molecular pharmacology characteristics, between the melatonineric systems of amphibians and birds and that of mammals. This work also complements nicely our current efforts to clone melatonin receptors from various species to better understand their sequence/pharmacology relationships [27,28,42,43].

In conclusion, the present work establishes for the first time that melatonin binding to GPR50 was lost after the divergence of monotremes and that this even likely sparked rapid divergence of GPR50 in therian mammals.

V. References

1. Levoye A, Dam J, Ayoub MA, Guillaume JL, Couturier C, Delagrangé P, et al. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.* 2006; 25: 3012-3023. doi: 10.1038/sj.emboj.7601193.
2. Becker-Andre M, Wiesenberger I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, et al. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol. Chem.* 1994; 269: 28531-28534.
3. Jetten AM, Joo JH. Retinoid-related Orphan Receptors (RORs). Roles in Cellular Differentiation and Development. *Adv. Dev. Biol.* 2006; 16: 313-355. doi: 10.1016/S1574-3349(06)16010-X.
4. Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol. Chem.* 2000; 275: 31311-31317. doi: 10.1074/jbc.M005141200.
5. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LFJ. Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 1996; 386: 219-224.
6. Gubitza AK, Reppert SM. Assignment of the melatonin-related receptor to human chromosome X (GPR50) and mouse chromosome X (Gpr50). *Genomics.* 1999; 55: 248-251. doi: 10.1006/geno.1998.5661.
7. Dufourny L, Levasseur A, Migaud M, Callebaut I, Pontarotti P, Malpoux B, et al. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c. Evidence of rapid evolution in mammals. *BMC. Evol. Biol.* 2008; 8: 105. doi: 10.1186/1471-2148-8-105.
8. Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LFJ. Melatonin receptors are for the birds. Molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron.* 1995; 15: 1003-1015.
9. Pickering H, Sword S, Vonhoff S, Jones R, Sugden D. Analogues of diverse structure are unable to differentiate native melatonin receptors in the chicken retina, sheep pars tuberalis and *Xenopus melanophores*. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119: 379-387.
10. Jockers R, Petit L, Lacroix I, de CP, Barrett P, Morgan PJ, et al. Novel isoforms of Mel1c melatonin receptors modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11: 1070-1081. doi: 10.1210/mend.11.8.9964.
11. Teh MT, Sugden D. Comparison of the structure-activity relationships of melatonin receptor agonists and antagonists. Lengthening the N-acyl side-chain has differing effects on potency on *Xenopus melanophores*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1998; 358: 522-528.
12. Garratt PJ, Jones R, Tocher DA, Sugden D. Mapping the melatonin receptor. 3. Design and synthesis of melatonin agonists and antagonists derived from 2-phenyltryptamines. *J Med. Chem.* 1995; 38: 1132-1139.
13. Sugden D, Yeh LK, Teh MT. Design of subtype selective melatonin receptor agonists and antagonists. *Reprod Nutr Dev.* 1999; 39: 335-344.
14. Faust R, Garratt PJ, Jones R, Yeh LK, Tsotinis A, Panoussopoulou M, et al. Mapping the melatonin receptor. 6. Melatonin agonists and antagonists derived from

- 6H-isoindolo[2,1-a]indoles, 5,6-dihydroindolo[2,1-a]isoquinolines, and 6,7-dihydro-5H-benzocazepino[2,1-a]indoles. *J Med. Chem.* 2000; 43: 1050-1061.
15. Sugden D. N-acyl-3-amino-5-methoxychromans. A new series of non-indolic melatonin analogues. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; 254: 271-275.
16. Pégurier C, Morellato L, Chahed E, Andrieux J, Nicolas JP, Boutin JA, et al. Synthesis of new arylalkoxy amido derivatives as melatonergic ligands. *Bioorg Med Chem.* 2003; 11: 789-800.
17. Grutzner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El-Mogharbel N, O'Brien PC, Jones RC, et al. In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature.* 2004; 432: 913-917. doi: 10.1038/nature03021.
18. Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D, Alsop AE, et al. Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res.* 2008; 18: 965-973. doi: 10.1101/gr.7101908.
19. Swanson WJ, Vacquier VD. The rapid evolution of reproductive proteins. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 137-144. doi: 10.1038/nrg733.
20. Cortez D, Marin R, Toledo-Flores D, Froidevaux L, Liechti A, Waters PD, et al. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature.* 2014; 508: 488-493. doi: 10.1038/nature13151.
21. Daish TJ, Casey AE, Grutzner F. Lack of sex chromosome specific meiotic silencing in platypus reveals origin of MSCI in therian mammals. *BMC. Biol.* 2015; 13: 106. doi: 10.1186/s12915-015-0215-4.
22. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic. An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012; 28: 1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
23. Coge F, Guenin SP, Fery I, Migaud M, Devavry S, Slugocki C, et al. The end of a myth. Cloning and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 158: 1248-1262. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00453.x.
24. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
25. Legros C, Devavry S, Caignard S, Tessier C, Delagrangé P, Ouvry C, et al. Melatonin MT(1) and MT(2) receptors display different molecular pharmacologies only in the G-protein coupled state. *Br. J. Pharmacol.* 2014; 171: 186-201. doi: 10.1111/bph.12457.
26. Clement N, Renault N, Guillaume J-L, Cecon E, Journé A-S, Laurent X, et al. Importance of the second extracellular loop for melatonin MT 1 receptor function and absence of melatonin binding in GPR50. *Br. J. Pharmacol.* 2017; 16: 168. doi: 10.1111/bph.14029.
27. Audinot V, Bonnaud A, Grandcolas L, Rodriguez M, Nagel N, Galizzi JP, et al. Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 75: 2007-2019. doi: 10.1016/j.bcp.2008.02.022.
28. Devavry S, Legros C, Brasseur C, Cohen W, Guenin SP, Delagrangé P, et al. Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT(1) and MT(2). *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 677: 15-21. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.12.009.

29. Phillips MJ, Bennett TH, Lee MSY. Molecules, morphology, and ecology indicate a recent, amphibious ancestry for echidnas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 17089-17094. doi: 10.1073/pnas.0904649106.
30. Warren WC, Hillier LW, Marshall Graves JA, Birney E, Ponting CP, Grutzner F, et al. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature*. 2008; 453: 175-183. doi: 10.1038/nature06936.
31. Tsend-Ayush E, He C, Myers MA, Andrikopoulos S, Wong N, Sexton PM, et al. Monotreme glucagon-like peptide-1 in venom and gut. One gene - two very different functions. *Sci. Rep*. 2016; 6: 37744. doi: 10.1038/srep37744.
32. Hu Q, Tan H, Irwin DM. Evolution of the Vertebrate Resistin Gene Family. *PLoS. One*. 2015; 10: e0130188. doi: 10.1371/journal.pone.0130188.
33. He C, Tsend-Ayush E, Myers MA, Forbes BE, Grutzner F. Changes in the ghrelin hormone pathway maybe part of an unusual gastric system in monotremes. *Gen. Comp Endocrinol*. 2013; 191: 74-82. doi: 10.1016/j.ygcen.2013.06.003.
34. Li DY, Smith DG, Hardeland R, Yang MY, Xu HL, Zhang L, et al. Melatonin receptor genes in vertebrates. *Int. J Mol. Sci*. 2013; 14: 11208-11223. doi: 10.3390/ijms140611208.
35. Pala D, Lodola A, Bedini A, Spadoni G, Rivara S. Homology models of melatonin receptors. Challenges and recent advances. *Int. J Mol. Sci*. 2013; 14: 8093-8121. doi: 10.3390/ijms14048093.
36. Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1994; 91: 6133-6137.
37. Ivanova EA, Bechtold DA, Dupre SM, Brennand J, Barrett P, Luckman SM, et al. Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab*. 2008; 294: E176-E182. doi: 10.1152/ajpendo.00199.2007.
38. Drew JE, Barrett P, Mercer JG, Moar KM, Canet E, Delagrangé P, et al. Localization of the melatonin-related receptor in the rodent brain and peripheral tissues. *J Neuroendocrinol*. 2001; 13: 453-458.
39. Batailler M, Mullier A, Sidibe A, Delagrangé P, Prevot V, Jockers R, et al. Neuroanatomical distribution of the orphan GPR50 receptor in adult sheep and rodent brains. *J Neuroendocrinol*. 2012; 24: 798-808. doi: 10.1111/j.1365-2826.2012.02274.x.
40. Sidibe A, Mullier A, Chen P, Baroncini M, Boutin JA, Delagrangé P, et al. Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *J Pineal Res*. 2010; 48: 263-269. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00750.x.
41. Barrett P, Ivanova E, Graham ES, Ross AW, Wilson D, Ple H, et al. Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol*. 2006; 191: 687-698. doi: 10.1677/joe.1.06929.
42. Audinot V, Mailliet F, Lahaye-Brasseur C, Bonnaud A, Le GA, Amosse C, et al. New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 2003; 367: 553-561. doi: 10.1007/s00210-003-0751-2.

43. Mailliet F, Audinot V, Malpaux B, Bonnaud A, Delagrangé P, Migaud M, et al. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor. Comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 667-677.

Supplementary figure



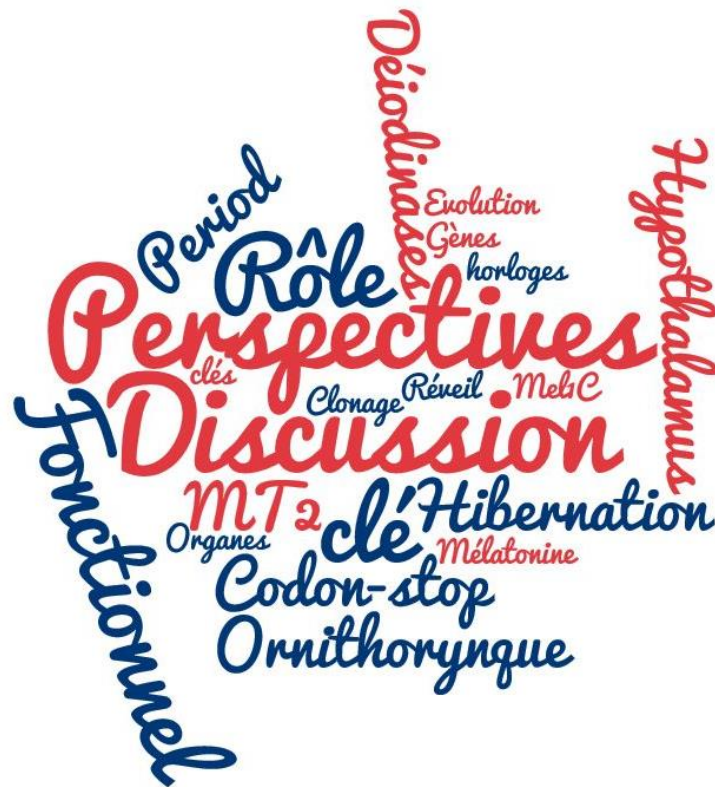
Figure 112 : Platypus Mel1c gene in comparison with chicken and the clawed frog.

[A] Structure of Mel1c in platypus. The entire gene is 34,831 bp in length, where ~30,000 bp intron separates two exons: exon 1 is 184 bp long and exon 2 is 866 bp long. Every 5000 bp are labeled. [B] Protein alignment of Mel1c from platypus (*O. anatinus*), chicken (*G. gallus*) and the clawed frog (*X. laevis*), showing that Mel1c is very conserved at the amino acid level. Each amino acid is depicted by its single letter symbol and an associated color. Identity bar above alignment denotes the similarity at each amino acid position between the four species: green = all homologous; yellow = two species homologous; no bar = no homology. Every 10 amino acid positions are labeled. [C] DNA alignment of Mel1c exons from platypus (*O. anatinus*), chicken (*G. gallus*) and the clawed frog (*X. laevis*), showing that at a nucleotide level Mel1c has more variation compared to at the amino acid level. Grey bars indicate homology between all three species while colors indicate SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms); red = A; green = T; yellow = G; purple = C. Identity bar above alignment denotes the similarity at each nucleotide position between the three species: green = all homologous; yellow = two species homologous; no bar = no homology. Every 20 bp are labeled. -

**Il faut deviner le peintre pour comprendre
l'image**

Friedrich Nietzsche

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES



I. Variation de l'expression génique pendant les différentes phases de l'hibernation du hamster d'Europe

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables les animaux doivent mettre en place des stratégies permettant leur survie. Les hibernants vont réduire de manière drastique leur température corporelle et leur métabolisme afin de diminuer notablement leur consommation énergétique. Les mécanismes régissant ce phénomène sont encore très mal connus. De récentes études de transcriptomique ont permis de mettre en évidence des variations d'expression génique spécifiques de certains organes. Cette approche sous-tend que les mécanismes de contrôle de l'hibernation sont le fait non pas de l'expression d'un set de gènes spécifiques retrouvé uniquement chez les hibernants mais d'un ensemble de gènes qui serait finement régulé pendant cette période d'hypothermie. A partir de cette hypothèse, nous avons choisi une approche « gènes candidats », sélectionnés selon leur implication dans des fonctions affectées pendant l'hibernation. L'étude de ces gènes a été réalisée dans huit organes centraux et périphériques. Cette stratégie permet l'observation de mécanismes globaux communs à l'ensemble des organes mais également des phénomènes caractéristiques d'un organe en particulier. Les études transcriptomiques faites sur des animaux hibernants incluent très souvent un groupe d'animaux en PL. Nous avons fait le choix de nous focaliser sur trois groupes d'animaux tous en PC afin que les variations géniques observées soient spécifiques des différentes phases de l'hibernation et non pas des variations dues aux importantes adaptations physiologiques qui ont lieu lors du passage du phénotype PL à PC. L'objectif de ce projet était de répondre, entre autres, aux questions suivantes :

- Existe-t-il des variations d'expression géniques quantifiables entre la phase de torpeur et le réveil ?
- Quelles sont les familles de gènes dont les variations sont les plus significatives ?
- Existe-t-il des mécanismes communs l'ensemble des organes ?
- Certains organes sont-ils particulièrement concernés par des variations de l'expression géniques ?
- Les variations de l'expression génique sont-elles traduites au niveau sanguin ?

La quantification de l'expression génique a été réalisée grâce à la technique de digital droplet PCR qui permet de déterminer de manière absolue le nombre de copie d'ARN dans un échantillon donné en s'affranchissant de l'utilisation de gènes de ménages. Dans un premier temps, une plateforme semi robotisée a été mise en place permettant de traiter un nombre important d'échantillons dans des conditions minimisant les risques de contaminations croisées, d'erreurs de pipetage et de dégradation des ARN. En effet, une juste quantification absolue du matériel génétique dans un échantillon est directement liée à la qualité et la quantité de matrice initiale. Cet aspect, pourtant évident en théorie, l'est beaucoup moins en pratique en particulier lorsque qu'un très grand nombre d'échantillons est à traiter. Une première étude avec un nombre réduit d'animaux par groupe nous a permis d'ajuster les conditions expérimentales ainsi que le choix des gènes et des organes étudiés mais également de valider notre plateforme. Ainsi, nous avons supprimé de notre étude les testicules dont aucun gène ne variait et l'estomac en raison d'une qualité d'ARN extraits non compatibles avec une étude d'expression génique.

Chapitre IV : Discussion et perspectives

Nous avons augmenté le nombre de gènes horloges et supprimé les gènes codant pour les récepteurs à ad²énosine et histamine qui ne présentaient pas de variation. La deuxième étude, dont les résultats ont été présentés ici, a été réalisée sur un plus grand nombre d'animaux afin d'augmenter la puissance des tests statistiques.

La ddPCR étant une méthode de quantification absolue, l'utilisation de gènes de ménage n'est pas nécessaire. Néanmoins, lors du design de notre étude, nous avons fait le choix d'inclure trois gènes de ménage car nous n'avions pas de certitudes concernant l'importance de l'activité de transcription pendant les différentes phases d'hibernation. Nous avons choisi des gènes fortement exprimés de manière relativement ubiquitaire mais aucun pattern commun dans n'a été observé. De manière plus générale, ces résultats mettent en lumière la difficulté de trouver des gènes de ménage dans ce genre d'étude en particulier quand plusieurs organes et phases sont comparés (Figure 113 : Variation d'expression génique des gènes de ménage dans les huit tissus étudiés selon les différentes phases de l'hibernation du hamster d'Europe.).

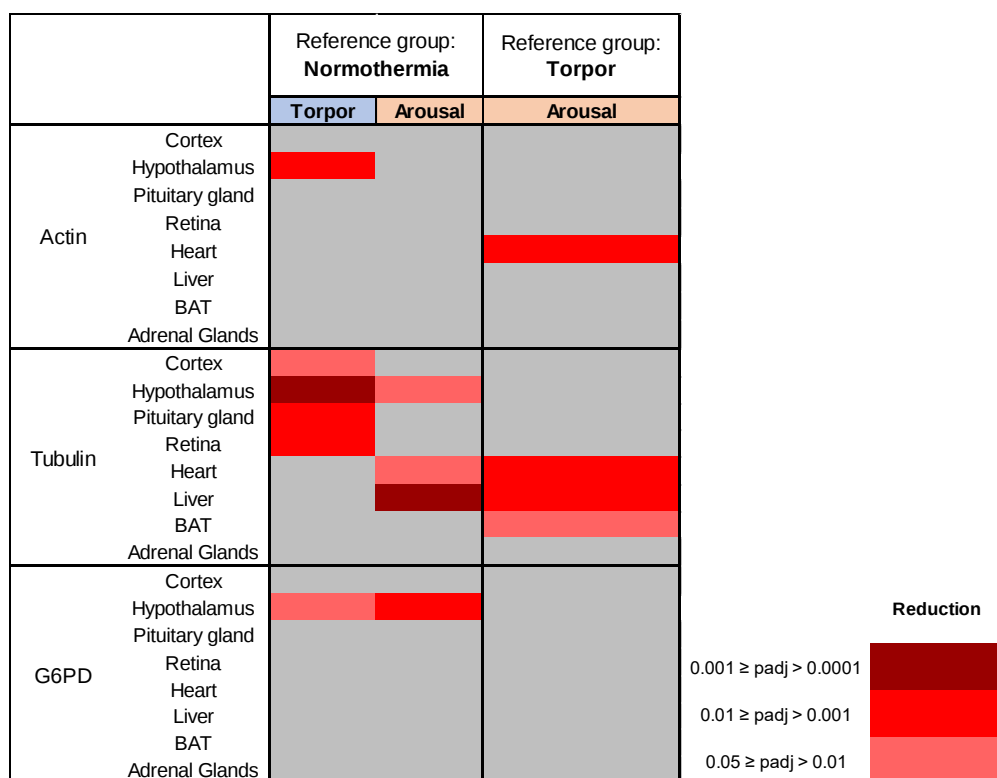


Figure 113 : Variation d'expression génique des gènes de ménage dans les huit tissus étudiés selon les différentes phases de l'hibernation du hamster d'Europe.

La couleur rouge indique une diminution significative (rouge) du taux d'ARNm dans les huit tissus étudiés. L'intensité de la couleur est fonction du niveau de significativité.

L'analyse des résultats de notre étude a été relativement complexe que ce soit au niveau du traitement statistique que de la représentation de ce grand set de données (constitué d'environ 5000 points). Les variations d'expression peuvent être analysées pour chacun des gènes en fonctions des organes, des différentes phases de l'hibernation mais également en fonction des familles de gènes.

L'horloge circadienne est stoppée pendant la phase de torpeur (Revel et al., 2007b). La forte augmentation des transcrits *Per1* et *Per2* pendant le réveil dans l'ensemble des organes semble indiquer un redémarrage de l'horloge pendant la phase de réveil. La régulation des autres gènes de l'horloge est plus limitée et ne concerne que quelques organes, dont l'hypothalamus. Il est difficile d'estimer l'importance de l'horloge circadienne dans le phénomène d'hibernation. En effet, des lésions des NSC chez le hamster sibérien entraînent un dérèglement de la temporalité de la torpeur mais ne la prévient pas (Ruby and Zucker, 1992). Il est à noter que les NSC sont spécifiquement activés au moment de la sortie de torpeur chez l'écureuil (Bratincsák et al., 2007), ce qui est en accord avec notre hypothèse sur la réactivation de l'horloge lors du réveil. Néanmoins ces conclusions sont basées sur l'analyse d'un seul point horaire, donc nous ne pouvons pas exclure que le niveau élevé de transcrits des gènes *Periods* correspond à l'acrophase d'un rythme circadien déjà existant. Il pourrait être intéressant de faire des prélèvements à intervalles de temps réguliers au moment de la sortie d'hibernation et pendant les 24 heures suivantes pour déterminer si et comment la machinerie de l'horloge circadienne se remet en fonctionnement.

L'importance des TH hypothalamiques dans le contrôle des fonctions saisonnières est maintenant clairement établie. Dans cette continuité, notre étude a permis de mettre en évidence une régulation différentielle des déiodinases pendant les différentes phases de l'hibernation conduisant sans doute à une variation locale du taux de T3. La diminution des transcrits de *Dio2* dans l'hypothalamus pendant la torpeur et le réveil suggère une réduction des TH pendant l'hibernation. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'expression de *Dio2* et *Dio3* dans les tanocytes de l'hypothalamus par hybridation *in situ* pendant les phases de torpeur et de réveil. En effet cette régulation des déiodinases est en accord avec l'étude de Bratincsák et al. qui montre une activation spécifique des tanocytes en fin de torpeur/début d'éveil chez l'écureuil. Un dosage du taux de T3 dans le MBH permettrait de confirmer l'hypothèse d'une réduction du taux de TH. Chez le hamster sibérien, des micro-implants hypothalamiques délivrant de la T3 engendrent une diminution du nombre d'accès de torpeur (Murphy et al., 2012). Chez le hamster d'Europe placé en situation hivernale (Ta basse et PC), il serait intéressant d'étudier si des implants hypothalamiques de T3 réduisent ou empêchent l'entrée en hibernation.

Un des résultats majeurs de notre étude est la mise en évidence de régulations spécifiques de chaque organe. Cet aspect avait déjà été discuté par Schwarz et ses collaborateurs dans une étude transcriptomique réalisée sur deux structures centrales, l'hypothalamus et le cortex cérébral du spermophile arctique (Schwartz et al., 2013). Alors que dans l'hypothalamus, les gènes régulés positivement sont impliqués dans les voies de signalisation liées aux dommages, à la prise de nourriture, la satiété, les mécanismes de synchronisation des fonctions saisonnières, et l'utilisation de réserves énergétiques ; dans le cortex cérébral, les variations concernent la plasticité, le remodelage et l'organisation synaptique. Parmi l'ensemble des tissus étudiés chez le hamster d'Europe, l'hypothalamus est la structure dans laquelle nous avons observés le plus grand nombre de gènes présentant des variations d'expression. De manière assez remarquable, la grande majorité des gènes présentait une diminution des transcrits pendant la phase de torpeur. Nos données indiquent que pendant la phase d'hibernation du hamster d'Europe,

l'activité transcriptionnelle de l'hypothalamus est réduite et sans doute conservée seulement pour un nombre très restreint de gènes. Les études de transcriptome ont mis en évidence que le nombre de gènes différentiellement exprimés dans l'hypothalamus était deux fois moins important que dans le BAT (Hampton et al., 2013; Schwartz et al., 2013). Une étude des variations du transcriptome hypothalamique du hamster d'Europe à différentes phases d'hibernation pourrait valider et compléter nos observations. Néanmoins, ce type d'approche reste complexe dans l'hypothalamus entier car c'est un tissu constitué de nombreux noyaux spécifiques qui, comme l'a montré l'étude de Bratincsák et al. ne sont pas activés de la même façon aux différents stades de l'hibernation.

Le BAT, dont le rôle dans la thermogénèse est crucial, présente également un grand nombre de gènes exprimés de manière différentielle selon les phases de l'hibernation. Pendant la phase de réveil où la température augmente très rapide, nous n'avons pas observé d'augmentation drastique du taux d'ARNm d'UCP1 pendant cette phase par rapport à la phase de torpeur. Ce résultat confirme des observations précédentes dans le BAT du spermophile arctique (*Ictidomys tridecemlineatus*) indiquant aucune différence d'expression du gène *ucp1* entre la phase de réveil et de torpeur (Cannon and Nedergaard, 2004; Hampton et al., 2013). Pourtant, ces dernières études ont montré que le gène *ucp1* est plus exprimé pendant les phases de torpeur et de réveil comparé à l'état actif caractéristique de l'été (Cannon and Nedergaard, 2004; Hampton et al., 2013). Il semble donc que la régulation d'UCP1 se fasse en deux temps. La transcription du gène *ucp1* serait fortement augmentée pendant la transition d'activité caractéristique de la PL à la phase d'hibernation en PC conduisant à un taux important d'ARNm, qui serait conservé jusqu'au réveil. Pendant la torpeur, lorsque l'activité de thermogénèse est minimale, il est possible que la synthèse protéique d'UCP1 soit bloquée par un mécanisme traductionnel. Lors du réveil, une levée de l'inhibition de la traduction d'UCP1 engendrerait une importante activité de thermogénèse. Cette régulation très fine pourrait être le fait de micro RNA. En effet, l'implication de micro RNA pendant l'hibernation a déjà été démontré dans de récentes études chez la chauve-souris (*Myotis ricketti*) et le spermophile (*Spermophilus parryi*) (Liu et al., 2010; Yuan et al., 2015; Zheng et al., 2014). Une quantification par Western Blot de la protéine UCP1 dans le BAT à différents stades d'hibernation pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse. Les TH sont connus pour réguler la thermogénèse en favorisant l'expression d'UCP1. Or nous avons mis en évidence que la régulation des déiodinases dans le BAT conduirait à une diminution du taux de T3, en particulier pendant le réveil. Ces résultats semblent cohérents avec une régulation non pas transcriptionnelle mais traductionnelle d'UCP1 lors de la phase d'éveil.

Nous avons voulu vérifier si les variations d'expression génique étaient traduites à l'échelle de l'organisme par des changements des niveaux circulants d'hormones ou de métabolites. De manière surprenante, aucune différence significative entre les trois phases n'a été observée pour aucun(e) des hormones/métabolites étudié(e)s. Afin de confirmer ces résultats, il serait peut-être nécessaire de renouveler les dosages avec un nombre plus importants d'animaux. En effet, une assez grande variabilité entre les individus a été observée. Les résultats obtenus ne sont pas en complète inadéquation avec les résultats obtenus chez le hamster syrien. Bien qu'une

diminution de la glycémie ait été observée pendant la torpeur aucune différence n'a été observée pour la leptine et l'insuline (Weitten et al., 2013).

Nous avons établi une signature moléculaire spécifique de plusieurs organes à chacune des phases de l'hibernation du hamster d'Europe. Pourtant, le taux d'expression protéique ne dépend pas seulement de la synthèse des ARNm mais aussi de la stabilité et du taux de dégradation des ARNm, du niveau de traduction des ARNm en protéines et également du taux de dégradation protéique... Même si de récentes études ont mis en évidence une corrélation importante entre le niveau d'ARNm et celui des protéines (Li and Biggin, 2015), nous ne pouvons exclure que les variations observées au niveau génique ne soient pas toutes traduites à l'échelle protéique et que des régulations post traductionnelles soient primordiales dans contrôle de l'hibernation. Une étude récente réalisée sur des hamsters syriens a mis en évidence le rôle de l'épissage alternatif comme mécanisme de régulation d'un gène impliqué dans l'hibernation. Sano et al. ont montré la coexistence chez des hamsters non hibernants (normothermiques), d'ARNm de la protéine de CIRP (Cold-Inducible RNA-Binding Protein) sous sa forme canonique mais également d'ARNm possédant une conservation intronique entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré. De manière surprenante, aucun ARNm avec cette conservation intronique n'a été retrouvé chez les hamsters hibernants (Figure 114).

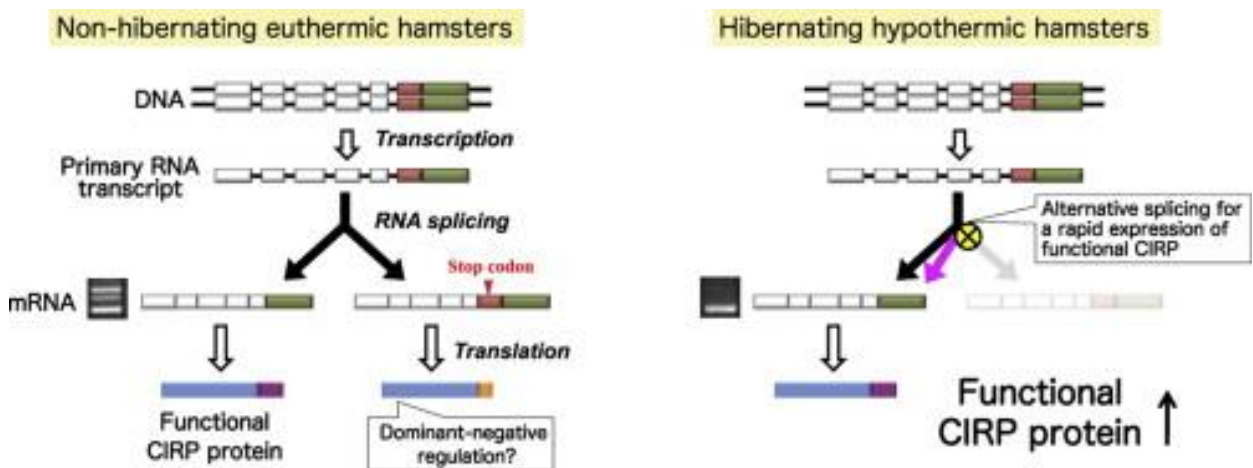


Figure 114 : Représentation schématique de la régulation de la protéine CIRP pendant l'hibernation du hamster syrien (Sano et al., 2015).

La protéine CIRP, induite par le froid, pourrait avoir un rôle de protection dans le cœur des animaux hibernants. Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que l'ARNm codant pour la forme tronquée pourrait jouer le rôle de dominant négatif pendant l'état normothermique. En effet, l'entrée en hibernation étant un phénomène extrêmement rapide, la régulation par épissage alternatif confère un réel avantage en permettant d'augmenter très rapidement le taux de protéine CIRP fonctionnelle dans un organe vital (Sano et al., 2015).

Nous avons voulu reproduire ces expériences chez le hamster d'Europe. Nous avons obtenu les mêmes résultats dans le cœur mais nous avons retrouvé un pattern inverse dans l'hypothalamus. Il semblerait donc que la régulation des différentes formes de la protéine CIRP soit dépendantes des organes. Afin de compléter ces résultats, des PCR ont été réalisés sur des organes centraux

Chapitre IV : Discussion et perspectives

(rétine et hypothalamus) et périphériques (cœur et foie) pendant les phases de torpeur et de normothermie. Ces PCR ont été sous clonées (96 mini prep) et séquencées. L'analyse des différentes formes séquencées est en cours. Ces résultats reflètent bien la complexité des phénomènes de régulation qui ont lieu pendant l'hibernation.

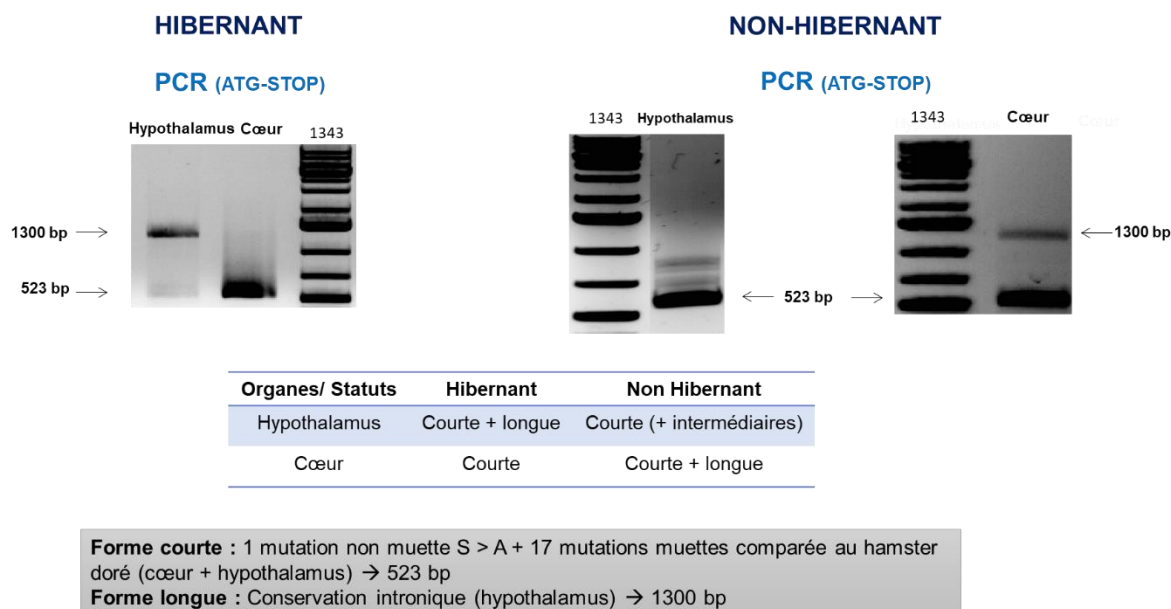


Figure 115 : Expression de l'ARNm de CIRP dans le cœur et l'hypothalamus de hamster hibernant et non hibernant.

L'amplification du gène *CIRP* (ATG – Stop) a été réalisée à l'aide des primers utilisés par Sano et al. chez le hamster syrien. Les produits de PCR ont été analysés sur gel d'électrophorèse. Deux produits de PCR ont été amplifiés et séquencés (forme courte d'une taille de 523 bp et forme longue d'une taille de 1300 bp) dans le cœur des animaux non hibernants. La forme courte correspond à la forme canonique alors qu'une conservation intronique est retrouvée dans la forme longue induisant un codon stop prématuré. De manière surprenante, la régulation de *CIRP* dans l'hypothalamus semble différente. Dans cet organe chez les hamsters non hibernants, la forme courte a été retrouvée en présence de forme intermédiaire (conservation intronique plus courte). Chez les hibernants, les formes courte et longue ont été retrouvées.

L'étude du déroulement de l'hibernation chez des hamsters d'Europe KO conditionnel, générés par la méthode de CRISPR-Cas9 par exemple, pour les gènes dont l'importance a été mise en évidence dans cette étude permettrait de confirmer nos résultats ou au contraire mettre en lumière des mécanismes de redondance génétique.

Les études sur les mécanismes de torpeur impliquent deux types de modèles soient ceux qui expriment des torpeurs journalières, tel que le hamster sibérien, soit ceux qui expriment des phases beaucoup plus longues d'hypothermie, tel que le hamster européen. Les adaptations physiologiques mises en œuvre dans les deux cas sont sans aucun doute différentes. Mener chez le hamster sibérien une étude comparable à celle que nous avons réalisée chez le hamster européen permettrait de mettre en évidence les différences et similitudes de régulations géniques entre ces deux phénomènes.

II. Un rôle des récepteurs à la mélatonine pendant l'hibernation ?

Le rôle de la mélatonine et de ses récepteurs dans l'hibernation n'est pas clairement établi. La mélatonine, grâce à son rôle de messenger photopériodique, permet l'induction du phénotype de PC nécessaire au processus d'hibernation. Une étude datant de la fin des années 198, réalisée sur le spermophile arctique, a mis en évidence qu'une infusion centrale de mélatonine permettait de prolonger la durée de la phase de torpeur (Stanton et al., 1987). Mais, chez le hamster d'Europe hibernant, les variations journalières du taux plasmatique de mélatonine sont abolies à un niveau faible (Revel et al., 2007b). De plus, nos dosages de la mélatonine plasmatique ne montrent pas de variations significatives entre les différentes phases de l'hibernation. Étudier l'expression génique des récepteurs à la mélatonine pendant les différentes phases de l'hibernation permet d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de l'implication de la mélatonine dans ce phénomène.

Le récepteur MT1 est essentiel à la transmission du signal mélatoninergique et par conséquent nous pouvions faire l'hypothèse d'un rôle majeur de ce récepteur dans cette fonction saisonnière (Yasuo et al., 2009). Nous avons mis en évidence que le récepteur MT1 du hamster d'Europe était fonctionnel et avait une affinité pour la mélatonine égale à 127 pM. De manière très surprenante, aucune variation d'expression de ce gène n'a été observée pendant le cycle d'hibernation. Il est quand même intéressant de noter que ce gène est l'un des rares gènes qui n'est pas régulé dans l'hypothalamus pendant la torpeur.

De la même manière, nous n'avons pas observé de variation notable de l'expression du gène *GPR50*. Pourtant, ce récepteur, toujours orphelin, semble jouer un rôle majeur dans le contrôle des fonctions saisonnières. En effet, il est exprimé dans les tanycytes chez de nombreuses espèces à l'exception notable du mouton. Chez le hamster sibérien, son expression est diminuée en PC par rapport à la PL (Barrett et al., 2006). De plus, Bechtold et ses collaborateurs ont montré qu'après quelques heures de jeûne, les souris KO pour *GPR50* présentent des périodes de torpeur à la différence des souris WT (Bechtold et al., 2012). Il est possible que le rôle de *GPR50* dans l'hibernation soit exclusivement local, aussi, il serait intéressant d'étudier par hybridation *in situ*, son expression dans des structures clés de l'hypothalamus pendant la torpeur et le réveil afin d'évaluer le rôle putatif de ce récepteur dans le contrôle de l'hibernation.

De façon intéressante, nous avons mis en évidence des régulations spécifiques de MT2 dans différents organes, notamment l'hypothalamus, la rétine, le foie, le cœur et le BAT pendant les phases de torpeur et d'éveil. Ces observations sont en faveur d'un récepteur MT2 fonctionnel chez le hamster d'Europe et nous ont conduit à cloner la séquence de ce récepteur chez le hamster d'Europe.

L'étude génétique des récepteurs mélatoninergiques a/est toujours entravée par des problèmes techniques dus à la structure de ces récepteurs. La difficulté de clonage des récepteurs à la mélatonine n'est pas cantonnée à ceux des récepteurs du hamster d'Europe et de Sibérie. En effet, pendant longtemps, l'existence du récepteur MT2 ovin était remise en cause jusqu'à être cloné et caractérisé par notre groupe (Cogé et al., 2009). Les difficultés liées au clonage du récepteur MT2 sont multiples. L'exon 1 du gène de ce récepteur possède un important taux de liaison GC, entraînant une grande stabilité de l'ADN et un nombre important

de structures secondaires. De plus, la spécificité de la séquence de cet exon est très faible engendrant un design compliqué des primers. Pour finir, le taux d'expression de ces récepteurs est relativement bas. Ce dernier point a été un facteur limitant dans l'une de nos approches, même en utilisant une structure comme la rétine, connue pour être la plus riche en MT2. En effet, nous avons fait séquencer l'ensemble des transcrits d'un échantillon de rétines de hamster d'Europe en phase de réveil grâce à la technique du PacBio, idéale pour les régions riches en GC car sans amplification préalable (Rhoads and Au, 2015). Malheureusement, la faible expression de ce récepteur nous a empêché d'obtenir des résultats exploitables.

Malgré ces contraintes techniques, nous avons mis en évidence une fonctionnalité probable du récepteur MT2 de hamster d'Europe. En effet, d'un point de vue génique, l'exon 2 ne présente pas de codon stop à la différence de la séquence publiée pour le hamster sibérien (Weaver et al., 1996). Mais nos nombreuses tentatives de clonage de l'exon 1 de ces deux espèces ont révélés l'existence de transcrits aberrants sans méthionine initiatrice ou bien avec des conservations introniques. Ces résultats indiquent un épissage incomplet induisant des conservations intronique dont certaines pourraient conduire à des codons stop prématurés. Nous allons réaliser un séquençage du génome afin de tenter d'obtenir la séquence complète du récepteur MT2. La principale difficulté de ce genre d'approche est l'analyse bio-informatique des données obtenues, en particulier car le génome du hamster d'Europe n'est pas publié, donc il serait a priori difficile de repérer dans cette masse de données la séquence du récepteur MT2. Grâce à notre clonage d'un fragment de son exon 1, nous pourrions identifier cette séquence et donc, la compléter. Dans notre étude, la mise en évidence des formes avec conservations introniques a été faite chez des hamsters non hibernants. Répliquer les mêmes expériences chez des animaux en phase de torpeur et de réveil devrait permettre de vérifier si ces formes sont également exprimées pendant ces deux états.

L'obtention de la séquence complète du récepteur MT2 par séquençage du génome nous permettrait de désigner des sondes de ddPCR spécifiques de l'exon 1. Une sonde désignée sur l'exon 2 permettrait de quantifier l'ensemble des transcrits du récepteur MT2 alors que la sonde de l'exon 1 permettrait de quantifier uniquement la forme complète de MT2. La quantification par ddPCR par multiplexage, du rapport de ces deux formes pendant les différentes phases de l'hibernation permettrait de vérifier s'il existe effectivement une variation d'expression des formes avec conservation intronique. Nous avons tenté de réaliser cette quantification mais il nous a été impossible de designer des sondes de ddPCR avec le fragment d'exon 1 cloné.

Une chimère du récepteur MT2 a été construite à partir des différentes séquences obtenues par clonage et la séquence consensus de plusieurs espèces. Ce récepteur chimérique a été exprimé de manière transitoire dans des cellules COS7. Cette chimère lie la mélatonine, bien que faiblement, mettant en évidence une potentielle fonctionnalité du récepteur MT2 du hamster d'Europe. Lorsque la séquence complète du récepteur MT2 sera obtenue, nous établirons une lignée cellulaire stable exprimant ce récepteur, ce qui nous permettra d'établir la pharmacologie moléculaire de ce récepteur, comme cela a été fait par notre groupe pour les récepteurs à la mélatonine de mouton, rat, souris, homme, dans les meilleures conditions et le cas échéant de confirmer ces résultats.

Pour finir, il serait envisageable que les codons stop prématurés retrouvés dans la séquence du hamster sibérien ne soient en réalité que la conséquence d'une conservation intronique. Il serait intéressant de réaliser une étude similaire d'expression génique avec le hamster sibérien en se focalisant sur les récepteurs à la mélatonine pendant un accès de torpeur. La mise en évidence de variation spécifique du récepteur MT2 permettrait de conforter l'hypothèse d'un rôle particulier de ce récepteur dans les phénomènes d'hibernation et de torpeur.

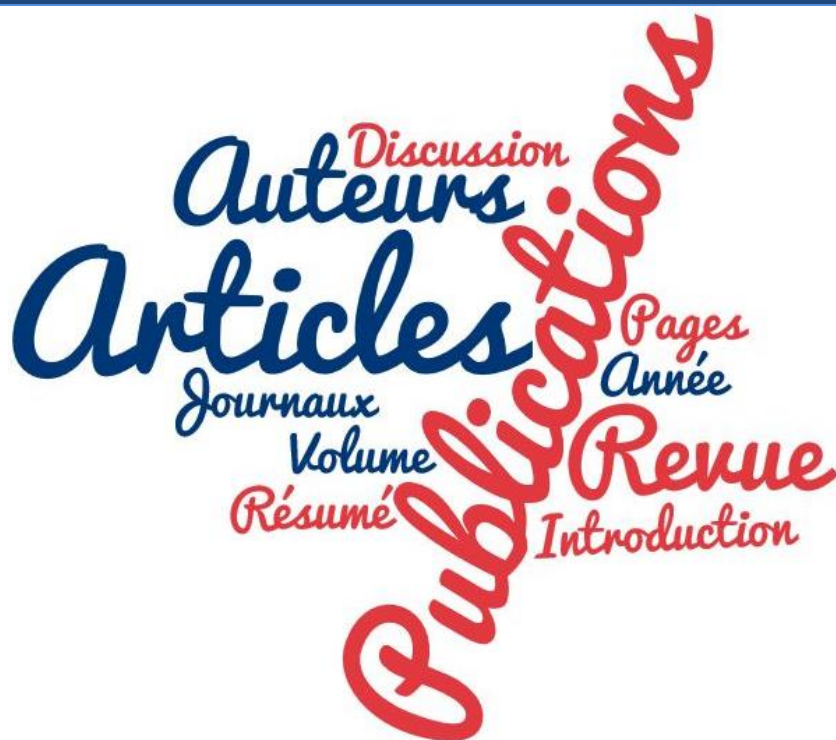
III. Conclusion générale

Pour conclure, mes travaux ont permis de mettre en évidence des régulations spécifiques des familles de gènes clés au cours des différentes phases de l'hibernation. Pendant l'éveil, l'augmentation ubiquitaire des gènes *Periods* indiquent un redémarrage de l'horloge interne dans l'ensemble des organes. La régulation spécifique des déiodinases hypothalamiques pendant la torpeur conduit probablement à une diminution de la disponibilité locale de T3 confirmant son rôle déterminant dans le contrôle des fonctions saisonnières. L'analyse des variations d'expression des récepteurs à la mélatonine montre, de façon surprenante, aucune variation d'expression de MT1, alors qu'une augmentation hypothalamique de MT2 dans le réveil a été observée. Ces résultats sont cohérents avec une possible fonctionnalité du récepteur MT2 chez le hamster d'Europe.

Alors un livre s'est ouvert à la bonne page.
Comme souvent.

Christiane Singer

BIBLIOGRAPHIE



- Abrahamson, E.E., and Moore, R.Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916, 172–191.
- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M.E., Lima-Cabello, E., López, L.C., Rosales-Corral, S., Tan, D.-X., and Reiter, R.J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–29.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H., and Kyriacou, C.P. (2002). Circadian Cycling of the Mouse Liver Transcriptome, as Revealed by cDNA Microarray, Is Driven by the Suprachiasmatic Nucleus. *Curr. Biol.* 12, 540–550.
- Alnouri, M.W., Jepards, S., Casari, A., Schiedel, A.C., Hinz, S., and Müller, C.E. (2015). Selectivity is species-dependent: Characterization of standard agonists and antagonists at human, rat, and mouse adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 11, 389–407.
- Arble, D.M., Bass, J., Laposky, A.D., Vitaterna, M.H., and Turek, F.W. (2009). Circadian Timing of Food Intake Contributes to Weight Gain. *Obes. Silver Spring Md* 17, 2100–2102.
- Arendt, J. (1998). Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod.* 3, 13.
- Arendt, J., and Skene, D.J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med. Rev.* 9, 25–39.
- Audiot, V., Mailliet, F., Lahaye-Brasseur, C., Bonnaud, A., Gall, A.L., Amossé, C., Dromaint, S., Rodriguez, M., Nagel, N., Galizzi, J.-P., et al. (2003). New selective ligands of human cloned melatonin MT1 and MT2 receptors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 367, 553–561.
- Audiot, V., Bonnaud, A., Grandcolas, L., Rodriguez, M., Nagel, N., Galizzi, J.-P., Balik, A., Messenger, S., Hazlerigg, D.G., Barrett, P., et al. (2008). Molecular cloning and pharmacological characterization of rat melatonin MT1 and MT2 receptors. *Biochem. Pharmacol.* 75, 2007–2019.
- Ayoub, M.A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., and Jockers, R. (2002). Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *J. Biol. Chem.* 277, 21522–21528.
- Ayoub, M.A., Levoye, A., Delagrange, P., and Jockers, R. (2004). Preferential Formation of MT1/MT2 Melatonin Receptor Heterodimers with Distinct Ligand Interaction Properties Compared with MT2 Homodimers. *Mol. Pharmacol.* 66, 312–321.
- Baba, K., Pozdeyev, N., Mazzoni, F., Contreras-Alcantara, S., Liu, C., Kasamatsu, M., Martinez-Merlos, T., Strettoi, E., Iuvone, P.M., and Tosini, G. (2009). Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15043–15048.
- Baba, K., Benleulmi-Chaachoua, A., Journé, A.-S., Kamal, M., Guillaume, J.-L., Dussaud, S., Gbahou, F., Yettou, K., Liu, C., Contreras-Alcantara, S., et al. (2013). Heteromeric MT1/MT2 Melatonin Receptors Modulate Photoreceptor Function. *Sci. Signal.* 6.

Bibliographie

- Badman, M.K., Pissios, P., Kennedy, A.R., Koukos, G., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR α and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metab.* 5, 426–437.
- Baldwin, J.M. (1993). The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 12, 1693–1703.
- Bank, J.H.H., Kemmling, J., Rijntjes, E., Wirth, E.K., and Herwig, A. (2015a). Thyroid hormone status affects expression of daily torpor and gene transcription in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Horm. Behav.* 75, 120–129.
- Bank, J.H.H., Kemmling, J., Rijntjes, E., Wirth, E.K., and Herwig, A. (2015b). Thyroid hormone status affects expression of daily torpor and gene transcription in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Horm. Behav.* 75, 120–129.
- Bank, J.H.H., Cubuk, C., Wilson, D., Rijntjes, E., Kemmling, J., Markovsky, H., Barrett, P., and Herwig, A. (2017). Gene expression analysis and microdialysis suggest hypothalamic triiodothyronine (T3) gates daily torpor in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Comp. Physiol. B* 187, 857–868.
- Barré, H., Chatonnet, J., Le Maho, Y., and Valatx Jean-Louis (2001). Physiologie énergétique.
- Barrett, P., and Bolborea, M. (2012). Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J. Pineal Res.* 52, 376–388.
- Barrett, P., Conway, S., and Morgan, P.J. (2003). Digging deep - structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J. Pineal Res.* 35, 221–230.
- Barrett, P., Ivanova, E., Graham, E.S., Ross, A.W., Wilson, D., Plé, H., Mercer, J.G., Ebling, F.J., Schuhler, S., Dupré, S.M., et al. (2006). Photoperiodic regulation of cellular retinoic acid-binding protein 1, GPR50 and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J. Endocrinol.* 191, 687–698.
- Barrett, P., Ebling, F.J.P., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A.W., Warner, A., Jethwa, P., Boelen, A., Visser, T.J., Ozanne, D.M., et al. (2007a). Hypothalamic Thyroid Hormone Catabolism Acts as a Gatekeeper for the Seasonal Control of Body Weight and Reproduction. *Endocrinology* 148, 3608–3617.
- Barrett, P., Ebling, F.J.P., Schuhler, S., Wilson, D., Ross, A.W., Warner, A., Jethwa, P., Boelen, A., Visser, T.J., Ozanne, D.M., et al. (2007b). Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148, 3608–3617.
- Bartness, T.J., and Wade, G.N. (1984). Photoperiodic Control of Body Weight and Energy Metabolism in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*): Role of Pineal Gland, Melatonin, Gonads, and Diet. *Endocrinology* 114, 492–498.
- Bartness, T.J., Goldman, B.D., and Bittman, E.L. (1991). SCN lesions block responses to systemic melatonin infusions in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* 260, R102–112.
- Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., and Goldman, B.D. (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin

signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J. Pineal Res.* 15, 161–190.

Baskin, D.G., Breininger, J.F., and Schwartz, M.W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48, 828–833.

Bass, J., and Takahashi, J.S. (2010). Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science* 330, 1349–1354.

Batailler, M., Mullier, A., Sidibe, A., Delagrangé, P., Prévot, V., Jockers, R., and Migaud, M. (2012). Neuroanatomical distribution of the orphan GPR50 receptor in adult sheep and rodent brains. *J. Neuroendocrinol.* 24, 798–808.

Bechtold, D.A., and Loudon, A. (2007). Hypothalamic thyroid hormones: mediators of seasonal physiology. *Endocrinology* 148, 3605–3607.

Bechtold, D.A., Sidibe, A., Saer, B.R.C., Li, J., Hand, L.E., Ivanova, E.A., Darras, V.M., Dam, J., Jockers, R., Luckman, S.M., et al. (2012). A role for the melatonin-related receptor GPR5050 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Curr. Biol.* 22, 70–77.

Becker-André, M., Wiesenberger, I., Schaeren-Wiemers, N., André, E., Missbach, M., Saurat, J.H., and Carlberg, C. (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 269, 28531–28534.

Belden, W.J., and Dunlap, J.C. (2008). SIRT1 Is a Circadian Deacetylase for Core Clock Components. *Cell* 134, 212–214.

Benoit, J. (1936). Role de la thyroïde dans la gonado-stimulation par lumière artificielle chez le canard domestique. *C R. Soc. Biol. Paris*, 123, 243–246.

Bhattacharyya, S., Luan, J., Challis, B., Keogh, J., Montague, C., Brennand, J., Morten, J., Lowenbeim, S., Jenkins, S., Farooqi, I.S., et al. (2006). Sequence variants in the melatonin-related receptor gene (GPR50) associate with circulating triglyceride and HDL levels. *J. Lipid Res.* 47, 761–766.

Bianco, A., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., and Larsen, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.

Biorad Droplet Digital PCR - Applications Guide.

Bitting, L., Sutin, E.L., Watson, F.L., Leard, L.E., O'Hara, B.F., Heller, H.C., and Kilduff, T.S. (1994). C-fos mRNA increases in the ground squirrel suprachiasmatic nucleus during arousal from hibernation. *Neurosci. Lett.* 165, 117–121.

Blouet, C., and Schwartz, G.J. (2011). Nutrient-sensing hypothalamic TXNIP links nutrient excess to energy imbalance in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 6019–6027.

Blouet, C., Liu, S.-M., Jo, Y.-H., Chua, S., and Schwartz, G.J. (2012). TXNIP in AgRP Neurons Regulates Adiposity, Energy Expenditure, and Central Leptin Sensitivity. *J. Neurosci.* 32, 9870–9877.

- Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–1729.
- Bockmann, J., Böckers, T.M., Winter, C., Wittkowski, W., Winterhoff, H., Deufel, T., and Kreutz, M.R. (1997). Thyrotropin Expression in Hypophyseal Pars Tuberalis-Specific Cells is 3,5,3'-Triiodothyronine, Thyrotropin-Releasing Hormone, and Pit-1 Independent. *Endocrinology* 138, 1019–1028.
- de Bodinat, C., Guardiola-Lemaitre, B., Mocaër, E., Renard, P., Muñoz, C., and Millan, M.J. (2010). Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 628–642.
- Boissin, J., and Canguilhem, B. (1988). [Circannual rhythms in mammals]. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 96, A289-345.
- Bouma, H.R., Verhaag, E.M., Otis, J.P., Heldmaier, G., Swoap, S.J., Strijkstra, A.M., Henning, R.H., and Carey, H.V. (2012). Induction of torpor: mimicking natural metabolic suppression for biomedical applications. *J. Cell. Physiol.* 227, 1285–1290.
- Boutin, J.A. (2007). Le récepteur MT₃ : où en sommes-nous ? *J. Société Biol.* 201, 97–103.
- Boutin, J.A. (2015). Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. *Expert Opin. Ther. Targets.*
- Boutin, J.A., Audinot, V., Ferry, G., and Delagrange, P. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 412–419.
- Boutin, J.A., Bonnaud, A., Brasseur, C., Bruno, O., Lepretre, N., Oosting, P., Coumailleau, S., Delagrange, P., Nosjean, O., and Legros, C. (2017). New MT₂ Melatonin Receptor-Selective Ligands: Agonists and Partial Agonists. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Bratincsák, A., McMullen, D., Miyake, S., Tóth, Z.E., Hallenbeck, J.M., and Palkovits, M. (2007). Spatial and temporal activation of brain regions in hibernation: c-fos expression during the hibernation bout in thirteen-lined ground squirrel. *J. Comp. Neurol.* 505, 443–458.
- Brondani, L. de A., Assmann, T.S., Duarte, G.C.K., Gross, J.L., Canani, L.H., and Crispim, D. (2012). The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq. Bras. Endocrinol. Amp Metabol.* 56, 215–225.
- Browning, C., Beresford, I., Fraser, N., and Giles, H. (2000). Pharmacological characterization of human recombinant melatonin mt1 and MT2 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129, 877–886.
- Buck, C.L., and Barnes, B.M. (2000). Effects of ambient temperature on metabolic rate, respiratory quotient, and torpor in an arctic hibernator. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R255–R262.
- Buoli, M., Grassi, S., Serati, M., and Altamura, A.C. (2017). Agomelatine for the treatment of generalized anxiety disorder. *Expert Opin. Pharmacother.*
- Cahill, G.F. (2006). Fuel metabolism in starvation. *Annu. Rev. Nutr.* 26, 1–22.

- Canaple, L., Rambaud, J., Dkhissi-Benyahya, O., Rayet, B., Tan, N.S., Michalik, L., Delaunay, F., Wahli, W., and Laudet, V. (2006). Reciprocal Regulation of Brain and Muscle Arnt-Like Protein 1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Defines a Novel Positive Feedback Loop in the Rodent Liver Circadian Clock. *Mol. Endocrinol.* 20, 1715–1727.
- Canguilhem, B., and Marx, C. (1973). Regulation of the body weight of the European Hamster during the annual cycle. *Pflugers Arch.* 338, 169–175.
- Canguilhem, B., and Petrovic, A. (1974). [Effects of photoperiod and ambient temperature on circannual rhythms of body weight and adrenal cortex activity in European hamster (*Cricetus cricetus*)]. *Arch. Sci. Physiol. (Paris)* 28, 113–126.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.
- Carey, H.V., Andrews, M.T., and Martin, S.L. (2003). Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature. *Physiol. Rev.* 83, 1153–1181.
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., García-Mauriño, S., Reiter, R.J., and Guerrero, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.*
- Carrillo-Vico, A., Guerrero, J.M., Lardone, P.J., and Reiter, R.J. (2005). A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* 27, 189–200.
- Castel, M., Belenky, M., Cohen, S., Ottersen, O.P., and Storm-Mathisen, J. (1993). Glutamate-like Immunoreactivity in Retinal Terminals of the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 5, 368–381.
- Cecon, E., Oishi, A., and Jockers, R. (2017). Melatonin receptors: molecular pharmacology and signaling in the context of system bias. *Br. J. Pharmacol.* n/a-n/a.
- Ceinos, R.M., Chansard, M., Revel, F., Calgari, C., Míguez, J.M., and Simonneaux, V. (2004). Analysis of Adrenergic Regulation of Melatonin Synthesis in Siberian Hamster Pineal Emphasizes the Role of HIOMT. *Neurosignals* 13, 308–317.
- Challamel, M.-J., Clarisse, R., Lévi, F., Laumon, B., Testu, F., Touitou, Y., and others (2001). Rythmes de l'enfant: de l'horloge biologique aux rythmes scolaires.
- Challet, E. (2009). Horloges circadiennes, troubles métaboliques et chronobésité. *Obésité* 4, 73.
- Challet, E. (2013). Chapter Five - Circadian Clocks, Food Intake, and Metabolism. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Martha U. Gillette, ed. (Academic Press), pp. 105–135.
- Challet, E., and Pévet, P. (2003). Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 8, s246-257.
- Chen, L., and Yang, G. (2014). PPARs Integrate the Mammalian Clock and Energy Metabolism. *PPAR Res.* 2014, 653017.

Bibliographie

- Chen, J., Liu, C., and Lovenberg, T.W. (2003). Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H3 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 467, 57–65.
- Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M., and Zhou, Q.-Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405–410.
- Cheung, P.W., and McCormack, C.E. (1982). Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 242, R261–R264.
- Chutkow, W.A., Patwari, P., Yoshioka, J., and Lee, R.T. (2008). Thioredoxin-interacting Protein (Txnip) Is a Critical Regulator of Hepatic Glucose Production. *J. Biol. Chem.* 283, 2397–2406.
- Cipolla-Neto, J., Amaral, F.G., Afeche, S.C., Tan, D.X., and Reiter, R.J. (2014). Melatonin, Energy Metabolism and Obesity: a Review. *J. Pineal Res.* n/a-n/a.
- Cogé, F., Guenin, S., Fery, I., Migaud, M., Devavry, S., Slugocki, C., Legros, C., Ouvry, C., Cohen, W., Renault, N., et al. (2009). The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT2 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 158, 1248–1262.
- Concannon, P., Levac, K., Rawson, R., Tennant, B., and Bensadoun, A. (2001). Seasonal changes in serum leptin, food intake, and body weight in photoentrained woodchucks. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R951–R959.
- Coomans, C.P., Ramkisoensing, A., and Meijer, J.H. (2015). The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front. Neuroendocrinol.* 37, 29–42.
- Cubuk, C., Kemmling, J., Fabrizius, A., and Herwig, A. (2017a). Transcriptome Analysis of Hypothalamic Gene Expression during Daily Torpor in Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Front. Neurosci.* 11.
- Cubuk, C., Markowsky, H., and Herwig, A. (2017b). Hypothalamic control systems show differential gene expression during spontaneous daily torpor and fasting-induced torpor in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *PLoS ONE* 12.
- Dardente, H., and Cermakian, N. (2005). Les noyaux suprachiasmatiques : une horloge circadienne composée. *Médecine/Sciences* 21, 66–72.
- Dardente, H., Klosen, P., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2003). MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* 15, 778–786.
- Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupré, S.M., Loudon, A.S.I., Lincoln, G.A., and Hazlerigg, D.G. (2010). A Molecular Switch for Photoperiod Responsiveness in Mammals. *Curr. Biol.* 20, 2193–2198.
- Dardente, H., Hazlerigg, D.G., and Ebling, F.J. (2014). Thyroid hormone and seasonal rhythmicity. *Thyroid Endocrinol.* 5, 19.

- Darrow, J.M., Tamarkin, L., Duncan, M.J., and Goldman, B.D. (1986). Pineal melatonin rhythms in female Turkish hamsters: effects of photoperiod and hibernation. *Biol. Reprod.* 35, 74–83.
- Dave, K.R., Christian, S.L., Perez-Pinzon, M.A., and Drew, K.L. (2012). Neuroprotection: Lessons from hibernators. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 162, 1–9.
- Dawson, D., and Encel, N. (1993). Melatonin and sleep in humans. *J. Pineal Res.* 15, 1–12.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr. Rev.* 20, 649–688.
- Deupi, X., and Kobilka, B. (2007). Activation of G Protein–Coupled Receptors. *Adv. Protein Chem.* 74, 137–166.
- Devavry, S., Legros, C., Brasseur, C., Cohen, W., Guenin, S.-P., Delagrangé, P., Malpoux, B., Ouvre, C., Cogé, F., Nosjean, O., et al. (2012). Molecular pharmacology of the mouse melatonin receptors MT1 and MT2. *Eur. J. Pharmacol.* 677, 15–21.
- Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 517–549.
- Djeridane, Y., Vivien-Roels, B., Simonneaux, V., Miguez, J.M., and Pévet, P. (1998). Evidence for melatonin synthesis in rodent Harderian gland: a dynamic in vitro study. *J. Pineal Res.* 25, 54–64.
- Doherty, A.H., Florant, G.L., and Donahue, S.W. (2014). Endocrine regulation of bone and energy metabolism in hibernating mammals. *Integr. Comp. Biol.* 54, 463–483.
- Doi, M., Hirayama, J., and Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 125, 497–508.
- Doolen, S., Krause, D.N., Dubocovich, M.L., and Duckles, S.P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 345, 67–69.
- Drew, K.L., Buck, C.L., Barnes, B.M., Christian, S.L., Rasley, B.T., and Harris, M.B. (2007). Central nervous system regulation of mammalian hibernation: implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. *J. Neurochem.* 102, 1713–1726.
- Dubocovich, M.L., Masana, M.I., Iacob, S., and Sauri, D.M. (1997). Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 355, 365–375.
- Dubocovich, M.L., Yun, K., Al-Ghoul, W.M., Benloucif, S., and Masana, M.I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 1211–1220.
- Dubocovich, M.L., Delagrangé, P., Krause, D.N., Sugden, D., Cardinali, D.P., and Olcese, J. (2010). International union of basic and clinical pharmacology. IXXV. nomenclature,

classification, and pharmacology of g protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol. Rev.* 62, 343–380.

Duez, H., Sebti, Y., and Staels, B. (2013). [Circadian rhythmicity and metabolism: integration of metabolic and environmental signals]. *Médecine Sci.* MS 29, 772–777.

Dufourny, L., Levasseur, A., Migaud, M., Callebaut, I., Pontarotti, P., Malpoux, B., and Monget, P. (2008). GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: Evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol. Biol.* 8, 105.

Duncan, M.J., and Goldman, B.D. (1984a). Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. I. Role of the gonads and pituitary. *J. Exp. Zool.* 230, 89–95.

Duncan, M.J., and Goldman, B.D. (1984b). Hormonal regulation of the annual pelage color cycle in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. II. Role of prolactin. *J. Exp. Zool.* 230, 97–103.

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

Ebling, F.J.P. (2014). On the value of seasonal mammals for identifying mechanisms underlying the control of food intake and body weight. *Horm. Behav.* 66, 56–65.

Everett, L.J., and Lazar, M.A. (2014). Nuclear Receptor Rev-erb α : Up, Down, and All Around. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 25, 586–592.

Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S.E., Alenghat, T., Liu, X.S., and Lazar, M.A. (2011). A Circadian Rhythm Orchestrated By Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science* 331, 1315–1319.

Fenyk-Melody, J. (2012). Chapter 36 - The European Hamster. In *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, (Boston: Academic Press), pp. 923–933.

Ferracioli-Oda, E. (2013). Meta-analysis: melatonin for the treatment of primary sleep disorders. 8.

Ferry, G., Loynel, A., Kucharczyk, N., Bertin, S., Rodriguez, M., Delagrangé, P., Galizzi, J.-P., Jacoby, E., Volland, J.-P., Lesieur, D., et al. (2000). Substrate Specificity and Inhibition Studies of Human Serotonin N-Acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 275, 8794–8805.

Fields, T.A., and Casey, P.J. (1997). Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem. J.* 321, 561–571.

Florant, G.L., and Heller, H.C. (1977). CNS regulation of body temperature in euthermic and hibernating marmots (*Marmota flaviventris*). *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 232, R203–R208.

Florant, G.L., Turner, B.M., and Heller, H.C. (1978). Temperature regulation during wakefulness, sleep, and hibernation in marmots. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 235, R82–R88.

- Florant, G.L., Rivera, M.L., Lawrence, A.K., and Tamarkin, L. (1984). Plasma melatonin concentrations in hibernating marmots: absence of a plasma melatonin rhythm. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 247, R1062–R1066.
- Florant, G.L., Porst, H., Peiffer, A., Hudachek, S.F., Pittman, C., A.Summers, S., Rajala, M.W., and Scherer, P.E. (2004). Fat-cell mass, serum leptin and adiponectin changes during weight gain and loss in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *J. Comp. Physiol. B* 174, 633–639.
- Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L., and Viollet, B. (2006). Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK - Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques. *médecine/sciences* 22, 381–388.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272.
- Freeman, D.A., Lewis, D.A., Kauffman, A.S., Blum, R.M., and Dark, J. (2004). Reduced leptin concentrations are permissive for display of torpor in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R97–R103.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763–770.
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K.P., and Ernst, O.P. (2003). Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2290–2295.
- Fujieda, H., Hamadanizadeh, S.A., Wankiewicz, E., Pang, S.F., and Brown, G.M. (1999). Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* 93, 793–799.
- Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S.A., Ripperger, J., and Schibler, U. (2004). The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 113, 103–112.
- Ganguly, S., Coon, S.L., and Klein, D.C. (2002). Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. *Cell Tissue Res.* 309, 127–137.
- Garidou, M.-L., Vivien-Roels, B., Pévet, P., Miguez, J., and Simonneaux, V. (2003). Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R1043–R1052.
- Gastel, J.A., Roseboom, P.H., Rinaldi, P.A., Weller, J.L., and Klein, D.C. (1998). Melatonin Production: Proteasomal Proteolysis in Serotonin N-Acetyltransferase Regulation. *Science* 279, 1358–1360.
- Gauer, F., Masson-Pévet, M., and Pévet, P. (1993a). Melatonin receptor density is regulated in rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei by melatonin itself. *Brain Res.* 602, 153–156.

Bibliographie

Gauer, F., Masson-Pévet, M., Stehle, J., and Pévet, P. (1993b). Daily variations in melatonin receptor density of rat pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei are distinctly regulated. *Brain Res.* 641, 92–98.

Gauer, F., Masson-Pévet, M., Saboureaux, M., George, D., and Pévet, P. (1993c). Differential seasonal regulation of melatonin receptor density in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nuclei: a study in the hedgehog (*Erinaceus europaeus*, L.). *J. Neuroendocrinol.* 5, 685–690.

Gautier, C., Bothorel, B., Ciocca, D., Valour, D., Gaudeau, A., Dupré, C., Lizzo, G., Brasseur, C., Riest-Fery, I., Stephan, J.-P., et al. (2018a). Gene expression profiling during European hamster's hibernation. *In press*.

Gautier, C., Guenin, S.-P., Riest-Fery, I., Perry, T.J., Legros, C., Nosjean, O., Simonneaux, V., Grützner, F., and Boutin, J.A. (2018b). Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). *PLoS ONE* *In press*.

Geiser, F. (2004). Metabolic Rate and Body Temperature Reduction During Hibernation and Daily Torpor. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 239–274.

Geiser, F. (2011a). Hibernation: Endotherms. ELS.

Geiser, F. (2011b). Hibernation: Endotherms. ELS John Wiley Sons.

Geiser, F., and Turbill, C. (2009). Hibernation and daily torpor minimize mammalian extinctions. *Naturwissenschaften* 96, 1235–1240.

genomics.agilent.com RNA Integrity Number (RIN).

Gerdin, M.J., Masana, M.I., Rivera-Bermúdez, M.A., Hudson, R.L., Earnest, D.J., Gillette, M.U., and Dubocovich, M.L. (2004). Melatonin desensitizes endogenous MT2 melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nucleus: relevance for defining the periods of sensitivity of the mammalian circadian clock to melatonin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1646–1656.

Gether, U. (2000). Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90–113.

Gibbs, F.P., and Vriend, J. (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* 109, 1796–1798.

Glaser, S., Han, Y., Francis, H., and Alpini, G. (2014). Melatonin regulation of biliary functions. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 3, 35–43.

Goldman, B.D. (2001). Mammalian Photoperiodic System: Formal Properties and Neuroendocrine Mechanisms of Photoperiodic Time Measurement. *J. Biol. Rhythms* 16, 283–301.

Grabek, K.R., Martin, S.L., and Hindle, A.G. (2015). Proteomics approaches shed new light on hibernation physiology. *J. Comp. Physiol. B* 185, 607–627.

- Grosbellet, E., Zahn, S., Arrivé, M., Dumont, S., Gourmelen, S., Pévet, P., Challet, E., and Criscuolo, F. (2015). Circadian desynchronization triggers premature cellular aging in a diurnal rodent. *FASEB J.* 29, 4794–4803.
- Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M.J., Germain, D.L.S., and Bernal, J. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10391–10396.
- Gubitza, A.K., and Reppert, S.M. (1999). Assignment of the melatonin-related receptor to human chromosome X (GPR50) and mouse chromosome X (Gpr50). *Genomics* 55, 248–251.
- Guilding, C., and Piggins, H.D. (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J. Neurosci.* 25, 3195–3216.
- Gwinner, E., and Helm, B. (2003). Circannual and Circadian Contributions to the Timing of Avian Migration. In *Avian Migration*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 81–95.
- Hamouda, H.O., Chen, P., Levoe, A., Sözer-Topçular, N., Daulat, A.M., Guillaume, J.-L., Ravid, R., Savaskan, E., Ferry, G., Boutin, J.A., et al. (2007). Detection of the human GPR50 orphan seven transmembrane protein by polyclonal antibodies mapping different epitopes. *J. Pineal Res.* 43, 10–15.
- Hampton, M., and Andrews, M.T. (2007). A simple molecular mathematical model of mammalian hibernation. *J. Theor. Biol.* 247, 297–302.
- Hampton, M., Melvin, R.G., and Andrews, M.T. (2013). Transcriptomic Analysis of Brown Adipose Tissue across the Physiological Extremes of Natural Hibernation. *PLoS ONE* 8.
- Hand, L.E., Saer, B.R.C., Hui, S.T., Jinnah, H.A., Steinlechner, S., Loudon, A.S.I., and Bechtold, D.A. (2013). Induction of the metabolic regulator txnip in fasting-induced and natural torpor. *Endocrinology* 154, 2081–2091.
- Hanlon, C.D., and Andrew, D.J. (2015). Outside-in signaling – a brief review of GPCR signaling with a focus on the *Drosophila* GPCR family. *J. Cell Sci.* 128, 3533.
- Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res.* 309, 73–88.
- Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Gillette, M.U., and Mikkelsen, J.D. (1997). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) in the Retinohypothalamic Tract: A Potential Daytime Regulator of the Biological Clock. *J. Neurosci.* 17, 2637–2644.
- Hannibal, J., Hindersson, P., Knudsen, S.M., Georg, B., and Fahrenkrug, J. (2002). The Photopigment Melanopsin Is Exclusively Present in Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-Containing Retinal Ganglion Cells of the Retinohypothalamic Tract. *J. Neurosci.* 22, RC191-RC191.
- Hanon, E.A., Lincoln, G.A., Fustin, J.-M., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P.J., and Hazlerigg, D.G. (2008). Ancestral TSH Mechanism Signals Summer in a Photoperiodic Mammal. *Curr. Biol.* 18, 1147–1152.

- Hanon, E.A., Routledge, K., Dardente, H., Masson-Pévet, M., Morgan, P.J., and Hazlerigg, D.G. (2010). Effect of photoperiod on the thyroid-stimulating hormone neuroendocrine system in the european hamster (*Cricetus cricetus*). *J. Neuroendocrinol.* 22, 51–55.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774–785.
- Hayashida, S., Arimoto, A., Kuramoto, Y., Kozako, T., Honda, S., Shimeno, H., and Soeda, S. (2010). Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 339, 285–292.
- Hazlerigg, D., and Simonneaux, V. (2015a). Chapter 34. Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set, pp. 1575–1604.
- Hazlerigg, D.G., and Simonneaux, V. (2015b). Seasonal regulation of reproduction in mammals. *Plant TM Zeleznik AJ Ed. Ed. Physiol. Reprod.* 1575–604.
- Hazlerigg, D.G., Gonzalez-Brito, A., Lawson, W., Hastings, M.H., and Morgan, P.J. (1993). Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 132, 285–292.
- Heldmaier, G., Steinlechner, S., Rafael, J., and Vsiansky, P. (1981). Photoperiodic control and effects of melatonin on nonshivering thermogenesis and brown adipose tissue. *Science* 212, 917–919.
- Heldmaier, G., Ortmann, S., and Körtner, G. (1993). Energy requirements of hibernating alpine marmots. *Life Cold Ecol. Physiol. Mol. Mech.* 175–183.
- Heldmaier, G., Ortmann, S., and Elvert, R. (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 317–329.
- Heller, H.C., and Ruby, N.F. (2004). Sleep and Circadian Rhythms in Mammalian Torpor. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 275–289.
- Heller, H.C., Colliver, G.W., and Bread, J. (1977). Thermoregulation during entrance into hibernation. *Pflugers Arch.* 369, 55–59.
- Hermes, M.L., Buijs, R.M., Masson-Pévet, M., Woude, T.P. van der, Pévet, P., Brenklé, R., and Kirsch, R. (1989). Central vasopressin infusion prevents hibernation in the European hamster (*Cricetus cricetus*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6408–6411.
- Hermes, M.L., Kalsbeek, A., Kirsch, R., Buijs, R.M., and Pévet, P. (1993). Induction of arousal in hibernating European hamsters (*Cricetus cricetus* L.) by vasopressin infusion in the lateral septum. *Brain Res.* 631, 313–316.
- Herwig, A., Wilson, D., Logie, T.J., Boelen, A., Morgan, P.J., Mercer, J.G., and Barrett, P. (2009). Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1307–R1315.

Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179–183.

van den Heuvel, C.J., Ferguson, S.A., Mila Macchi, M., and Dawson, D. (2005). Comment on ‘Melatonin as a hypnotic: Pro.’ *Sleep Med. Rev.* 9, 67–68.

Hindle, A.G., Grabek, K.R., Epperson, L.E., Karimpour-Fard, A., and Martin, S.L. (2014). Metabolic changes associated with the long winter fast dominate the liver proteome in 13-lined ground squirrels. *Physiol. Genomics* 46, 348–361.

Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* 83, 8604.

Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., and Sassone-Corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450, 1086–1090.

Hoffman, R.A., and Reiter, R.J. (1965). Pineal Gland: Influence on Gonads of Male Hamsters. *Science* 148, 1609–1611.

Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., and Honma, K. (2002). *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419, 841.

Hopkins, A.L., and Groom, C.R. (2002). The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 727–730.

Humphries, M.M., Thomas, D.W., and Kramer, D.L. (2001). Torpor and Digestion in Food-Storing Hibernators. *Physiol. Biochem. Zool.* 74, 283–292.

Ikeno, T., Williams, C.T., Buck, C.L., Barnes, B.M., and Yan, L. (2017). Clock Gene Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Hibernating Arctic Ground Squirrels. *J. Biol. Rhythms*.

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

Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., et al. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metab.* 5, 415–425.

Isobe, Y., Torii, T., and Nishino, H. (2001). Melatonin inhibits Arg-vasopressin release via MT2 receptor in the suprachiasmatic nucleus-slice culture of rats. *Brain Res.* 889, 214–219.

IUPHAR IUPHAR.

Ivakine, E.A., and Cohn, R.D. (2014). Maintaining skeletal muscle mass: lessons learned from hibernation. *Exp. Physiol.* 99, 632–637.

Bibliographie

- Ivanova, E.A., Bechtold, D.A., Dupré, S.M., Brennand, J., Barrett, P., Luckman, S.M., and Loudon, A.S.I. (2008). Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 294, E176–E182.
- Jan, J.E., Reiter, R.J., Wong, P.K.H., Bax, M.C.O., Ribary, U., and Wasdell, M.B. (2011). Melatonin has membrane receptor-independent hypnotic action on neurons: an hypothesis. *J. Pineal Res.* 50, 233–240.
- Jastroch, M., Giroud, S., Barrett, P., Geiser, F., Heldmaier, G., and Herwig, A. (2016). Seasonal Control of Mammalian Energy Balance: Recent Advances in the Understanding of Daily Torpor and Hibernation. *J. Neuroendocrinol.* 28, n/a-n/a.
- de Jesus, L.A., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.-W., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Bianco, A.C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 108, 1379–1385.
- Jiang, Z.G., Nelson, C.S., and Allen, C.N. (1995). Melatonin activates an outward current and inhibits I_h in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* 687, 125–132.
- Jockers, R., Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Barrett, P., Morgan, P.J., Guardiola, B., Delagrange, P., Marullo, S., and Strosberg, A.D. (1997). Novel isoforms of Mel1c melatonin receptors modulating intracellular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate levels. *Mol. Endocrinol.* 11, 1070–1081.
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J.A., and Delagrange, P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br. J. Pharmacol.* 154, 1182–1195.
- Jockers, R., Delagrange, P., Dubocovich, M.L., Markus, R.P., Renault, N., Tosini, G., Cecon, E., and Zlotos, D.P. (2016). Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2702–2725.
- Johnson, R.F., Moore, R.Y., and Morin, L.P. (1988). Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Res.* 460, 297–313.
- Kalsbeek, A., and Buijs, R.M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res.* 309, 109–118.
- Karasek, M. (2004). Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* 39, 1723–1729.
- Kersten, S., Seydoux, J., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* 103, 1489–1498.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D.L., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., et al. (1997). Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene. *Cell* 89, 641–653.
- Klein, D.C. (1985). Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found. Symp.* 117, 38–56.

- Klein, D.C. (2007). Arylalkylamine N-Acetyltransferase: “the Timezyme.” *J. Biol. Chem.* 282, 4233–4237.
- Klein, D.C., and Weller, J.L. (1972). Rapid Light-Induced Decrease in Pineal Serotonin N-Acetyltransferase Activity. *Science* 177, 532–533.
- Klosen, P., Bienvenu, C., Demartean, O., Dardente, H., Guerrero, H., Pévet, P., and Masson-Pévet, M. (2002). The mt1 Melatonin Receptor and ROR β Receptor Are Co-localized in Specific TSH-immunoreactive Cells in the Pars Tuberalis of the Rat Pituitary. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1647–1657.
- Klosen, P., Sébert, M.-E., Rasri, K., Laran-Chich, M.-P., and Simonneaux, V. (2013). TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* 27, 2677–2686.
- Ko, C.H., and Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15, R271–R277.
- Kobilka, B.K. (2007). G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 794–807.
- Kohsaka, A., Laposky, A.D., Ramsey, K.M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F.W., and Bass, J. (2007). High-Fat Diet Disrupts Behavioral and Molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metab.* 6, 414–421.
- Kolakowski, L.F. (1994). GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors Channels* 2, 1–7.
- Kolář, J., Macháčková, I., Eder, J., Prinsen, E., van Dongen, W., van Onckelen, H., and Illnerová, H. (1997). Melatonin: Occurrence and daily rhythm in *Chenopodium rubrum*. *Phytochemistry* 44, 1407–1413.
- Kramer, A., Yang, F.-C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C., and Weitz, C.J. (2001). Regulation of Daily Locomotor Activity and Sleep by Hypothalamic EGF Receptor Signaling. *Science* 294, 2511–2515.
- Kraves, S., and Weitz, C.J. (2006). A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat. Neurosci.* 9, 212–219.
- Kronfeld-Schor, N., Richardson, C., Silvia, B.A., Kunz, T.H., and Widmaier, E.P. (2000). Dissociation of leptin secretion and adiposity during prehibernatory fattening in little brown bats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1277–R1281.
- Kumbalasiri, T., and Provencio, I. (2005). Melanopsin and other novel mammalian opsins. *Exp. Eye Res.* 81, 368–375.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vazquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., et al. (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326, 437–440.
- Lasar, D., Rosenwald, M., Kiehlmann, E., Balaz, M., Tall, B., Opitz, L., Lidell, M.E., Zamboni, N., Krznar, P., Sun, W., et al. (2018). Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

Controls Mature Brown Adipocyte Inducibility through Glycerol Kinase. *Cell Rep.* 22, 760–773.

Lass, A., Zimmermann, R., Oberer, M., and Zechner, R. (2011). Lipolysis – A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog. Lipid Res.* 50, 14–27.

Legros, C., Chesneau, D., Boutin, J.A., Barc, C., and Malpoux, B. (2014a). Melatonin from Cerebrospinal Fluid but Not from Blood Reaches Sheep Cerebral Tissues Under Physiological Conditions. *J. Neuroendocrinol.* 26, 151–163.

Legros, C., Devavry, S., Caignard, S., Tessier, C., Delagrange, P., Ouvry, C., Boutin, J.A., and Nosjean, O. (2014b). Melatonin MT1 and MT2 receptors display different molecular pharmacologies only in the G-protein coupled state. *Br. J. Pharmacol.* 171, 186–201.

Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., and Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587–2587.

Levoe, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.-L., Couturier, C., Delagrange, P., and Jockers, R. (2006a). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J.* 25, 3012–3023.

Levoe, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.-L., and Jockers, R. (2006b). Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep.* 7, 1094–1098.

Lewis, J.E., and Ebling, F.J.P. (2017). Tanycytes As Regulators of Seasonal Cycles in Neuroendocrine Function. *Front. Neurol.* 8.

Li, X. (2013). SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 45, 51–60.

Li, J.J., and Biggin, M.D. (2015). Statistics requantitates the central dogma. *Science* 347, 1066–1067.

Lincoln, G.A., Johnston, J.D., Andersson, H., Wagner, G., and Hazlerigg, D.G. (2005). Photorefractoriness in Mammals: Dissociating a Seasonal Timer from the Circadian-Based Photoperiod Response. *Endocrinology* 146, 3782–3790.

Lincoln, G.A., Clarke, I.J., Hut, R.A., and Hazlerigg, D.G. (2006). Characterizing a Mammalian Circannual Pacemaker. *Science* 314, 1941–1944.

Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., and Reppert, S.M. (1997). Molecular Dissection of Two Distinct Actions of Melatonin on the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron* 19, 91–102.

Liu, J., Clough, S.J., Hutchinson, A.J., Adamah-Biassi, E.B., Popovska-Gorevski, M., and Dubocovich, M.L. (2016). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 361–383.

Liu, Y., Hu, W., Wang, H., Lu, M., Shao, C., Menzel, C., Yan, Z., Li, Y., Zhao, S., Khaitovich, P., et al. (2010). Genomic analysis of miRNAs in an extreme mammalian hibernator, the Arctic ground squirrel. *Physiol. Genomics* 42A, 39–51.

- Logez, C., Berger, S., Legros, C., Banères, J.-L., Cohen, W., Delagrangé, P., Nosjean, O., Boutin, J.A., Ferry, G., Simonin, F., et al. (2014). Recombinant Human Melatonin Receptor MT1 Isolated in Mixed Detergents Shows Pharmacology Similar to That in Mammalian Cell Membranes. *PLOS ONE* 9, e100616.
- Logez, C., Damian, M., Legros, C., Dupré, C., Guéry, M., Mary, S., Wagner, R., M'Kadmi, C., Nosjean, O., Fould, B., et al. (2016). Detergent-free Isolation of Functional G Protein-Coupled Receptors into Nanometric Lipid Particles. *Biochemistry (Mosc.)* 55, 38–48.
- López, M., Varela, L., Vázquez, M.J., Rodríguez-Cuenca, S., González, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., et al. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* 16, 1001–1008.
- López, M., Alvarez, C.V., Nogueiras, R., and Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol. Med.* 19, 418–427.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Luan, Y., Ou, J., Kunze, V.P., Qiao, F., Wang, Y., Wei, L., Li, W., and Xie, Z. (2017). Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveals adaptive changes of hibernating retinas: Retinal adaptive response to hibernation. *J. Cell. Physiol.*
- Lucas, R.J., Lall, G.S., Allen, A.E., and Brown, T.M. (2012). Chapter 1 - How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. In *Progress in Brain Research*, M.M. Andries Kalsbeek Till Roenneberg and Russell G. Foster, ed. (Elsevier), pp. 1–18.
- Ma, X., Chen, C., Krausz, K.W., Idle, J.R., and Gonzalez, F.J. (2008). A Metabolomic Perspective of Melatonin Metabolism in the Mouse. *Endocrinology* 149, 1869.
- Malek, Z.S., Pévet, P., and Raison, S. (2004). Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience* 125, 749–758.
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice, F., Gayrard, V., and Thiery, J.C. (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol. Reprod.* 48, 752–760.
- Malpaux, B., Skinner, D.C., and Maurice, F. (1995). The ovine pars tuberalis does not appear to be targeted by melatonin to modulate luteinizing hormone secretion, but may be important for prolactin release. *J. Neuroendocrinol.* 7, 199–206.
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., and Chemineau, P. (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139, 1508–1516.
- Malpaux, B., Migaud, M., Tricoire, H., and Chemineau, P. (2001). Biology of Mammalian Photoperiodism and the Critical Role of the Pineal Gland and Melatonin. *J. Biol. Rhythms* 16, 336–347.

Bibliographie

- Marcheva, B., Ramsey, K.M., Buhr, E.D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C.H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M.H., et al. (2010). Disruption of the Clock Components CLOCK and BMAL1 Leads to Hypoinsulinemia and Diabetes. *Nature* 466, 627.
- Masana, M.I., and Dubocovich, M.L. (2001). Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path Through the Dark. *Sci STKE* 2001, pe39-pe39.
- Masana, M.I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W.M., Duckles, S.P., Dubocovich, M.L., and Krause, D.N. (2002). MT2 Melatonin Receptors Are Present and Functional in Rat Caudal Artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 1295–1302.
- Masson-Pévet, M., and Gauer, F. (1994). Seasonality and melatonin receptors in the pars tuberalis in some long day breeders. *Biol. Signals* 3, 63–70.
- Masson-Pévet, M., Pévet, P., and Vivien-Roels, B. (1987). Pinealectomy and constant release of melatonin or 5-methoxytryptamine induce testicular atrophy in the European hamster (*Cricetus cricetus*, L.). *J. Pineal Res.* 4, 79–88.
- Masson-Pévet, M., Naimi, F., Canguilhem, B., Saboureau, M., Bonn, D., and Pévet, P. (1994). Are the annual reproductive and body weight rhythms in the male European hamster (*Cricetus cricetus*) dependent upon a photoperiodically entrained circannual clock? *J. Pineal Res.* 17, 151–163.
- Maury, E., Ramsey, K.M., and Bass, J. (2010). Circadian Rhythms and Metabolic Syndrome From Experimental Genetics to Human Disease. *Circ. Res.* 106, 447–462.
- Maywood, E.S., Bittman, E.L., and Hastings, M.H. (1996). Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol. Reprod.* 54, 470–477.
- Mazzucchelli, C., Pannacci, M., Nonno, R., Lucini, V., Fraschini, F., and Stankov, B.M. (1996). The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 39, 117–126.
- McClung, C.R. (2006). Plant Circadian Rhythms. *Plant Cell* 18, 792–803.
- McMillan, A.C., and White, M.D. (2015). Induction of thermogenesis in brown and beige adipose tissues: molecular markers, mild cold exposure and novel therapies. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 22, 347–352.
- Medvedev, V.E. (2017). Agomelatine in the treatment of mild-to-moderate depression in patients with cardiovascular disease: results of the national multicenter observational study PULSE. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 13, 1141–1151.
- Merriman, D.K., Sajdak, B.S., Li, W., and Jones, B.W. (2016). Seasonal and post-trauma remodeling in cone-dominant ground squirrel retina. *Exp. Eye Res.* 150, 90–105.
- M. Humphries, M., W. Thomas, D., and L. Kramer, D. (2003). The Role of Energy Availability in Mammalian Hibernation: A Cost-Benefit Approach. *Physiol. Biochem. Zool.*

- Milesi, S., Simonneaux, V., and Klosen, P. (2017). Downregulation of Deiodinase 3 is the earliest event in photoperiodic and photorefractory activation of the gonadotropic axis in seasonal hamsters. *Sci. Rep.* 7.
- Millan, M.J., Gobert, A., Lejeune, F., Dekeyne, A., Newman-Tancredi, A., Pasteau, V., Rivet, J.-M., and Cussac, D. (2003). The Novel Melatonin Agonist Agomelatine (S20098) Is an Antagonist at 5-Hydroxytryptamine_{2C} Receptors, Blockade of Which Enhances the Activity of Frontocortical Dopaminergic and Adrenergic Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 954–964.
- Moenter, S.M., Woodfill, C.J., and Karsch, F.J. (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology* 128, 1337–1344.
- Møller, M., and Baeres, F.M. (2002). The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. *Cell Tissue Res.* 309, 139–150.
- Monecke, S., Sage-Ciocca, D., Wollnik, F., and Pévet, P. (2013). Photoperiod Can Entrain Circannual Rhythms in Pinealectomized European Hamsters. *J. Biol. Rhythms* 28, 278–290.
- Moore, R.Y., and Card, J.P. (1994). Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* 344, 403–430.
- Moore, R.Y., and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201–206.
- Moore, R.Y., and Lenn, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 146, 1–14.
- Morgan, P.J., and Williams, L.M. (1996). The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. *Rev. Reprod.* 1, 153.
- Morgan, P.J., Barrett, P., Howell, H.E., and Helliwell, R. (1994). Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 24, 101–146.
- Morin, and Wood (2001). *The Golden Hamster Brain*.
- Morin, L.P., Goodless-Sanchez, N., Smale, L., and Moore, R.Y. (1994). Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience* 61, 391–410.
- Mrosovsky, N. (1996). Locomotor Activity and Non-Photic Influences on Circadian Clocks. *Biol. Rev.* 71, 343–372.
- Mullur, R., Liu, Y.-Y., and Brent, G.A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. *Physiol. Rev.* 94, 355–382.
- Munk, C., Isberg, V., Mordalski, S., Harpsøe, K., Rataj, K., Hauser, A.S., Kolb, P., Bojarski, A.J., Vriend, G., and Gloriam, D.E. (2016). GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2195–2207.

- Murphy, M., Jethwa, P.H., Warner, A., Barrett, P., Nilaweera, K.N., Brameld, J.M., and Ebling, F.J.P. (2012). Effects of manipulating hypothalamic triiodothyronine concentrations on seasonal body weight and torpor cycles in siberian hamsters. *Endocrinology* 153, 101–112.
- Nader, N., Chrousos, G.P., and Kino, T. (2010). Interactions of the Circadian CLOCK System and the HPA Axis. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21, 277–286.
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., and Schibler, U. (2004). Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts. *Cell* 119, 693–705.
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., and Sassone-Corsi, P. (2009). Circadian Control of the NAD⁺ Salvage Pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324, 654–657.
- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., et al. (2008). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452, 317–322.
- Nakayama, T., and Yoshimura, T. (2017). Seasonal Rhythms: The Role of Thyrotropin and Thyroid Hormones. *Thyroid* 28, 4–10.
- NASA (2017). What Is Earth? | NASA.
- Nawaz, M.A., Huang, Y., Bie, Z., Ahmed, W., Reiter, R.J., Niu, M., and Hameed, S. (2016). Melatonin: Current Status and Future Perspectives in Plant Science. *Front. Plant Sci.* 6.
- Nelson, D.E., and Takahashi, J.S. (1991). Sensitivity and integration in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Physiol.* 439, 115–145.
- Nelson, C.S., Marino, J.L., and Allen, C.N. (1996). Melatonin receptors activate heteromeric G-protein coupled Kir3 channels. *Neuroreport* 7, 717–720.
- Neumann, K., Michaux, J., Lebedev, V., Yigit, N., Colak, E., Ivanova, N., Poltoraus, A., Surov, A., Markov, G., Maak, S., et al. (2006). Molecular phylogeny of the Cricetinae subfamily based on the mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA genes and the nuclear vWF gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 135–148.
- Nicholls, T.J., Follett, B.K., Goldsmith, A.R., and Pearson, H. (1988). Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 375–385.
- Nishiwaki-Ohkawa, T., and Yoshimura, T. (2016). Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *J. Endocrinol.* 229, R117–R127.
- Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., and Yodoi, J. (1999). Identification of Thioredoxin-binding Protein-2/Vitamin D3 Up-regulated Protein 1 as a Negative Regulator of Thioredoxin Function and Expression. *J. Biol. Chem.* 274, 21645–21650.
- Nosjean, O., Ferro, M., Cogé, F., Beauverger, P., Henlin, J.-M., Lefoulon, F., Fauchère, J.-L., Delagrangé, P., Canet, E., and Boutin, J.A. (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem.* 275, 31311–31317.

- O'Hara, B.F., Watson, F.L., Srere, H.K., Kumar, H., Wiler, S.W., Welch, S.K., Bitting, L., Heller, H.C., and Kilduff, T.S. (1999). Gene Expression in the Brain across the Hibernation Cycle. *J. Neurosci.* *19*, 3781–3790.
- Oishi, K., Shirai, H., and Ishida, N. (2005). CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR α) in mice. *Biochem. J.* *386*, 575–581.
- Oka, S., Hsu, C.-P., and Sadoshima, J. (2012). Regulation of Cell Survival and Death by Pyridine Nucleotides. *Circ. Res.* *111*, 611–627.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* *109*, 307–320.
- Patterson, R.E., Laughlin, G.A., Sears, D.D., LaCroix, A.Z., Marinac, C., Gallo, L.C., Hartman, S.J., Natarajan, L., Senger, C.M., Martínez, M.E., et al. (2015). Intermittent fasting and human metabolic health. *J. Acad. Nutr. Diet.* *115*, 1203–1212.
- Petit, L., Lacroix, I., de Coppet, P., Strosberg, A.D., and Jockers, R. (1999). Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* *58*, 633–639.
- Pévet, P. (2003). Melatonin: from seasonal to circadian signal. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 422–426.
- Pévet, P., Buijs, R.M., Masson-Pévet, M., and Canguilhem, B. (1987). Pineal and photoperiodic control of different seasonal functions in the European hamster: importance of gonadal steroids and of the central vasopressinergic innervation. *Fundam. Clin. Pineal Res.* *44*, 221–235.
- Pévet, P., Bothorel, B., Sloten, H., and Saboureau, M. (2002). The chronobiotic properties of melatonin. *Cell Tissue Res.* *309*, 183–191.
- Pévet, P., Saboureau, M., and Klosen, P. (2004). How the photoperiod times the annual reproductive and hibernation cycles. In *Living in the Cold*, pp. 395–406.
- Physicalgeography.net (2017). 6(i). Earth-Sun Relationships and Insolation.
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Oliveira, R.M. de, Leid, M., McBurney, M.W., and Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* *429*, 771.
- Pickard, G.E. (1985). Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci. Lett.* *55*, 211–217.
- Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 639–650.
- Pitrosky, B., Delagrange, P., Rettori, M.C., and Pévet, P. (2003). S22153, a melatonin antagonist, dissociates different aspects of photoperiodic responses in Syrian hamsters. *Behav. Brain Res.* *138*, 145–152.

Bibliographie

- Poirel, V.-J., Masson-Pévet, M., Pévét, P., and Gauer, F. (2002). MT1 melatonin receptor mRNA expression exhibits a circadian variation in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 946, 64–71.
- Poirel, V.-J., Cailotto, C., Streicher, D., Pévét, P., Masson-Pévet, M., and Gauer, F. (2003). MT1 melatonin receptor mRNA tissular localization by PCR amplification. *Neuro Endocrinol. Lett.* 24, 33–38.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., and Rollag, M.D. (2000). A Novel Human Opsin in the Inner Retina. *J. Neurosci.* 20, 600–605.
- Puigserver, P., and Spiegelman, B.M. (2003). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC-1 α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. *Endocr. Rev.* 24, 78–90.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Raghuram, S., Stayrook, K.R., Huang, P., Rogers, P.M., Nosie, A.K., McClure, D.B., Burris, L.L., Khorasanizadeh, S., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2007). Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1207–1213.
- Ralph, M.R., and Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241, 1225–1227.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Ramsey, K.M., Yoshino, J., Brace, C.S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.-K., Chong, J.L., Buhr, E.D., Lee, C., et al. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD⁺ Biosynthesis. *Science* 324, 651–654.
- Reinberg, A.E. (1991). Chronobiologie médicale, chronothérapie.
- Reiter, R.J. (2004). Mechanisms of cancer inhibition by melatonin. *J. Pineal Res.* 37, 213–214.
- Reiter, R.J., Tan, D.-X., Manchester, L.C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R.M., and Mayo, J.C. (2003). Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv. Exp. Med. Biol.* 527, 539–548.
- Reiter, R.J., Tan, D.-X., and Fuentes-Broto, L. (2010). Chapter 8 - Melatonin: A Multitasking Molecule. In *Progress in Brain Research*, Luciano Martini, ed. (Elsevier), pp. 127–151.
- Remé, C.E., and Young, R.W. (1977). The effects of hibernation on cone visual cells in the ground squirrel. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 815–840.
- Reppert, S.M. (1997). Melatonin Receptors: Molecular Biology of a New Family of G Protein-Coupled Receptors. *J. Biol. Rhythms* 12, 528–531.

- Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935–941.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., and Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13, 1177–1185.
- Reppert, S.M., Godson, C., Mahle, C.D., Weaver, D.R., Slaugenhaupt, S.A., and Gusella, J.F. (1995a). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8734.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Cassone, V.M., Godson, C., and Kolakowski, L.F. (1995b). Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. *Neuron* 15, 1003–1015.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., and Godson, C. (1996a). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 100–102.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., Ebisawa, T., Mahle, C.D., and Kolakowski, L.F. (1996b). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett.* 386, 219–224.
- Revel, F.G., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2006). Melatonin regulates type 2 deiodinase gene expression in the syrian hamster. *Endocrinology* 147, 4680–4687.
- Revel, F.G., Ansel, L., Klosen, P., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2007a). Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 57–65.
- Revel, F.G., Herwig, A., Garidou, M.-L., Dardente, H., Menet, J.S., Masson-Pévet, M., Simonneaux, V., Saboureau, M., and Pévet, P. (2007b). The circadian clock stops ticking during deep hibernation in the European hamster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 13816–13820.
- Revel, F.G., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Mikkelsen, J.D., and Simonneaux, V. (2009). Melatonin Controls Seasonal Breeding by a Network of Hypothalamic Targets. *Neuroendocrinology* 90, 1–14.
- Reyns, G.E., Venken, K., Morreale de Escobar, G., Kühn, E.R., and Darras, V.M. (2003). Dynamics and regulation of intracellular thyroid hormone concentrations in embryonic chicken liver, kidney, brain, and blood. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 80–87.
- Rhoads, A., and Au, K.F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13, 278–289.
- Ribelayga, C., Gauer, F., Pévet, P., and Simonneaux, V. (1998). Distribution of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA in the rat brain: an in situ hybridisation study. *Cell Tissue Res.* 291, 415–421.
- Ribelayga, C., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P., and Simonneaux, V. (1999a). Photoneural Regulation of Rat Pineal Hydroxyindole-O-Methyltransferase (HIOMT) Messenger Ribonucleic Acid Expression: An Analysis of Its Complex Relationship with HIOMT Activity. *Endocrinology* 140, 1375–1384.

Bibliographie

- Ribelayga, C., Garidou, M.-L., Malan, A., Gauer, F., Calgari, C., Pévet, P., and Simonneaux, V. (1999b). Photoperiodic Control of the Rat Pineal Arylalkylamine-N-Acetyltransferase and Hydroxyindole-O-Methyltransferase Gene Expression and Its Effect on Melatonin Synthesis. *J. Biol. Rhythms*.
- Ribelayga, C., Pévet, P., and Simonneaux, V. (2000). HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278, R1339–R1345.
- Rivera-Bermúdez, M.A., Masana, M.I., Brown, G.M., Earnest, D.J., and Dubocovich, M.L. (2004). Immortalized cells from the rat suprachiasmatic nucleus express functional melatonin receptors. *Brain Res.* 1002, 21–27.
- Rizzoti, K., and Lovell-Badge, R. (2017). Pivotal role of median eminence tanycytes for hypothalamic function and neurogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 445, 7–13.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1[α] and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.
- Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F., and Leo, O. (2003). Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 683–690.
- Roseboom, P.H., and Klein, D.C. (1995). Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta-adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. *Mol. Pharmacol.* 47, 439–449.
- Ruby, N.F. (2003). Hibernation: When Good Clocks Go Cold. *J. Biol. Rhythms* 18, 275–286.
- Ruby, N.F., and Zucker, I. (1992). Daily torpor in the absence of the suprachiasmatic nucleus in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 263, R353–R362.
- Ruby, N.F., Dark, J., Heller, H.C., and Zucker, I. (1996). Ablation of suprachiasmatic nucleus alters timing of hibernation in ground squirrels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9864–9868.
- Rui, L. (2014). Energy Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* 4, 177–197.
- Ruud, J., Steculorum, S.M., and Brüning, J.C. (2017). Neuronal control of peripheral insulin sensitivity and glucose metabolism. *Nat. Commun.* 8.
- Sáenz de Miera, C., Monecke, S., Bartzen-Sprauer, J., Laran-Chich, M.-P., Pévet, P., Hazlerigg, D.G., and Simonneaux, V. (2014). A circannual clock drives expression of genes central for seasonal reproduction. *Curr. Biol.* 24, 1500–1506.
- Sáenz de Miera, C., Malan, A., and Simonneaux, V. (2015). Une horloge circannuelle sonne le réveil des hibernants. *médecine/sciences* 31, 367–369.
- Sano, Y., Shiina, T., Naitou, K., Nakamori, H., and Shimizu, Y. (2015). Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 462, 322–325.

- Scanlan, T.S. (2009). 3-Iodothyronamine (T1AM): A New Player on the Thyroid Endocrine Team? *Endocrinology* 150, 1108–1111.
- Scarpace, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., and Tumer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 273, E226–E230.
- Schmutz, I., Ripperger, J.A., Baeriswyl-Aebischer, S., and Albrecht, U. (2010). The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev.* 24, 345–357.
- Schwartz, C., Hampton, M., and Andrews, M.T. (2013). Seasonal and Regional Differences in Gene Expression in the Brain of a Hibernating Mammal. *PLoS ONE* 8, e58427.
- Schwartz, C., Ballinger, M.A., and Andrews, M.T. (2015). Melatonin receptor signaling contributes to neuroprotection upon arousal from torpor in thirteen-lined ground squirrels. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R1292.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671.
- Sechter, D., Haffen, E., Bordet, R., Servant, D., Claustrat, B., Bruguerolle, B., Pévet, P., Touitou, Y., de Leersnyder, H., and Benoit, M. (2006). *Psychiatrie et rythmes circadiens* (Masson).
- Serkova, N.J., Rose, J.C., Epperson, L.E., Carey, H.V., and Martin, S.L. (2007). Quantitative analysis of liver metabolites in three stages of the circannual hibernation cycle in 13-lined ground squirrels by NMR. *Physiol. Genomics* 31, 15–24.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., and Reppert, S.M. (1997). Two period Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. *Neuron* 19, 1261–1269.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., et al. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* 91, 1043–1053.
- Simonneaux, V., and Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol. Rev.* 55, 325–395.
- Skene, D.J., Papagiannidou, E., Hashemi, E., Snelling, J., Lewis, D.F.V., Fernandez, M., and Ioannides, C. (2001). Contribution of CYP1A2 in the hepatic metabolism of melatonin: studies with isolated microsomal preparations and liver slices. *J. Pineal Res.* 31, 333–342.
- Srere, H.K., Wang, L.C., and Martin, S.L. (1992). Central role for differential gene expression in mammalian hibernation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7119–7123.
- Stanton, T.L., Daley III, J.C., and Salzman, S.K. (1987). Prolongation of hibernation bout duration by continuous intracerebroventricular infusion of melatonin in hibernating ground squirrels. *Brain Res.* 413, 350–355.

- Stanton, T.L., Siuciak, J.A., Dubocovich, M.L., and Krause, D.N. (1991). The area of 2-[125I]iodomelatonin binding in the pars tuberalis of the ground squirrel is decreased during hibernation. *Brain Res.* 557, 285–288.
- Stephan, F.K., and Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1583–1586.
- Stratmann, M., and Schibler, U. (2006). Properties, Entrainment, and Physiological Functions of Mammalian Peripheral Oscillators. *J. Biol. Rhythms* 21, 494–506.
- Sugden, D. (2003). Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J. Neurochem.* 86, 1308–1311.
- Suofu, Y., Li, W., Jean-Alphonse, F.G., Jia, J., Khattar, N.K., Li, J., Baranov, S.V., Leronni, D., Mihalik, A.C., He, Y., et al. (2017). Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E7997–E8006.
- Tan, D.-X., Manchester, L.C., Fuentes-Broto, L., Paredes, S.D., and Reiter, R.J. (2011). Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity. *Obes. Rev.* 12, 167–188.
- Tanaka, M., Ichitani, Y., Okamura, H., Tanaka, Y., and Ibata, Y. (1993). The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res. Bull.* 31, 637–640.
- Teboul, M., Guillaumond, F., Gréchez-Cassiau, A., and Delaunay, F. (2008). Minireview: The Nuclear Hormone Receptor Family Round the Clock. *Mol. Endocrinol.* 22, 2573–2582.
- Thomas, D. (2002). *The Physiological Ecology of Vertebrates: A View from Energetics.* By Brian Keith McNab; Foreword by James H Brown. *Q. Rev. Biol.* 77, 335–336.
- Thomson, P.A., Wray, N.R., Thomson, A.M., Dunbar, D.R., Grassie, M.A., Condie, A., Walker, M.T., Smith, D.J., Pulford, D.J., Muir, W., et al. (2004). Sex-specific association between bipolar affective disorder in women and GPR50, an X-linked orphan G protein-coupled receptor. *Mol. Psychiatry* 10, 470–478.
- Tosini, G., Baba, K., Hwang, C.K., and Iuvone, P.M. (2012). Melatonin: An Underappreciated Player in Retinal Physiology and Pathophysiology. *Exp. Eye Res.* 103, 82–89.
- Touitou, Y. (2001). Human aging and melatonin. Clinical relevance. *Exp. Gerontol.* 36, 1083–1100.
- Touitou, Y., and Haus, E. (1992). *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., and Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7728–7733.
- Tsuchiya, Y., Akashi, M., and Nishida, E. (2003). Temperature compensation and temperature resetting of circadian rhythms in mammalian cultured fibroblasts. *Genes Cells* 8, 713–720.

- Tu, H.M., Kim, S.-W., Salvatore, D., Bartha, T., Legradi, G., Larsen, P.R., and Lechan, R.M. (1997). Regional Distribution of Type 2 Thyroxine Deiodinase Messenger Ribonucleic Acid in Rat Hypothalamus and Pituitary and Its Regulation by Thyroid Hormone. *Endocrinology* 138, 3359–3368.
- Turek, F.W., Elliott, J.A., Alvis, J.D., and Menaker, M. (1975). Effect of prolonged exposure to nonstimulatory photoperiods on the activity of the neuroendocrine-testicular axis of golden hamsters. *Biol. Reprod.* 13, 475–481.
- Turek, F.W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Olson, S., Easton, A., Jensen, D.R., et al. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science* 308, 1043.
- Underwood, H., and Goldman, B.D. (1987). Vertebrate Circadian and Photoperiodic Systems: Role of the Pineal Gland and Melatonin. *J. Biol. Rhythms* 2, 279–315.
- Vanecek, J. (1998). Cellular Mechanisms of Melatonin Action. *Physiol. Rev.* 78, 687–721.
- Vaněček, J., Janský, L., Illnerová, H., and Hoffmann, K. (1985). Arrest of the circadian pacemaker driving the pineal melatonin rhythm in hibernating golden hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 80, 21–23.
- Vaněček, J., Pavlík, A., and Illnerová, H. (1987). Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 435, 359–362.
- Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., and Babu, M.M. (2013). Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185–194.
- Vitale, P.M., Darrow, J.M., Duncan, M.J., Shustak, C.A., and Goldman, B.D. (1985). Effects of photoperiod, pinealectomy and castration on body weight and daily torpor in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Endocrinol.* 106, 367–375.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.-M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., and Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, *Clock*, Essential for Circadian Behavior. *Science* 264, 719.
- Waldhauser, F., Waldhauser, M., Lieberman, H.R., Deng, M.H., Lynch, H.J., and Wurtman, R.J. (1984). Bioavailability of oral melatonin in humans. *Neuroendocrinology* 39, 307–313.
- Wang, L.C.H., and Lee, T.F. (2011). Torpor and Hibernation in Mammals: Metabolic, Physiological, and Biochemical Adaptations. In *Comprehensive Physiology*, (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 507–532.
- Watts, A.G., and Swanson, L.W. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258, 230–252.
- Watts, A.G., Swanson, L.W., and Sanchez-Watts, G. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258, 204–229.

- Weaver, D.R., Liu, C., and Reppert, S.M. (1996). Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters.: *Molecular Endocrinology*: Vol 10, No 11.
- Webster, J.R., Moenter, S.M., Barrell, G.K., Lehman, M.N., and Karsch, F.J. (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 129, 1635–1643.
- Weitten, M., Robin, J.-P., Oudart, H., Pévet, P., and Habold, C. (2013). Hormonal changes and energy substrate availability during the hibernation cycle of Syrian hamsters. *Horm. Behav.* 64, 611–617.
- Weitten, M., Oudart, H., and Habold, C. (2016). Maintenance of a fully functional digestive system during hibernation in the European hamster, a food-storing hibernator. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 193, 45–51.
- Welsh, D.K., Yoo, S.-H., Liu, A.C., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2004). Bioluminescence Imaging of Individual Fibroblasts Reveals Persistent, Independently Phased Circadian Rhythms of Clock Gene Expression. *Curr. Biol. CB* 14, 2289.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577.
- Witt-Enderby, P.A., MacKenzie, R.S., McKeon, R.M., Carroll, E.A., Bordt, S.L., and Melan, M.A. (2000). Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of the human mt1 melatonin receptor. *Cell Motil. Cytoskeleton* 46, 28–42.
- Witt-Enderby, P.A., Bennett, J., Jarzynka, M.J., Firestone, S., and Melan, M.A. (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 72, 2183–2198.
- Woodfill, C.J., Wayne, N.L., Moenter, S.M., and Karsch, F.J. (1994). Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol. Reprod.* 50, 965–976.
- Xiao, C.-T., Chu, M.-X., Fu, Y., Fang, L., and Ye, S.-C. (2007). Analysis of polymorphism, structure and function of exon 2 of ovine melatonin receptor 1b gene: a clue as to why it lacks expression in sheep. *J. Pineal Res.* 42, 97–104.
- Yagita, K., Tamanini, F., Horst, G.T.J. van der, and Okamura, H. (2001). Molecular Mechanisms of the Biological Clock in Cultured Fibroblasts. *Science* 292, 278–281.
- Yang, X., Downes, M., Yu, R.T., Bookout, A.L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (2006). Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell* 126, 801–810.
- Yasuo, S., Watanabe, M., Nakao, N., Takagi, T., Follett, B.K., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2005). The Reciprocal Switching of Two Thyroid Hormone-Activating and -Inactivating Enzyme Genes Is Involved in the Photoperiodic Gonadal Response of Japanese Quail. *Endocrinology* 146, 2551–2554.

- Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Nakamura, T.J., Watanabe, T., Takagi, T., Ono, H., Ebihara, S., and Yoshimura, T. (2007). Differential response of type 2 deiodinase gene expression to photoperiod between photoperiodic Fischer 344 and nonphotoperiodic Wistar rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1315–1319.
- Yasuo, S., Yoshimura, T., Ebihara, S., and Korf, H.-W. (2009). Melatonin Transmits Photoperiodic Signals through the MT1 Melatonin Receptor. *J. Neurosci.* 29, 2885–2889.
- Yin, L., and Lazar, M.A. (2005). The Orphan Nuclear Receptor Rev-erb α Recruits the N-CoR/Histone Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian Bmal1 Gene. *Mol. Endocrinol.* 19, 1452–1459.
- Yin, L., Wu, N., Curtin, J.C., Qatanani, M., Szwergold, N.R., Reid, R.A., Waitt, G.M., Parks, D.J., Pearce, K.H., Wisely, G.B., et al. (2007). Rev-erb α , a Heme Sensor That Coordinates Metabolic and Circadian Pathways. *Science* 318, 1786–1789.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepka, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., et al. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5339–5346.
- Yoon, M. (2009). The role of PPAR α in lipid metabolism and obesity: Focusing on the effects of estrogen on PPAR α actions. *Pharmacol. Res.* 60, 151–159.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., and Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426, 178–181.
- Yuan, L., Geiser, F., Lin, B., Sun, H., Chen, J., and Zhang, S. (2015). Down but Not Out: The Role of MicroRNAs in Hibernating Bats. *PLOS ONE* 10, e0135064.
- Zawilska (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythm.
- Zhdanova, I.V. (2005). Melatonin as a hypnotic: *Pro. Sleep Med. Rev.* 9, 51–65.
- Zheng, Z., Liu, X., Zhao, Q., Zhang, L., Li, C., and Xue, Y. (2014). Regulation of UCP1 in the Browning of Epididymal Adipose Tissue by β 3-Adrenergic Agonist: A Role for MicroRNAs. *Int. J. Endocrinol.* 2014.
- Zlotos, D.P., Jockers, R., Cecon, E., Rivara, S., and Witt-Enderby, P.A. (2014). MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* 57, 3161–3185.

ANNEXES

**Annexe 1 : Détails des séquences soumises à GenBank des
gènes clonés pour les trois études de ce manuscrit.**

LOCUS Seq1 240 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2 (Nr1d2) mRNA, partial CDS.

ACCESSION Seq1

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 240)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..240

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>240

/codon_start=1

/product="Nuclear receptor subfamily 1 group D member 2"

/translation="GFFRRSIQQNIQYKKCLKNENC SIMRMNRNRCQQCRFKKCLSVGMSRD
AVRFGRI PKREKQRMLIEMQSAMKTMMNTQFN"

BASE COUNT 79 a 45 c 62 g 54 t

ORIGIN

1 gggtttcttc ggaggagcat tcagcaaac atccaataga agaagtcct gaagaatgag
61 aactgctcta tcatgaggat gaacaggaac cgatgccagc agtgtcgctt caagaagtgt
121 ctgtcagtggaatgtcaag agatgctgtt cgatttgcc gaattcctaa gcgtgagaaa
181 cagagaatgc taattgaaat gcagagtgca atgaagacca tgatgaacac ccagttcaat

LOCUS Seq2 362 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] leptin receptor (Lepr) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq2

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 362)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..362

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>362

/codon_start=2

/product="leptin receptor (Lepr)"

/translation="CRRLDGLGYWSNWSRPAYTLVMDVKVPMRGPEFWRIMNGDITKKEKN
VTLLWKPLMKNDLCSVRRYVVQHRTAHNGTWSEDAGDQTNLTFLWAEQAHTVT
VLAINSIGASLANFNLTFS"

BASE COUNT 101 a 75 c 93 g 93 t

ORIGIN

1 ctgcaggcgg ttgatggac ttgggtactg gagtaactgg agcaggccgg cctacacact
61 tgtcatggat gtaaaagttc ctatgagagg acctgaattt tggagaataa tgaatggtga
121 tattactaaa aaagagaaaa atgtcacctt gcttggaag cccctgatga aaaatgactc
181 cctgtgcagc gtgaggaggt atgtggtgca gcatcgact gccacaaatg ggacgtggtc
241 agaagacgca ggagatcaga ccaatctcac ttcttatgg gcagaacaag cgcataccgt
301 tacggttctg gccatcaatt ccattggtgc ttccttgca aattttaac taacatttc
361 at

LOCUS Seq3 382 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Fibroblast growth factor 21 (Fgf21) mRNA, partial CDS.

ACCESSION Seq3

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 382)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..382

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>382

/codon_start=3

/product="Fibroblast growth factor 21 (Fgf21)"

/translation="VLGLWVPLLAIFLLGISQAHPIPDSSPLLQFGGQVRHRHLYTDDNQDTEV
HLEIREDGTVVGTTHRSPESLLELKALKPGVIQILGVKASRFLCQQPDGTLYGSPHFDP
EACSFRELLLEDGYNVY"

BASE COUNT 82 a 114 c 104 g 82 t

ORIGIN

```

1  gggctcctggg actgtgggtc cctctgttg ctatcttct gctggggatc tcccaggcac
61  accccatccc tgactccagt cccctctcc agtttggggg tcaagtccgg cacaggcacc
121 tctacacaga tgacaaccag gacactgaag tccacctgga gatcaggag gatggcacgg
181 tggtagggac cacacaccgc agcccagaaa gtctctgga gctcaaagcc ttgaagccag
241 gggatcatcca aatcctgggt gtcaaggcct ccaggtttct tgccaacaa ccagatggaa
301 ccctgtatgg atgcctcac ttgatctg aggcctgcag ttcaggag ctcttgctg
361 aggatggata caatgtgtac ca

```

LOCUS Seq4 441 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Thioredoxin interacting protein (Txnip) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq4

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 441)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..441

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>441

/codon_start=1

/product="Thioredoxin interacting protein (Txnip)"

/translation="FEVMDLVDVNTPDLMAPVSAKKEKKVSCMFIPDGRVSVSARIERKGFC
EGDDISIHADFENTCSRIVVPKAAIVARHTYLANGQTKVLTQKLSSVRGNHIISGTCAS
WRGKSLRVQKIRPSILGCNLRVEYSLLIYVSVPGSKKVI"

BASE COUNT 109 a 111 c 111 g 110 t

ORIGIN

```

1 ttgaagtga tggatctagt ggacgtcaat acccctgatt taatggcacc ggtatccgct
61 aaaaaggaga agaaagtttc ctgcatgttc atccctgatg ggcgcgtgtc ggtctctgct
121 cgaatcgaag ggaaggatt ctgtgaaggt gatgacatct ccatccatgc cgactttgag
181 aacacatggt cccggattgt ggtcccaaaa gcagctattg tggctcggca cacttacctt
241 gccaatggcc agactaaagt attaacgcag aagctgtcct cagtcagagg caatcatatc
301 atctcgggga cctgcgcctc atggcgaggc aagagcctcc gtgtgcagaa gatcagacca
361 tccatccttg gttgcaacat cctgcgtgtg gactactcct tgctgatcta tgtagtgctc
421 ccaggctcca agaaagtcac c

```

LOCUS Seq5 487 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (Ppargc1a) mRNA, partial CDS.

ACCESSION Seq5

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 487)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..487

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>487

/codon_start=2

/product="Peroxisome proliferator-activated receptor
gamma, coactivator 1 alpha (Ppargc1a)"

/translation="SLLSQRPQRMRSRSRFSRHRSCSRSPYSRSRSRSPGSRSSSRSCYYYESS
HYHRHTRHNSPLYVRSRSRSPYSRRPRYDSYETYQHERLKRDEYRREYEKRESERAK
QRERQKQKAIEERRVIYVGKIRPDTRTELDRFEVFGIEIECTVNLRDDGDSY"

BASE COUNT 153 a 116 c 116 g 102 t

ORIGIN

```

1 atccttactt tctcaaagac cccaaaggat gcgctctcgt tcaagatcct tttctcggca
61 cagatcgtgt tccgatcac catattccag gtcaagatca aggtccccag gcagtagatc
121 ctcttcaaga tctgctact actatgaatc aagccactac cgacaccgca cacaccgcaa
181 ttctcccttg tatgtgagat cacgttcaag atcacctac agccgtaggc ccaggtatga
241 cagctatgaa acatatcagc atgaaaggct gaagagggat gaataccgca gagagtatga
301 gaaacgggaa tctgaaaggg ccaagcagag ggagagacag aagcagaaag caattgaaga
361 acgccgtgtg atttacgttg gtaaaatcag acctgacaca acgcggacag aactgagaga
421 ccgctttgaa gtttttggtg aaattgagga atgcacagta aatctgcggg atgatggaga
481 cagctat
```

Annexes

LOCUS Seq6 510 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq6

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 510)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..510

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>510

/codon_start=1

/product="Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Ppara)"

/translation="FHKCLSVGMSHNAIRFGRMPRSEKAKLKAEILTCEHDLEDSETADLKSL
AKRIHEAYLKNFNMNKVKARVILAGKTSNPPFVIHDMETLCMAEKT LVAKMVAN
GIQNKEAEVRIFHCCQCMSVETVTELTEFAKAIPGFANLDLNDQVTLLKYGVYEAIFT
MLSSL MNK"

BASE COUNT 154 a 125 c 119 g 112 t

ORIGIN

```
1 ttccacaagt gcctgtccgt tgggatgtca cacaatgcaa ttcgttttgg acgcatgcc
61 agatctgaga aagcaaaact gaaagcagaa attcttacat gtgaacatga tctagaagat
121 tcggagactg cagacctcaa atctctggcc aagagaatcc acgaggccta cctgaagaac
181 ttcaacatga acaaggtaa ggcccgggtc atcctcgag gaaagaccag caataacca
241 ccttttgta tacatgacat ggagacgttg tgtatggctg agaagacact tgtggccaag
301 atggtggcca atggcatcca aaacaaggag gcagaagtcc gaatctcca ctgctgccag
361 tgcattgccg tggagactgt caccgagctc acagaatttg ccaaggccat cccaggcttc
421 gcaaacttgg acttgaatga ccaagtcacc ttgctaaagt acggtgtgta tgaagccata
481 ttcaaatgc tgcctcctt gatgaacaaa
```

LOCUS Seq7 600 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] uncoupling protein 1 (UCP1) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq7

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 600)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..600

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>600

/codon_start=3

/product="Uncoupling protein 1 (UCP1)"

/translation="VQEYFSSGKETPPTLGNRISAGLMTGGVAVFIGQPTEVVKVRLQAQSHL
YGIKPRYTGTYNAYRIIATTESLSTLWKGTTNLLRNVIINCTELVTYDLMKGALVNN
QILADDVPCHLLSALVAGFCTTLLASPADVVKTRFINSPLPGQYPSVPSCAMTMFTKEG
PTAFFKGFVPSFLRLASWNVIMFVCFEQLKKELM"

BASE COUNT 170 a 149 c 134 g 147 t

ORIGIN

```

1 ctgtccagga gtacttctct tcagggaaag aaacacctcc cactttggga aacaggatct
61 cagctgggtt aatgacagga ggtgtggcag tattcatcgg gcaacctact gaggtcgtga
121 aagtcagact ccaagcacag agccacctat atgggatcaa accccgatac actgggacct
181 acaatgctta cagaattata gccacaacag aaagcttatc aacactctgg aaaggaacga
241 cccctaattc ttgaggaat gtcacatca actgtacaga gttggaaca tatgacctca
301 tgaagggggc ccttgtgaac aaccaaatac tggcagatga tgtgccatgc catttgctgt
361 cagctcttgt cgctgggttt tgcaccacac tcctggcctc tccggcagat gtggtaaaaa
421 caagattcat caactctcta ccaggacagt acccaagtgt cccagctgt gcaatgacca
481 tggtcaccaa agaaggacca acagcttttt tcaaagggtt tgtgccttct ttctgacgac
541 tcgcatcctg gaatgtcatc atgtttgtgt gctttgaaca gctgaagaaa gaactgatga

```

LOCUS Seq8 477 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] sirtuin 1 (Sirt1) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq8

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 477)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O.,

BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine
78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..477
/organism="*Cricetus cricetus*"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:10034"
CDS <1..>477
/codon_start=2
/product="Sirtuin 1 (Sirt1)"

/translation="PRTQKESVHLSLPPTPLHISEDSSSPERTVPPQDSASMIATCVDQATENRV
DDLEVSESEGCVEEKSQEAHTCRSVESINAENPDLKAVGSSTGEKNERTSVAEAVRK
CWPNRLAKEQISKRLDGNQYLFVPPNRYIFHGAEVYSDSEEDILSSSSCD"

BASE COUNT 155 a 96 c 112 g 114 t

ORIGIN

1 accacgaaca caaaaggaat cggttcattt atcagagttg ccaccaacac ctcttcatat
61 ttcggaagac tcaagttcac ctgaaagaac tgtaccacaa gattctgctt ccatgattgc
121 tacatgtgta gaccaagcaa cagagaacag agttgatgat ttagaagtggt ctgaatcaga
181 aggctgtgtg gaagaaaagt cacaagaagc acacacttgt aggagtgttg agagcattaa
241 tgcagaaaat ccagatctca aggctgttgg ttccagtact ggagagaaaa atgaaagaac
301 ttcagttgca gaagcagtga gaaagtgttg gcccaataga cttgcaaagg agcagattag
361 taagcggctt gatggtatc agtacctgtt tgtaccacca aaccgttaca tattccatgg
421 cgccgaggtg tactcggact ctgaagagga catcttatcc tctagttcct gtgatga

[*Cricetus cricetus*] circadian locomoter output cycles protein kaput (Clock) mRNA,partial CDS.

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine
78290, FRANCE

FEATURES Location/Qualifiers

```
CDS <1..>496
/codon_start=3
/product="Circadian locomoter output cycles protein kaput
(Clock)"
```

BASE COUNT 87 a 36 c 61 g 86 t 226 others

1 ttgacagaga tgacagtagt atttttgatg gattggtgga agaagatgac aaggacaaag
61 caaaaagagt atctagaaac nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
121 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
181 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
241 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
301 nnnnnnnaggc tcttgatggt tttttttag cgatcatgac agatggaagt ataatatatg
361 tatctgagag tgtaacttca ttacttgaac atttaccatc tgatcttgat gatcaaagta
421 tatttaattt tatccccgag ggagaacatt cagaggttta taggatactg tctactcatc
481 tgctggaaag tgactc

Annexes

LOCUS Seq10 179 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*], period circadian protein 2 (Per2) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq10

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 179)

AUTHORS GAUTIER, C., RIEST-FERY, I., BRASSEUR, C., STEPHAN, J.-P., NOSJEAN, O., BOUTIN, J.A., SIMONNEAUX, V. and GUENIN, S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..179

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>179

/codon_start=3

/product="Period circadian protein 2 (Per2)"

/translation="AHKELIRTLRELKVHLPADKKAKGKASTLATLKYALRSVKQVKANEEY
YQLLMSSSQP"

BASE COUNT 54 a 50 c 55 g 20 t

ORIGIN

1 acgcacacaa agaactgata aggacactga gggagctgaa ggtccacctc cctgcagaca

61 agaaggccaa ggggaaggcc agcacgctgg caaccctgaa gtacgccctg cggagcgtga

121 agcaggtgaa ggctaacgaa gactactacc agctgctgat gtccagcgag agccagccc

LOCUS Seq1 1549 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] G protein-coupled receptor 50 (Gpr50) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq1

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1549)

AUTHORS Dupre,C., Gautier,C., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1549

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>1549

/codon_start=1

/product="G protein-coupled receptor 50 (Gpr50)"

/translation="CNIFVASLSVADMLVAIYPYPMMLYAMSVGGWDLSQLQCQLVGLISGL
SVVGSIFNITAIINRYCYICHSLQYKRIFSLRNTCIYLIITWVMTVLAVLPNKYIGTIEY
DPRTYSCIFNYANNSAFTVTIVCIHFVLPLFIVGYCYTKIWIKVLAARDPAEQNPNDNQF
AEVRNFLTMFVIFLLFAVCWCPIVLTVLVAVSPKDMAGKIPSWLYLAAYCIAFYNS
CLNAVIYGVNLNESFRREYWSIFHALRHPISFISHLIADIRETWETRALTRARVHAQSLA
QEQUEHARACLAVEGTPQNVRNVLLPGDAAAHAHSDCASAHKPKPQTKSASAYRKPAISI
HHKSLSGHPKSASVYPKPTSSVHFKPASVHFKPTSVHFKGDSVYFKGDSVHFRAASK
LATSHHVSAGSSSKHPTSTAGYIKPATSHPATTTVDYLEPASTSHSVLTAADLPEISAS
HCLEMTTGTGHLKPGITVSNLPVVFPEVAATSASPPDSTVIPIATDDYRKVVLIDDDFDD
S"

BASE COUNT 318 a 480 c 313 g 438 t

ORIGIN

1 tgcaacatct ttgtggccag tctctctgtg gcagacatgc tgggtggccat ctaccctac
61 cctatgatgc tgtatgccat gtcagttggg ggctgggacg tgagtcagct ccagtgccag
121 ctatgcggat tgatctcagg actgagtgtg gtgggttcca tctcaacat caccggccatt
181 gccatcaacc gttactgtta catctgccac agcctccaat acaagcggat ctcagtcgtg
241 cgcaatactt gcatctacct gatcattacc tgggtcatga ctgtcctggc tgtcctgcct
301 aacaagtaca ttggcaccat tgagtatgat cctcgaacct actcctgtat ctcaactat
361 gcgaacaact ctgccttcac ggttaccatt gtctgcatcc acttcgtcct ccctctcttc
421 atagtcgggtt attgctacac aaaaatctgg atcaaagtgc tggcagcccg tgatccagca
481 gaacagaatc ctgataacca gtttgctgag gttcgaaatt ttctaaccat gtttgtgac
541 ttctactttt ttgagtggtg ctgggtgcct atcaatgtgc tcactgtgtt ggtggctgct

601 agtccaaagg atatggcagg caagatcccc agctggctgt atcttgacgc ctactgcata
661 gcctacttca acagctgcct gaatgctgtc atctatgggtg tctcaatga gagtttccga
721 cgagaatact ggtccatctt ccatgctttg cggcacccta tctcgttcat ctctcacctc
781 atcgtgata ttcgggagac ttgggaaacc cgagctctca ctcgagcccc tgtccatgcc
841 cagagtctag cccaagaaca agagcatgcc cgtgcctgtc tcgctgtgga gggaaccccc
901 caaaatgtcc ggaatgttct actgcctggg gatgcagcag cagcccactc tgattgtgcc
961 tctgcccac ctaagcccc aaccaagtct gcttctgcct accgcaaacc tgcctctatc
1021 catcacaagt ctctttctgg ccacccaag tctgcctctg tctatcctaa gccaacctcc
1081 tctgtccatt ttaagcctgc ctctgtccat ttcaaacca cctctgtcca tttcaagggg
1141 gactctgtct atttcaaggg agactctgtt catttcaggg ctgcttcaa gcttgccact
1201 agtcaccatg tctctgctgg ctcttctct aagcatccta catccactgc tggatacatt
1261 aagcctgcta ccagccaccc tgctaccacc actgttgact atcttgagcc tgccagcacc
1321 agccattctg tgctcactgc tgctgacctc cctgagatct cagcttcca ttgccttgag
1381 atgaccacca ctggccacct caaacctggc attactgtct ccaaccttcc tgttgattc
1441 cccgaggttg ctgccacctc tgccagtcct cctgactcta ctgtaatccc cattgccact
1501 gatgattacc gcaaggctgt gcttattgat gatgatttg atgattctg

[*Cricetus cricetus*] period circadian clock 1 (Per1) mRNA,partial CDS.

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

AUTHORS Dupre,C., Gautier,C., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine
78290, FRANCE

FEATURES Location/Qualifiers

```
/organism="Cricetus cricetus"
```

```
/db_xref="taxon:10034"
```

```
/codon start=1
```

[illegible]

ORIGIN

1 cgagaacctt ttgacctgg aggagtccca tccctgggg cccacagca ccggcctgt

61 ccaggcccca gcctggctga tgacactgat gcaaacagca atggctcaag tggcaatgaa
 121 tccaatggac acgagtcacg ggggtgcact cagcggagtt ctcagttc ttcttctggc
 181 aatggcaagg actcagccct actggagacc actgagagca gcaaaagtac aaactctcag
 241 agcccatctc caccaagtag ttccattgcc tatagcctcc tgagtgaag ctcagagcag
 301 gacaacccat ctaccagtgg ctgcagtagt gagcagtcag ctcgagccag gaccagaag
 361 gaactcatga ctgcacttcg ggagctcaaa ctgcactgc caccagaacg tcggggcaag
 421 ggccgatccg ggaccctggc cactactgcag tatgccttgg catgtgtcaa gcaggttcag
 481 gctaaccagg aatattatca gcagtggagt ctggaggagg gtgagccttg tgccatggac
 541 atgtctactt acaccttga ggaactggag catatcacat ccgaatacac tcttcaaac
 601 caggacacct tctctgtggc cgtgtccttc ctgacaggcc ggattgtcta tatttcggag
 661 caggcagggtg tcctgtgctg ttgcaagcgg gatgtgttc ggggtgccc cttctcagag
 721 ctctagctc cccaggacgt ggggtgtctt tatggctcga ctacaccatc tcgactgccc
 781 acttggggca ctgggacctc tgcaggttca ggcctcaagg acttcacca ggaaaagtct
 841 gtcttctgcc gaatcagagg aggtcctgac cgggatccag ggcctcggta ccagccattc
 901 cgtctaccc catatgtgac caagattcgg gtctcagatg gggccctgc acagccatgc
 961 tgctactca ttgcagagcg tatccactct ggttatgaag ctcccccat cctctctgac
 1021 aagaggatct tcaccacgag gcacacacc agctgcctct tccaggatgt ggatgaaagg
 1081 gctgcaccac tgctgggcta cctgccccag gatctcctgg gggctccagt actctcttt
 1141 ctgcatctg aggacagacc cctcatgctg gccattcata agaagattct gcagctggca
 1201 gggcagccct ttgaccactc tcctattcgc ttctgtgctc ggaatgggga atatgtcacc
 1261 atggacacta gctgggcccgg ctttgtgcac ccctggagcc gcaagggtggc ttctgtgtg
 1321 ggccgccata aagtacgcac ggcacccctg aatgaggatg tcttactcc cccagccccc
 1381 agtccagctc tgtccctgga ctctgacata caggagctct cagagcagat ccacggcta
 1441 ctgttgacg ctgtgcacag ctccagcccc acagggtctt gtggagtgg tcctctgatg
 1501 tctctggct ctctacatag cctggctcc tccagtga gcaatggggg tgatgctgag
 1561 gggcctgggc ctctgctcc agtgacttcc cagcagatct gtaaggatgt gcatctggg
 1621 aagcaccagg gacaacagct cttcattgag tcccgggcca agcctccacc tcggccccgc
 1681 ctctcgta caggtaact caaggccaaa gtcttctc gccagtcacc aaaccagaa
 1741 ctggaggtgg ctctgctcc tgaccaagcc ccactagcat tggcctctga ggagccagag
 1801 aggaaagaag cctccagctg ttcctaccag cagatcaatt gtctggacag catcctcagg
 1861 tatttgaga gctgcaacat tcccagcaca acaaagcgta aatgtgcctc ctctcttcc
 1921 tgactgctt cctcagctc tgatgatgac aagcagaggg caggcccagt tcctgtgggn
 1981 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2041 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2101 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2161 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2221 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2281 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2341 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2401 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2461 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2521 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2581 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn
 2641 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

2701 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
 2761 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
 2821 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn
 2881 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnntg cagcttgagg agtccccccg cactgagggg
 2941 ggtgctgctg cagggggccc tggaagcagt gctgggcccc cgctccag tgaggaggct
 3001 gctgagccag aggccagact ggtagaggta accgagtcct ccaatcagga tgcactttcg
 3061 ggctccagtg acttgctgga gctcctacta caagaagatt ctcgctctgg aacaggctct
 3121 gcagcttcag gctctctggg ctctggcttg ggctctgggt ctgggtcagg atcccacgaa
 3181 ggggggagca cctcagccag cattactcg agcagccaaa gcagccacac aagcaagtac
 3241 ttggtagca tcgactcttc agaggctgag gctggcgctg ctcaggccag gactgagccc
 3301 ggggaccagg tcattaagta tgtgctccag gatcccatct ggctgctcat ggccaatgct
 3361 gaccagcatg tcatgatgac ataccagggtg ccctccaggg acacagctc tgtgctgaag
 3421 caagaccggg agaggctccg ggccatgcag aagcaacagc cacggttctc agaggaccag
 3481 cggcgggaac tgggtgctgt gcactcctgg gtccgga

LOCUS Seq3 649 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] actin beta (Actb) mRNA,partial CDS.

ACCESSION Seq3

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 649)

AUTHORS Dupre,C., Gautier,C., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..649

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>649

/codon_start=3

/product="actin beta (Actb)"

/translation="DVDVTLHDGIECSFVDATGFHTQEGRLEKSLRATEPLIANGDDLAI RQLI
ALLQRGRGCSSGHLLELVQGNIAQLLFDVTHDFPLSCGGEAVATLGQDLHEVVCQVP
ASQVQTQDGMRESVALIDGHSVGDPVSGVHHNASGTTRGIQGQHSLNGYVHGWGV
EGLKHDLGHLFTVGLGVQGGGLGEQHRVLLGGHTQLVVEGVVPDLLHIVPVG DNA"

BASE COUNT 143 a 166 c 200 g 140 t

ORIGIN

```
1 cggatgtcga cgtcacactt catgatggaa ttgaatgtag ttctgtggat gccacaggat
61 tccataccca ggaaggaagg ctggaaaaga gcctcagggc aacggaaccg ctcatgcca
121 atggtgatga cctggccatc aggcagctca tagctcttct ccagagagga agaggatgca
181 gcagtggcca tctcctgctc gaagtccagg gcaacatagc acagcttctc ttgatgtca
241 cgcacgattt ccctctcagc tgtggtgggtg aagctgtagc cagctcggc caggatcttc
301 atgaggtagt ctgtcaggtc ccggccagcc aggtccagac gcaggatggc atgagggaga
361 gcgtagccct catagatggg cacagtgtgg gtgaccccggt ctccggagtc catcacaatg
421 ccagtggtag gaccagaggc atacagggac agcacagcct gaatggctac gtacatggct
481 ggggtgttga aggtctcaaa catgatctgg gtcattttt cacgggtggc cttgggggtc
541 aggggggcct cggtagcag cacagggtgc tcctcggggg ccacacgcag ctcggttag
601 aaggtgtggt gccagatctt ctccatctg tccagttgg tgacaatgc
```

LOCUS Seq1 1847 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] BmaII aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like (Arntl) mRNA, partial CDS.

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1847)

AUTHORS Lizzo,G., Gautier,C., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O.,
Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine
78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1847

/organism="*Cricetus cricetus*"

/mol_type="mRNA"

/db_xref="taxon:10034"

CDS <1..>1846

/codon_start=2

/product="BmaII aryl hydrocarbon receptor nuclear
translocator like (Arntl)"

/translation="ISSTISDFMSPGPTDLLSSSLGTSGVDCNRKRKGSATDYQESMDTDKDDP
HGRLEYAEHQGRIKNAREAHSQIEKRRRDKMNSFIDELASLVPTCNAMSRKLDKLT
LRMAVQHMKTTLRGATNPYTEANYKPTFLSDDELKHLILRAADGFLFVVGCDRGKILF
VSESVFKILNYSQNDLIGQSLFDYLHPKDIKVKEQLSSSDTAPRERLIDAKTGLPVKT
DITPGPSRLCSGARRSFFCRMKCNRPVSVKVEDKDFASTCSKKKADRKSFCTIHSTGYL
KSWPPTKMGLDEDNEPDNEGNCNLSCLVAIGRLHSHVVPQPVNGEIRVKSMEYVSRH
AIDGKFVFVDQRATAILAYLPQELLGTSCYEYFHQDDIGHLAECHRQVLQTREKITT
CYKFKIKDGSFITLRSRWFSEFNPWTKEVEYIVSTNTVVLNVLEGGDPTFPQLTASP
HSMDSMLPSGEGGPKRTHPTVPGIPGGTRAGAGKIGRMIAEEIMEIHRIRGSSPSSCGS
SPLNITSTPPPDASSPGGKKILNGGTPDIPSTGLLPGQAQETPGYPYSDSSSILGENPHIGI
DMIDNDQGSSSPSNDEAAMAVIMSLLEADAGLGGPVDFSDL"

BASE COUNT 534 a 459 c 445 g 409 t

ORIGIN

1 catctctca acaatcagt acttcatgtc cccaggcccc accgacctgc tctccagttc
61 cctgggcacc agtgggtgtg actgcaaccg caagaggaaa ggcagtgcca ccgactacca
121 agaaagtatg gacacagaca aagatgaccc tcatggaagg ttagaatatg cagagcacca
181 aggaaggatc aagaatgcaa gggaggccca cagtcagatt gaaaagaggc gtcgggacaa
241 aatgaacagt ttcatgatg agttggcttc tttggtacca acatgcaatg cgatgtccag
301 gaagttgatg aagctcaccg tgctaaggat ggctgttcag cacatgaaaa cgttgagagg
361 tgccacgaac ccatacacag aagcaacta caagccaaca tttctatccg atgacgaact

421 gaagcatcta attctcaggg cagcagatgg atttttgttt gtcgtaggat gtgacagagg
481 gaagatcctc ttcgtctccg agtccgtctt caagatcctc aattatagcc agaatgatct
541 tattggccag agtttgtttg actatctgca ccctaaagat attgccaaag tcaaggaaca
601 gctatcttcc tcagacaccg caccgccgga gcgactcatt gacgcaaaga ctggacttcc
661 ggtaaaaca gatataaccc ctgggccatc ccgactgtgc tctggagctc gccgctcttt
721 cttctgtagg atgaagtgc acaggccttc agttaagggtg gaagataagg actttgcctc
781 tacctgctca aagaaaaag cagatcgaag aagcttctgc accatccaca gcacaggcta
841 tctgaaaagc tggccacca caaagatggg gctggacgaa gacaacgagc cagacaacga
901 gggctgtaac ctacgtgcc ttgtcgcaat tgggcgactg cattcacatg tggttcctca
961 accagtgaac ggggaaataa ggggtgaaatc tatggagtat gtttctcgac acgccataga
1021 tgggaaattc gttttgtag accagagggc aacggctatt ttggcatac taccacagga
1081 acttctaggg acatcatgtt atgaatat tcatcaagat gacataggac atcttcgaga
1141 atgtcacagg caagttttac agacaagaga aaagatcaca actaactgct ataagttaa
1201 gatcaaagac gggtccttta tcacactacg aagtcgatgg ttcagtttca tgaaccctg
1261 gaccaaggaa gtagaataca ttgtctcaac taatactgtt gttttagcca atgtctgga
1321 aggcggggac ccaaccttcc cacagcttac agcgtccccc cacagcatgg acagcatgct
1381 gccctctgga gaagggtggc caaagaggac tcatccact gttccaggca ttccaggggg
1441 aaccagagct ggggcaggaa aaatcggtcg aatgattgca gaagaaatca tggaaatcca
1501 caggataaga ggggtcatcg cttccagctg tggctccagc cactgaaca tcacaagtac
1561 gcctccccct gatgcctcct ctccaggagg caagaagatt ctaaattggag ggactccaga
1621 cattccttcc actggcctac taccagggca ggctcaagag accccagggtt atccatattc
1681 tgatagttct tctattcttg gtgagaaccc ccacataggc atcgatatga tagacaacga
1741 ccaaggatcc agtagtccca gtaatgacga ggcagcgatg gctgtcatca tgagcctctt
1801 ggaagcagat gcgggcctgg gtggtcctgt tgactttagt gacttgc

LOCUS Seq2 800 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] tubulin alpha 1B (Tuba1b) mRNA,partial CDS.

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 800)

AUTHORS Lizzo,G., Gautier,C., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

```

source          1..800
                 /organism="Cricetus cricetus"
                 /mol_type="mRNA"
                 /db_xref="taxon:10034"
CDS             <1..>800
                 /codon_start=3
                 /product="tubulin alpha 1B (Tuba1b)"

```

```

/translation="GKHVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARG
HYTIGKEIIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHSFGGGTSGGFTSLMERLSVDYGKK
SKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTTHTTLEHSDCAFMVDNEAIYDICRRNLDERPTY
TNLNLRLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISAEEKAYHE
QLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYMCCLLYRGDVV"

```

BASE COUNT 175 a 245 c 183 g 197 t

ORIGIN

```

1 ctggcaagca tgtgccccgg gccgtgttcg tagacctgga acccacagtt atcgatgaag
61 ttcgactgg tacctaccgc cagctcttc accctgagca gctcatcaca ggcaaggaag
121 atgctgcaa taactatgcc cgtggccact acaccattgg caaggagatc attgatcttg
181 tcttgacag aattcgcaag ctggctgacc agtgcacagg tcttcagggc ttctgggtt
241 tccacagctt tggtagggga actggctctg gggtcacctc cctgctgatg gagcggctct
301 ctgtcgatta tggaagaag tccaagctgg agttctccat ctaccagcc cccaggtt
361 cactgctgt ggtagagccc tacaactcca tctcaccac ccacaccacc ctggagcact
421 ctgattgtgc cttcatggta gacaacgagg ccatctatga catctgtcgt agaaacctcg
481 acattgagcg cccacacct actaacctta accgcctcat tagccagatt gtgtcttcca
541 tactgcttc cctcagatt gatggagccc tgaatgttg cctgacagaa ttccagacca
601 acctgggtacc ctaccctgc atccattcc ctctggccac atatgccct gtcatctctg
661 ctgagaaagc ctacatgag cagcttctg tagcagagat caccaatgct tgcttgagc
721 cagccaacca gatgtgaaa tggaccctc gccatggtaa atacatggct tgctgcctgc
781 tgtaccgtgg ggatgtggtt

```

LOCUS Seq1 1062 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Melatonin receptor 1A (Mtnr1a) mRNA, complete CDS.

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1062)

AUTHORS Gautier,C., Dupre,C., Dufour,E., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1062
 /organism="*Cricetus cricetus*"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:10034"

CDS 1..1062
 /codon_start=1
 /product="Melatonin receptor 1A (Mtnr1a)"

/translation="MKGNGSGLLNASQQAPGS GEGGQPRPSWLASTLAFILIFTIVVDILGNLL
 VILSVYRNKKL RNAGNIFV VSLAVADLVVAIYPYPLVLTSIFNNGWN LGYLHCQISAF
 LMGLSVIGSIFNITGIAINRYCYICHSLKYDRLYSNKNSLCYVFLIWVLT LVAIMPNLQ
 TGTLQYDPRIYSCTFTQSVSSVYTVAVVVVFHFIVPMIIVIFCYLRIWILVLQVRRRVKPD
 SKPRLKPQDFRN FVTMFVVFVLF AICWAPLNF IG LIVASDPANMVPRIPEWLFVASY
 MAYFNSCLNAI IYGLLNQNFRQEYKRIIVSLFTAKMFSVDSSNDVADKINCKPAPLIAN
 NNLIKVDSV"

BASE COUNT 249 a 264 c 243 g 306 t

ORIGIN

1 atgaaggga atggtagcgg tctgctcaat gcctgcgagc aggcaccagg cagcggggag
 61 ggtgggcagc cgcggccgct gtggctggct tccacttg ccttcattct catctcacc
 121 atcgtggtgg acatcctggg caacctgctg gtcacacctgt ctgtataccg caacaagaag
 181 ctgaggaacg caggaaatat atttggtg agcttggtg ttgcagacct cgtgggtgct
 241 attaccctt atcccttggt gctgacatcc atatttaaca atggatggaa tctgggat
 301 ctgcactgtc aaattagtc gttcctgatg gggttgagtgc tcttggtc catattcaac
 361 attaccggga ttgccattaa ccgctactgc tacatttgcc acagtctcaa gtacgacaga
 421 ctctacagta acaagaattc cctctgctac gtgttctga tatgggtgtt gacgctgtt
 481 gccatcatgc ccaatctgca aaccggaact ctccagtatg atcccaggat ctactcctgt
 541 accttcacgc agtctgtcag ctctgtgtac acggtagcag tgggtgggtt ccatctcatt
 601 gtgcctatga ttatgctcat ctctgtctac ttaagaatct ggatcctggt tcttcaggct
 661 cgacgcaggg tgaaaccga cagcaaaccc agactgaagc cacaggactt caggaacttt
 721 gtcaccatgt ttgtgtttt tgtactttt gctatttgc tggcccccact caactcatc
 781 ggggtcattg tggcttcaga cctgcccaac atggccccca ggatcctga gtggctgtt

841 gtggctagtt actacatggc gtatttcaac agctgcctca atgcaattat atatggactc
901 ctgaaccaga atttcagaca ggaatacaaa agaattatcg tctcattgtt cacagccaag
961 atgttctctg tagacagctc aaatgatgtg gcagataaga ttaattgtaa gcctgctcca
1021 ctcatagcca ataataattt aataaagggtg gactctgttt aa

LOCUS Seq2 972 bp mRNA linear ROD 01-DEC-2017

[*Cricetus cricetus*] Melatonin receptor 1B (Mtnr1b) mRNA, partial CDS.

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; *Cricetus*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 972)

AUTHORS Gautier,C., Dupre,C., Dufour,E., Riest-Fery,I., Brasseur,C., Stephan,J.-P., Nosjean,O., Boutin,J.A., Simonneaux,V. and Guenin,S.-P.

TITLE Gene expression profiling during European hamster's hibernation

JOURNAL Submitted (01-DEC-2017) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..972
 /organism="*Cricetus cricetus*"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:10034"

CDS 1..972
 /codon_start=1
 /product="Melatonin receptor 1B (Mtnr1b)"

/translation="MPENSSVPIAARLVGWQCALVGPSQPGTGPPGIPRAPWGTSLSLCSXX
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXLFFVSLVLADLVVALYPYPLILAAIVHDG
 WALEETHCKARTFGMGLSIIGSVFNITAIINRYWCICHSATYHQLCSHWHAPFYITL
 VWLLTLVALVPNFFVGSLECDPCIYSCTFIQTASTQYTAVAVAIHFLLPITVVVSFCYLQI
 WVVLRLARRKVKAESKLHLRLGDLRSFLTMAFVVFVFAICWAPLNCIGLAVAINPEV
 MALQVPEGLFVTSYFLAYFNSCLNVIVYGLLNQNFREYKRIL"

BASE COUNT 158 a 270 c 225 g 234 t 85 others

ORIGIN

```

1 atgcctgaga acagttctgt gccaatgct gcgaggctgg tgggctggca gtgcgctctg
61 gttggtccca gccagccggg cacaggcca ccaggcattc cccgggctcc ttggggaacc
121 tcctgtcat cctctctgtg ctcccccccc ncccccccc ncccccccc ncccccccc
181 ncccccccc ncccccccc ncccccccc ncccccccc nccccccntt gttgtggtg
241 agtctggtct tggccgacct ggtggtagct ttgtaccctt acccactgat cctcgcggcc
301 attgtccatg atggtgggac ccttgaagag acccactgca aagccagaac ctttgggatg
361 ggcctgagca tcattggctc tgtctcaac atcacagcca ttgctatcaa ccgctactgg
421 tgcattctgc acagtgaac ctaccaccag ctctgcagtc actggcatgc ccccttctac
481 atcacctcgc tctggtctct cactctggtg gccttggtgc ccaattctt tgtgggggtc
541 ctagagtgtg acccatgcat ctattctgc accctcatcc agacagccag caccagtagc
601 actgcagttg cgggtggccat tcttctctc ctccaatca ctgtggtatc cttctgctac
661 ctgcaaatct ggggtactggt gctccgggcc cgaaggaagg tcaaggctga gagtaagctg
721 cacctgagga tgggtgactt gcgcagtttc ctaaccatgt ttgcagtgtt tgtggtttt
781 gccatagctg gggccccctt caactgcac ggcttgcag tggccatcaa cccagaggtg
841 atggctctcc aggtccaga ggggctttt gtcaccagct acttctagc ttactcaac

```

901 agctgcctta acgtcattgt ctatgggctc ctgaaccaga acttccgcag ggagtacaag
961 aggatcctct aa

LOCUS KT992792 602 bp mRNA linear ROD 19-APR-2016

***Cricetus cricetus* NAD(P)H dehydrogenase quinone 2 mRNA, partial cds.**

ACCESSION KT992792 VERSION KT992792.1

SOURCE *Cricetus cricetus* (black-bellied hamster) ORGANISM *Cricetus cricetus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Myomorpha; Muroidea; Cricetidae; Cricetinae; Cricetus.

TITLE Cloning of different genes in European Hamster

JOURNAL Submitted (03-NOV-2015) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine 78290, France

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..602 /

organism="*Cricetus cricetus*" /

mol_type="mRNA" /

db_xref="taxon:10034" /

tissue_type="whole brain"

CDS <1..>602 /note="ribosyl dihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]; Nqo2" /

codon_start=3 /product="NAD(P)H dehydrogenase quinone 2"

/protein_id="AMY26887.1"

/translation="VLIYAHQEPMSFNGSLKKVAVEELSKQGCTVTVSDLYAMNFEP

RATRNDITGSLNPEVFRYGI EAYEAYKKTALTS DILEEQRKVQEADLVIFQFPLYWF

SVPAILKGWMDRVL CQGFAFDIPGFYDSGLLKGKLALLSLTTGGTAEMYTKTGVS

GD F RYFLWPLQH GILHFCGFKVLAPQISFGIDVSSEEERKVMV"

ORIGIN

```
1  aagtgctcat catctatgca caccaagaac ccatgtcctt caacgggtcc ctgaagaaag
61  tggctgttga agaactgagc aagcagggat gtacagtcac tgtgtctgac ttatatgcca
121 tgaactttga gccaagggcc acaagaaatg acatcactgg ttccctctct aatcctgaag
181 tttcagata tgggtagata gcctatgaag cctacaagaa gacagctctg accagtgaca
241 tacttgagga gcagaggaag gtgcaagaag ctgatctagt gatatttcag ttcccactat
301 actgggtcag cgtgccagca attctaaaag gatggatgga taggggtgctg tgccaagggg
361 ttgccttcga catcccaggc tttatgact ctggtttgct caagggtaaa ttagccctcc
421 tttccttaac caccggaggt acagctgaga tgtacacaaa aactgggggc agtggagatt
481 tccgggtactt cctatggcca ctccagcatg gtatattgca cttctgtgga tttaaagtcc
541 ttgccccgca gatcagtttt ggtattgatg tttcatcaga agaagaaaga aaagtgatgg
601 tg
```

LOCUS Seq1 1050 bp mRNA linear MAM 11-JAN-2018

[Ornithorhynchus anatinus] Melatonin receptor type 1C (Mel-1c) mRNA, complete cds.

SOURCE Ornithorhynchus anatinus (platypus) ORGANISM Ornithorhynchus anatinus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Monotremata;
Ornithorhynchidae; Ornithorhynchus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1050)

AUTHORS Gautier,C., Riest-Fery,I., Nosjean,O., Simonneaux,V., Grutzner,F., Boutin,J.A.
and Guenin,S.-P.

TITLE Characterization of the Mel1c melatoninergic receptor in platypus Ornithorhynchus
anatinus)

JOURNAL Submitted (11-JAN-2018) BPMC, IdRS, 125 Chemin de Ronde, Croissy sur Seine
78290, FRANCE

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1050
/organism="Ornithorhynchus anatinus"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9258"

CDS 1..1050
/codon_start=1
/product="Melatonin receptor type 1C Mel1C"

/translation="MPGAGNGTCPGCPPSPSSSGRPPGETTALAAALIVTIVGDLLGNTLVILS
VLRNRKLRNAGNIFVISLSVADLVVAVYPYPLILSAIFHNGWTLGNIHCQISGFLTGLS
VIGSIFNITAIINRYCYICHSLRYDSLFTLKNTCRFLCLMWLLTVAAIVPNFFMGSLQY
DPRVYSCTFTQTVSSSYTITVVVIHFILPLSVVTF CYMRIWILVVQVKHRVRQDSKQKL
RVADFQNFLTMFVVFILFAVCWGPLNFIGLAVAINPWKVAPQIPEWLFVMSYF MAYF
NSCLNAVIYGLLRNFRKEYRRIFLTLRTPRLLFSSLSRGGTEGIKSKLSPVRTKKNQA
EIHV"

BASE COUNT 238 a 281 c 240 g 291 t

ORIGIN

```

1 atgccgggag ccgggaacgg gacctgccc ggctgtccgc ctccgtcccc ctctcctcc
61 ggccgcccc cgggggagac cacggccctg gccgccgcc tcacgtcac catcgtgggc
121 gacctctgg gcaacacgct ggtcatctc tccgtgctga ggaacagaaa gtcgccaac
181 gccgggaaca tctttgtgat cagtttatct gtggctgacc tggttgtgc agtgtatccc
241 tacccttaa tcttaagtgc aatttccac aatgggtgga ctctgggaaa cattcactgc
301 caaatcagt gctttctac aggtctaagt gttattggat ctatcttaa taccacggcc
361 atgccatca acagatactg ctacatctgt cacagcctcc gatatgacag cctgttcacc
421 ctcaagaaca catgccgtt cctttgctg atgtggctat taacagtggc agccatcgtg
481 ccaaactttt ttatgggctc tcttcagtat gatcctcggg ttactcctg tacctcacc
541 caaacagtta gttcatccta taccattaca gtagtggtca tccatttat ccttcctctg
601 tcagtggta cgttctgcta catgaggata tggattctgg tggttcaagt caaacaccgg
661 gtgaggcaag actccaagca gaagctaaga gtggccgatt ttcaaatatt cctaactatg

```

Annexes

721 ttgttggtt tcctctgtt tgcagtctgc tggggacat taaatttat aggtcttgcc
781 gttgctatca atccttgga agtggcacca cagattccag agtggctgtt tggtatgagc
841 tactttatgg cctactttaa cagttgtctg aatgccgtga tctatgggct tctcaaccgg
901 aatttccgaa aggaatacag gcgcacttt ctgactctga ggacccaag gttactctt
961 tccagttgt caaggggtgg aaccgaagg atcaagagca aactatccc agtcaggaca
1021 aagaaaaatc aagctgaaat ccatgtgtaa

**Annexe 2 : Liste non exhaustive des bénéfices de la
mélatonine sur différents modèles animaux et cellulaires
(arrêtée au 30/06/2015) (Boutin, 2015).**

Authors	Date	Protection against..	Targets	Amount	Species
Mori <i>et al.</i>	1984	dexametasone-induced injuries	all	1mg/day	rats
Aoyama <i>et al.</i>	1987	dexametasone-induced injuries	all	Same	rats
Pieri <i>et al.</i>	1994	oxidative stress	nonenzymatic	0.5 to 4 µM	acellular/ molecular mice
Blickenstaff <i>et al.</i>	1994	radiation-induced mortality	whole body	1 mmol/kg	mice
Maestroni <i>et al.</i>	1994	tumor growth	Tcells	~20 µg/day	mice
Vijayalaxmi <i>et al.</i>	1995	radiation-induced chromosome damage	cells	0.5 to 2 mM	human cells
Ben-Nathan <i>et al.</i>	1995	Semliki Forest virus-induced encephalitis	brain	500 µg/kg (x13)	mice
Melchiorri <i>et al.</i>	1995	paraquat-induced oxidative stress	lung & liver	10 mg/kg	rats
Giusti <i>et al.</i>	1995	kainate-induced excitotoxicity	neurons	0.5 - 2.5 mM	rat cells
Vijayalaxmi <i>et al.</i>	1995	radiation-induced micronuclei	lymphocytes	2mM	human lymphocytes
Daniels <i>et al.</i>	1995	CCl4-induced lipid peroxidation	liver	10 mg/kg	rats
Sewerynek <i>et al.</i>	1995	H2O2-induced lipid peroxidation	brain	0.1 to 4 mM	rats
Melchiorri <i>et al.</i>	1995	kainate-induced lipid peroxidation	brain	0.1 to 4 mM	rats
Sewerynek <i>et al.</i>	1995	lipopolysaccharide-induced toxicity	liver	1 mg/kg	rats
Manev <i>et al.</i>	1996	kainate-induced apoptosis	brain	2.5 mg/kg	rats
Hara <i>et al.</i>	1996	swinning-induced oxidative stress	muscle	1 mg/kg	rats
Giusti <i>et al.</i>	1996	kainate-induced excitotoxicity	brain	10 mg/kg	rats
Melchiorri <i>et al.</i>	1996	kainate-induced lipid peroxidation	brain	0.1 to 5 mM	rats
Sewerynek <i>et al.</i>	1996	ischemia/reperfusion-induced oxidative damage	liver	10 mg/kg	rats
Yamamoto & Tang	1996	L-Cysteine-induced seizures	brain	20 or 100 mg/kg	mice
Ellis	1996	Aleutian disease-induced mortality	all	2.7 mg per animal	mink
Vijayalaxmi <i>et al.</i>	1996	radiation-induced genetic damage	monocytes	300 mg	human monocytes
Livrea <i>et al.</i>	1997	lipid peroxydation	acellular	5 to 500 µM	lipod bilayers
Hara <i>et al.</i>	1997	exercice-induced oxidative stress	muscle, liver	1 mg/kg	rats
Konturek <i>et al.</i>	1997	ischemia/reperfusion-induced lesions	stomach	5mg/kg	rats
Melchiorri <i>et al.</i>	1997	alcohol-induced injury	gastroduodenum	10 mg/kg	rats
Cho <i>et al.</i>	1997	ischemia/reperfusion-induced toxicity	forerbrain	10 mg/kg	rats
Princ <i>et al.</i>	1997	delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage	cerebellum	0.1 to 2 mM	rats
Abuja <i>et al.</i>	1997	copper-induced oxidative stress	LDL	250 mM	
Morreale & Livrea	1997	oxidative stress	skin homogenates	up to 200mM	human
De La Lastra <i>et al.</i>	1997	ischemia/reperfusion-induced injury	stomach	up to 20mg/kg	rats
Brzozowski <i>et al.</i>	1997	stress, ethanol, ischemia, and aspirin-induced acute lesions	stomach	up to 10 mg/kg	rats
Antolin <i>et al.</i>	1997	H2O2-induced lethal oxidative stress		0.5 mM	dinoflagelate
Princ <i>et al.</i>	1998	delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage	porphiria	50 to 500 µg/kg	rats
Carneiro & Reiter	1998	delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage	brain	10 mg/kg	rats
Kotler <i>et al.</i>	1998	oxidative stress	induction of antioxidant enzymes	500 µg/kg	rats
Carneiro & Reiter	1998	delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage	kidney & liver	10 mg/kg	rats
Awara <i>et al.</i>	1998	carbamazepine mutagenesis	luymphocytes	0.5 mM	human cells
Skaper <i>et al.</i>	1998	enhanced excitatory neurotransmission_induced neuronal death	neurons	10 to 300 µM	rats
Melchiorri <i>et al.</i>	1998	paraquat genotoxicity	bone marrow and peripheral blood cells	2 mg/kg	mice
Itzhak <i>et al.</i>	1998	methamphetamine-induced neurotoxicity	brain	10 mg/kg	mice

Dreher <i>et al.</i>	1998	UV irradiation-induced erythema	skin	1 & 2.5 %	human
Walters-Laporte <i>et al.</i>	1998	LDL peroxidation	endothelial cells	10 to 100 µM	human
Kato <i>et al.</i>	1998	stress-induced gastric lesions	stomach	1 to 5 mg/kg	rats
Mayo <i>et al.</i>	1999	6-hydroxydopamine toxicity	antiapoptotic	100 nM	PC12 cells
Vijayalaxmi <i>et al.</i>	1999	whole body irradiation	whole body	125 to 250 mg/kg	mice
Alarcon de la Lastra <i>et al.</i>	1999	indomethacin-induced gastric injury	stomach	0.25 to 1 mg/kg	mice
Borowicz <i>et al.</i>	1999	protection against anti-epileptic drugs	brain	50 mg/kg	mice
Kumar <i>et al.</i>	1999	cyclosporine-induced nephrotoxicity	kidney	0.5 mg/kg	rats
Kaya <i>et al.</i>	1999	radiotherapy-induced lipid peroxidation	whole body	100 mg/kg	rats
Crespo <i>et al.</i>	1999	prevents endotoxemia	whole body	10-60 mg/kg	rats
Sainz <i>et al.</i>	1999	antiapoptotic action	thymocytes & thymus	100 nM	rats
Siu <i>et al.</i>	1999	nitric oxide-induced lipid peroxidation	retinae	0.5 to 4 mM	rats
Badr <i>et al.</i>	1999	radioprotective effect	whole body	10 mg/kg	rats
Vijayalaxmi <i>et al.</i>	1999	irradiation-induced genetic damage	blood & bone marrow	5-10 mg/kg	mice
El-Missiry	2000	lead-induced toxicity	liver	30 mg/kg	rats
Behan <i>et al.</i>	1999	NMDA-induced hippocampal damage	brain	40 mg/kg	rats
Di Mascio <i>et al.</i>	2000	peroxynitrite-induced cytoskeleton protein depletion	cell membranes	1 mM	
Cabrera <i>et al.</i>	2000	quinolinic acid-induced neurotoxicity	brain	10 mg/kg	rats
Lopez-Gonzalez <i>et al.</i>	2000	cisplatin-induced ototoxicity	ear	10 mg/L	rats
Okatani <i>et al.</i>	2000	free radical-induced damage	brain	10 mg/kg	rats
Lopez <i>et al.</i>	2000	biliary duct ligation-induced oxidative stress	biliary duct	750 mg/kg	rats
Abdel-Wahab & Abd-Allah	2000	streptozotocin-induced hyperglycaemia	serum	5 mg/kg	mice
Lagneux <i>et al.</i>	2000	ischemia-reperfusion injury	heart	1-10 mg/kg	rats
Kaptanoglu <i>et al.</i>	2000	experimental spinal cord injury	spinal tissues	100 mg/kg	rats
Kaneko <i>et al.</i>	2000	ischemic reperfusion injury	heart	100µM	rats
Qi <i>et al.</i>	2000	chromium(III)-induced DNA damage		0.51 µM	isolated DNA
Khaldy <i>et al.</i>	2000	dopamine autooxidation-induced hydroxy radical formation		1-1000 µM	in vitro
Calvo <i>et al.</i>	2001	α-naphthylisothiocyanate-induced injury	liver	10 mg/kg	rats
Otsuka <i>et al.</i>	2001	water-immersion restraint stress-induced gastric mucosal lesions	stomach	100 ng/rat icv	rats
Hara <i>et al.</i>	2001	cisplatin-induced nephrotoxicity	kidney	5 mg/kg	rats
Salvi <i>et al.</i>	2001	free radicals-induced protein structural damage	cell-free system	up to 1 mM	
Cabeza <i>et al.</i>	2001	ischemia-reperfusion injury	gastrointestinal tissues	5-20 mg/kg	rats
Othman <i>et al.</i>	2001	indomethacin-induced oxidative stress	gastric and testicular tissues	10 mg/kg	rats
Montilla <i>et al.</i>	2001	extra-hepatic bile duct ligation oxidative stress	liver	0.5 mg/kg	rats
Jajte <i>et al.</i>	2001	iron ions and 7 mT 50 Hz magnetic field-induced damage	lymphocytes	0.5-1.0 mM	rats
Ryoo <i>et al.</i>	2001	ultraviolet-B induced	dermal fibroblasts	1 nM	human
Xu <i>et al.</i>	2001	doxorubicin-induced toxicity	heart	90 mg/kg	rats
Szárszoi <i>et al.</i>	2001	ischemia-reperfusion-induced injury	heart	10-10 000 nmol/L	rats
Xu & Ashraf	2002	doxorubicin-induced myocyte injury	heart	1 mM	rats
Arslan <i>et al.</i>	2002	bleomycin-induced fibrosis	lung	10 mg/kg	rats
Hsu <i>et al.</i>	2002	phosphine-induced lipid and DNA oxidation	brain	1 mM	rats
Bonilla <i>et al.</i>	2002	extension of life span and stress resistance	whole body	100 µg/L	flies
Parmar <i>et al.</i>	2002	copper-mediated free radical damage		5 mM	liver homogenates
Gupta <i>et al.</i>	2002	acute ischemic stroke	brain	80 mg/kg	rats

Bilici <i>et al.</i>	2002	ethanol-induced gastric mucosal damage	stomach	10 mg/kg	rats
Görgün <i>et al.</i>	2002	Streptozotocin-induced plasma thiobarbituric acid-reactive substances blockade	plasma	150 µg/kg (x56)	rats
Tomás-Zapico <i>et al.</i>	2002	delta-aminolevulinic acid-induced oxidative damage	Harderian gland	500 µg/kg	hamsters
Leaden <i>et al.</i>	2002	lipid peroxidation of long chain polyunsaturated fatty acids	liver	10 mg/kg	rats
Srivastava <i>et al.</i>	2002	posttraumatic seizures	brain	50 mg/kg	rats
Abdel-Wahab <i>et al.</i>	2002	dibromoacetonitrile-induced oxidative stress	stomach	10 mg/kg	mice
Martin <i>et al.</i>	2002	oxidative stress	astrocytes	10nM - 1mM	rats
Rao <i>et al.</i>	2002	STZ-induced hyperglycemia	plasma	6 mg/kg	rats
Perotti <i>et al.</i>	2002	delta-aminolevulinic acid phototherapy-induced damages		8 mM	LM2 cell line
Kocic <i>et al.</i>	2002	diabetes-induced oxidative stress	mesangial cells	1 to 100 µM	rats
Jaworek <i>et al.</i>	2003	ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis	gut	10-50 mg/kg	rats
Mayo <i>et al.</i>	2003	metal-catalyzed reaction-induced oxidative protein damage	cell-free system	50 µM to 100 mM	in vitro
Jahovic <i>et al.</i>	2003	methotrexate-induced oxidative injury	liver & kidneys	10 mg/kg	rats
Sener <i>et al.</i>	2003	ischemia/reperfusion-induced oxidative injury	liver	10 mg/kg	rats
Chen <i>et al.</i>	2003	myocardial infarction	heart	150 µg/kg	mice
Mayo <i>et al.</i>	2003	peroxyl radical-induced oxidative damage	catalase	250 µM	in vitro
Bonnefont-Rousselot <i>et al.</i>	2003	peroxyl radical-induced oxidative damage	LDL	250 µM	in vitro
Requintina & Oxenkrug	2003	lipopolysaccharide-induced toxicity	several organs	5 mg/kg	mice
Cabeza <i>et al.</i>	2003	ischemia-reperfusion-induced lesions	stomach	20 mg/kg	rats
Erol <i>et al.</i>	2004	gamma radiation-induced damages	brain	100 mg/kg (x5)	rats
Guajardo <i>et al.</i>	2003	ascorbate-Fe ²⁺ dependent lipid peroxidation	retina (in vitro)	10 mM	bovine
Yan <i>et al.</i>	2002	transcatheter arterial chemoembolization-induced liver damage	liver	20 mg	humans
Sperling <i>et al.</i>	2003	iodoacetate-induced neurotoxicity	neuronal cells	1 mM	rats
Ciuffi <i>et al.</i>	2003	ultraviolet exposure	corneal cells	10 µM	rabbits
Sahin <i>et al.</i>	2003	heat stress-related depression	whole birds	40 mg/kg diet	quails
Basile <i>et al.</i>	2004	pathogenesis of sepsis	liver	1 - 10 µM	rat hepatocytes
Gitto <i>et al.</i>	2004	post-surgical distress	neonates	10 mg/kg (x10)	humans
Kilic <i>et al.</i>	2004	mild focal ischemia-induced neuronal death	mice	4 mg/kg (x2)	mice
Gupta <i>et al.</i>	2004	enhances phenytoin and carbamazepine antiseizure effect	drug metabolism	100 to 300 mg/kg	mice
Leja-Szpak <i>et al.</i>	2004	acute pancreatitis	pancreas	up to 250 mg/kg of precursor	mice
Liang <i>et al.</i>	2004	oxidative stress-induced macular degeneration	retinal pigment epithelial cells	0.1-200 µM	humans
Sahin <i>et al.</i>	2004	heat-induced performance inhibition	whole animals	40 mg/kg diet	quails
Görgün <i>et al.</i>	2004	streptozotocin-induced glutathione depletion	plasma	150 µg/kg (x42)	rats
Othman <i>et al.</i>	2004	heavy metals-induced severe haematopoietic disorders	blood and bone marrow	30 mg/kg	rats
Sener <i>et al.</i>	2004	ifosfamide-induced Fanconi syndrome	kidney and bladder tissues	10 mg/kg	rats
Jou <i>et al.</i>	2004	oxidative stress-induced apoptosis	astrocytes	100 µM	rats
Yildirim <i>et al.</i>	2004	cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis	bladder	5 mg/kg (x2)	rats
Siu <i>et al.</i>	2004	nitric oxide-induced eye toxicity	retina	5 mg/kg	rats
Feng <i>et al.</i>	2004	beta-amyloid-induced neurotoxicity	brain	10 mg/kg	mice
Feng <i>et al.</i>	2004	progressive memory deficits	brain	5 - 20 mg/kg	rats
Ogeturk <i>et al.</i>	2005	CCl ₄ -induced toxicity	kidney	25 mg/kg	rats
Padillo <i>et al.</i>	2004	experimental cholestasis-induced cell death	liver	500 µg/kg	rats
Kilic <i>et al.</i>	2004	focal cerebral ischemia	brain	4 mg/kg	mice
Feng & Zhang	2004	beta-amyloid-induced apoptosis	astrogloma C6 cells	100 nM to 10 µM	rat cells
Flora <i>et al.</i>	2004	Lead induced oxidative stress	plasma & liver	50 mg/kg (x5)	rats
Batcioglu <i>et al.</i>	2005	7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced damages	brain	4.2 mg/kg	mice

Karabay <i>et al.</i>	2005	thioacetamide-induced oxidative and nitrosative stress	liver	10 mg/kg	rats
Topal <i>et al.</i>	2005	cyclophosphamide-induced damage	bladder	10 mg/kg	rats
Aydin <i>et al.</i>	2005	experimental subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm	brain	5 mg/kg	rabbits
Oktem <i>et al.</i>	2005	900-MHz-emitted mobile phone-induced oxidative damage	kidney	100 mg/kg	rats
Kratsovnik <i>et al.</i>	2005	ischemic/reperfused-induced oxidative injury	neuronal cultures	1 mM	rats
Wang <i>et al.</i>	2005	ischemic/reperfused-induced oxidative injury	muscles	10 mg/kg	rats
Leaden & Catala	2005	ascorbate-Fe ²⁺ -induced lipid peroxidation	liver, kidney and brain	0.5 - 1.5 mM	rats
Korde <i>et al.</i>	2005	(enhance) humoral and cellular immune responses		100 µg/kg	rats
Brzozowski <i>et al.</i>	2005	stress-induced damage	stomach	1.25 - 10 mg/kg	rats
Carrillo-Vico <i>et al.</i>	2005	septic shock	whole animal	10 mg/kg	mice
Zhao & Liu	2005	oxygen stress	umbilical blood	0.1 to 100 mM	humans
Tang <i>et al.</i>	2006	Graves' disease	plasma	100 µM	humans
Garcia-Rubio <i>et al.</i>	2006	paraquat-induced cytotoxicity	hepatocytes	0.5 - 2 mM	rats
Greish <i>et al.</i>	2006	doxorubicin cytotoxicity	peripheral blood hematopoietic stem cells	10 µM	humans
Fischer <i>et al.</i>	2006	UV-induced apoptosis	keratinocytes	1 nM to 1 mM	humans
Lochner <i>et al.</i>	2006	ischemia-reperfusion injury	heart	25 to 50 µM	rats
Escames <i>et al.</i>	2006	nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction	muscles	30 mg/kg (x3)	mice
Lee <i>et al.</i>	2006	kainic acid-induced neuronal death	hippocampus	10 mg/kg	mice
Han <i>et al.</i>	2006	ischemia/reperfusion-induced apoptosis	neuronal mitochondria	1 nM to 10 µM	rats
Petrosillo <i>et al.</i>	2006	ischemia-/reperfusion mitochondrial dysfunction	heart	50 µM	rats
Sharma & Haldar	2006	X-ray irradiation induced oxidative damage	plasma & spleen	2.5 µg/kg	squirrels
Sadir <i>et al.</i>	2007	cyclophosphamide-induced oxidative damage	bladder	10 mg/kg	rats
Ganguly <i>et al.</i>	2006	indomethacin-induced acute ulceration	stomach	60 mg/kg	rats
Matsura <i>et al.</i>	2006	acetaminophen-induced injury	liver	50 to 100 mg/kg	mice
Luchetti <i>et al.</i>	2007	apoptosis-induced intramitochondrial cardiolipin early changes	U937 cells	1 mM	human cells
Suresh <i>et al.</i>	2006	lead-induced changes	neuroblastoma cells	10 µM	human cells
Zou <i>et al.</i>	2004	photothrombosis-induced infarct size	brain	15 mg/kg	mice
El-Sokkary	2007	phenobarbital-induced oxidative stress	liver	10 mg/kg	rats
Matejovská <i>et al.</i>	2008	hypobaric hypoxia-induced cortical photothrombotic ischemic lesion	brain	100 mg/kg	rats
Chetsawang <i>et al.</i>	2007	MPP ⁺ -induced caspase-mediated death pathway	SK-N-SH cells	1 mM	rats
Perez <i>et al.</i>	2007	maternal cholestasis-induced oxidative stress	fetal liver-placenta-maternal liver	50 mg/kg	rats
Parlakpınar <i>et al.</i>	2007	pinelectomy-induced oxidative stress	kidneys	4 mg/kg	rats
Leaden & Catalá	2007	ascorbic-Fe(2+)-induced lipid peroxidation	liver microsomes	0.3 to 1.5 mM	rats
Sharma <i>et al.</i>	2007	6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease	brain & C17.2 neural stem cells	4.0 µg/mL	rats
Jou <i>et al.</i>	2007	H ₂ O ₂ -induced toxicity	cells	100 µM	/
Albendea <i>et al.</i>	2007	aluminium-induced oxidative damage	synaptosomes	1 to 10 mM	rats
Fischer <i>et al.</i>	2008	UVR-induced damages	HaCaT keratinocytes	1 mM	human cells
Mathes <i>et al.</i>	2008	hemorrhagic shock-induced liver dysfunction	liver	10 mg/kg	rats
Carloni <i>et al.</i>	2008	neonatal hypoxic-ischemic-induced injury	brain	5 mg/kg	rats
Paul <i>et al.</i>	2008	endometriosis-induced MMP9 expression	uterus	48 mg/kg	mice
Das <i>et al.</i>	2008	glutamate excitotoxicity	C6 astroglial cells	150 nM	rats
Yildirim <i>et al.</i>	2008	irradiation-induced injury	central nervous system	1 mg/kg	rats
Chetsawang <i>et al.</i>	2009	hydrogen peroxide- and MPP ⁺ -treated	SH-SY5Y neuroblastoma cells	0.1 & 0.5 mM	human cells
Valero <i>et al.</i>	2009	venezuelan equine encephalomyelitis virus-induced death	whole animals	0.5 mg/kg (x8)	mice
Ozan <i>et al.</i>	2007	cigarette smoke-induced damage	kidneys	4 mg/kg	rats
Genade <i>et al.</i>	2008	myocardial ischaemia/reperfusion-induced injury	heart	50 µM	rats
Mathes <i>et al.</i>	2008	hemorrhagic shock-induced liver dysfunction	liver	1 mg/kg (ramelteon)	rats

Konturek <i>et al.</i>	2008	aspirin-induced acute gastric mucosal damage	stomach	5 mg	humans
Petrosillo <i>et al.</i>	2008	age-related mitochondrial dysfunction	brain	150 µg/mL	rats
Luchetti <i>et al.</i>	2009	UVB-induced apoptosis	U937 cells	1 mM	human cel
Ceyran <i>et al.</i>	2008	ischemia-reperfusion injuries	heart	50 mg/kg	rats
Bas <i>et al.</i>	2009	noise-induced hearing loss	outer hair cell	1 mg/kg (x14)	rats
Lahiri <i>et al.</i>	2009	experimental reflux esophagitis	stomach	10 to 40 mg/kg	rats
Chen <i>et al.</i>	2009	ischemia/reperfusion-induced apoptosis	heart	150 µg/kg	mice
Diez <i>et al.</i>	2009	mild cardiac ischemia-induced ventricular arrhythmias	heart	5 to 50 µM	rats
Ling <i>et al.</i>	2009	constant illumination-induced endoplasmic reticulum damage	brain	0.1 to 10 mg/kg	rats
Bertuglia & Reiter	2009	chronic intermittent hypoxia-induced microvasculature damages	several organs	10 mg/kg	hamsters
Sokullu <i>et al.</i>	2009	cardiopulmonary bypass-induced ischemia-reperfusion injury	heart	natural levels	humans
Assayed & Abd El-Aty	2009	gamma radiation-induced damage	bone-marrow	2.5 mg/kg (x5)	rats
Huang <i>et al.</i>	2009	MPP(+)-induced neuron death	brain	10 mg/kg	rats
Olcese <i>et al.</i>	2009	Alzheimer disease model-induced memory deficit and neurodegeneration	brain	100 mg/L drinking water	rats
Simko <i>et al.</i>	2009	spontaneously hypertension-induced ventricular remodeling	heart	10 mg/kg	rats
Hibaoui <i>et al.</i>	2009	oxidative stress-mediated mitochondrial permeability	muscle	1 to 100 µM	mice
Tapias <i>et al.</i>	2010	rotenone Parkinson's disease model-induced neurodegeneration	brain	20 mg/kg	rats
Daglioglu <i>et al.</i>	2009	experimental peripheral nerve injury	sciatic nerve	50 mg/kg (x4)	rats
Sirajudeen <i>et al.</i>	2011	aflatoxin B1-induced oxidative damage	liver & plasma	40 mg/kg	chicken
Saxena <i>et al.</i>	2010	intracerebroventricular administration of streptozotocin-induced memory deficit	brain	2.5 to 10 mg/kg	rats
Sönmez <i>et al.</i>	2009	alcohol-induced oxidative stress	aorta	4 mg/kg	rats
Jou <i>et al.</i>	2010	ROS-induced mitochondrial damage	brain	100 µM	rats
Hoppe <i>et al.</i>	2010	amyloid-beta neurotoxicity	hippocampal slice	25 to 100 µM	rats

			cultures		
Guo <i>et al.</i>	2010	ischemia/reperfusion injury	N2a cells	100 µM	mice
Mukherjee <i>et al.</i>	2010	isoproterenol-induced injury	Heart	10 mg/kg	rats
Rao <i>et al.</i>	2010	mercury-exerted neurotoxicity	Brain	5 mg/kg	rats
Lekic <i>et al.</i>	2010	intracerebral hemorrhage-induced damages	Brain	5 mg/kg	rats
Oliveira <i>et al.</i>	2010	Trypanosoma cruzi infection	Serum	5 mg/kg	rats
Wang <i>et al.</i>	2011	ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunction	isolated muscle	10 mg/kg	rats
Tripathi & Jena	2010	cyclophosphamide-induced injury	Bladder	10 mg/kg	rats
Dominguez-Rebolledo <i>et al.</i>	2010	thawing-induced fragility	Sperm	0.1 to 1 mM	rein deer
Ganguly <i>et al.</i>	2010	indomethacin-induced gastric ulcer	Stomach	80 mg/kg	mice
Aranda <i>et al.</i>	2010	carbon tetrachloride toxicity	Liver	10 mg/kg	rats
Romero <i>et al.</i>	2010	rotenone and oligomycin-A -induced oxidative stress	SH-SY5Y neuroblastoma cells	0.3-10 nM	human cells
Aydemir <i>et al.</i>	2010	adriamycin-induced toxicity	Heart	5mg/kg	rats
Patel <i>et al.</i>	2010	isoproterenol-induced infarction	Heart	10 mg/kg	rats
Pant & Rao	2010	arsenic and fluoride-induced genotoxicity	peripheral blood cell culture	0.2 mM	human
Ozturk <i>et al.</i>	2011	doxorubicin- and trastuzumab-induced toxicity	Heart	10 mg/kg (x2)	rats
Negi <i>et al.</i>	2011	diabetic neuropathy-induced neuroinflammation and oxidative stress	Nerves	3 to 10 mg/kg	rats
Zhao <i>et al.</i>	2011	cryopreservation	Callus	100 nM	<i>Rhodiola crenulata</i>
Jaworek <i>et al.</i>	2010	caerulein-induced pancreatitis	Pancreas	5 to 25 mg/kg	rats
Han <i>et al.</i>	2011	injury-evoked nitrosative stress	endothelial cells	10 µM	human cells
Ionov <i>et al.</i>	2011	beta-amyloid neurotoxicity	neuron and astrocytes mixed cultures	50 µM	rats
Jou	2011	mitochondrial Ca(2+) stress in astrocyte	Astrocytes	100 µM	rat cells
Espino <i>et al.</i>	2011	intracellular calcium overload-induced apoptosis	Leukocytes	1 mM	human cells
Dayoub <i>et al.</i>	2011	endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide	endothelial cells	100 µM	human cells
Anjum <i>et al.</i>	2011	bisphenol A-induced biochemical toxicity	Testis	10 mg/kg	mouse
Zhou <i>et al.</i>	2012	rotenone-induced cell injury	HeLa cells	250 µM	human cells
Wang <i>et al.</i>	2011	Huntingtin-mediated toxicity	neuronal cells	5 µM	rats
Singh <i>et al.</i>	2011	experimental reflux	Esophagus	20 to 40 mg/kg	mice
Ono <i>et al.</i>	2012	α-synuclein cytotoxicity	neuronal cells	25 to 2500 µM	in vitro
Shirazi <i>et al.</i>	2013	irradiation-induced oxidative damage	blood cells	10 mg/kg	rats
Fu <i>et al.</i>	2012	apoptosis	retinal pigment epithelial cells	0.1 to 100 µM	human cells
Celinski <i>et al.</i>	2011	Helicobacter pylori infection-induced ulcers	stomach & duodenum	5 mg (x2)	Human
Sönmez <i>et al.</i>	2012	alcohol-induced oxidative stress	Kidney	4 mg/kg	rats
Kunak <i>et al.</i>	2012	mechlorethamine-induced toxicity	Kidney	100 mg/kg	rats
Arguelles <i>et al.</i>	2012	lipid peroxidation-induced elongation factor-2 decline	HeLa cells	10 to 50 µM	human cells
Cheshchevik <i>et al.</i>	2012	carbon tetrachloride-induced intoxication	Liver	10 mg/kg (x30)	rats
Qin <i>et al.</i>	2012	IL1β-induced MMP9 expression	endothelial cells	10 µM	human cells
Ganguly <i>et al.</i>	2012	Chronic indomethacin ulceration-induced MMP-3 and MMP-9 augmentation	gastric tissues	40 mg/kg	mice
Mukherjee <i>et al.</i>	2012	isoproterenol-induced alterations	Heart	10 mg/kg	rats
Bekyarova <i>et al.</i>	2012	burn-induced injury	Liver	10mg/kg	rats
Yip <i>et al.</i>	2013	stem cell therapy for acute lung ischemia-reperfusion injury	Lung	20 & 50 (x2) mg/kg	rats
Ali <i>et al.</i>	2012	Hypoxia	Liver	10 mg/kg	rats
Kireev <i>et al.</i>	2013	ischemia/reperfusion-induced cellular injury	Liver	10 mg/kg	rats
Canonico <i>et al.</i>	2013	UVB-exposed-induced mitochondrial injuries	U937 cells	1 mM	human cells
Espino <i>et al.</i>	2013	TNF-α-induced apoptosis	Leukocytes	1 mM	human cells
Yawno <i>et al.</i>	2013	hypoxia-induced fetal insult	Brain	2 mg	sheep
Ferreira <i>et al.</i>	2013	cyclophosphamide-induced DNA damage	bone marrow cells	1 mg/kg (x15)	rats
Konturek <i>et al.</i>	2013	reflux esophagitis	esophagus	20 mg/kg	rats
Bai <i>et al.</i>	2013	apoptosis-induced insults	lens	10 nM to 10 µM	humans
Zasada <i>et al.</i>	2013	nitrobenzene-induced lipid peroxidation	thyroid	1 nM to 7.5 mM	pigs

Lee <i>et al.</i>	2014	sarcopenia (indirect)	muscles	natural levels	humans
Yang <i>et al.</i>	2013	ischemia/reperfusion injury	isolated heart	5 μ M	rats
Sayyed <i>et al.</i>	2013	inflammation-related disorders	gastrointestinal tract	10 mg/kg (x 15)	rats
Chen <i>et al.</i>	2014	subarachnoid hemorrhage-induced injury	brain	150 mg/kg	rats
Karamian <i>et al.</i>	2013	diazinon-induced genotoxicity	lymphocytes	100 to 400 μ M	human cells
Drury <i>et al.</i>	2014	Asphyxia	several organs	0.1 mg/kg (x 8)	sheep
Macit <i>et al.</i>	2013	nitrogen mustard-induced toxicity	lung	100 mg/kg	rats
Hrenak <i>et al.</i>	2013	doxorubicin-induced toxicity	kidneys	10 mg/kg (x28)	rats
Parada <i>et al.</i>	2014	ischemia-induced oxidative stress	hippocambal cultures	0.1 to 10 μ M	mice
Pinato <i>et al.</i>	2013	intracerebroventricular LPS-induced acute neuroinflammation	brain	natural concentration	rats
Katkar <i>et al.</i>	2014	Echis carinatus venom-induced toxicities	whole animals	200 mg/kg	mice
San-Miguel <i>et al.</i>	2014	rabbit hemorrhagic disease virus-induced failure	liver	20 mg/kg (x3)	rabbits
Wong <i>et al.</i>	2014	systemic lipopolysaccharide-induced injury	brain	20 mg/kg	rats
Shokrzadeh <i>et al.</i>	2014	cyclophosphamide-induced DNA damage	bone marrow cells	2.5 to 20 mg/kg	mice
Tare <i>et al.</i>	2014	intrauterine growth restriction	heart and blood vessels	0.25 to 2 mg/h	sheep
Zayachkivska <i>et al.</i>	2014	gastroesophageal reflux disease	esophagus	20 mg/kg	rats
Kashani <i>et al.</i>	2014	multiple sclerosis-induced mitochondrial injury	neurons	5 mg/kg	mice
de Souza <i>et al.</i>	2014	ischemia/reperfusion	kidneys	50 mg/kg	rats
Tain <i>et al.</i>	2014	maternal fructose intake-induced programmed hypertension	kidneys	0.01% ...	rats
Sehajpal <i>et al.</i>	2014	acute kidney injury	kidneys	4 to 10 mg/kg	rats
Yu <i>et al.</i>	2014	ischemia/reperfusion injury	heart	10 mg/kg (x7)	rats
Wu <i>et al.</i>	2014	dexamethasone induced programmed hypertension		0.01%	rats
Song <i>et al.</i>	2014	reperfusion-induced injury	brain endothelial cells	1 to 100 nM	murine cells
Chen <i>et al.</i>	2014	cyclophosphamide-induced acute interstitial cystitis	bladder	20 to 50 mg/kg	rats
Alp <i>et al.</i>	2014	procarbazine induced toxicity	testis	10 mg/kg	rats
Guo <i>et al.</i>	2014	cadmium-induced toxicity	HepG2	500 nM	human cells
Chen <i>et al.</i>	2014	inflammatory response-induced edema	brain	150 mg/kg	rats
Yang <i>et al.</i>	2015	ischemic-stroke induced mitochondrial dysfunction	brain	10 mg/kg	mice
Mihandoost <i>et al.</i>	2014	lethal-whole-body gamma radiation	whole body	100 mg/kg	rats
Yang <i>et al.</i>	2014	intestinal ischemia-reperfusion-induced injury	lung	5 to 25 mg/kg	rats
Liu <i>et al.</i>	2014	ischemia-reperfusion induced damage	heart	2.5 to 10 mg/kg	rats
Abdel Moneim <i>et al.</i>	2014	Egyptian cobra crude venom-induced oxidative damage	different organs	10 mg/kg	rats
Tan <i>et al.</i>	2014	acid treatment-induced esophageal enhanced permeability	Het-1A cells	10 μ M	human cells
Trivedi <i>et al.</i>	2015	colitis-associated carcinogenesis	colon	1 mg/kg (x 42 and 126)	mice

Variation de l'expression génique au cours de l'hibernation du hamster d'Europe : un rôle des récepteurs à la mélatonine ?

Résumé

Afin de faire face aux conditions environnementales défavorables, certains animaux réduisent drastiquement leur activité métabolique et leur température grâce à des phases de torpeur hivernal. L'objectif de cette étude est d'établir une signature moléculaire de chacune des phases d'hibernation. Pour cela, les variations d'expression de 21 gènes impliqués dans le contrôle des fonctions saisonnières (horloge circadienne, hormones thyroïdiennes, récepteurs à la mélatonine) et le métabolisme ont été étudiées dans 8 organes. Les résultats ont mis en évidence une augmentation ubiquitaire de l'expression des gènes *Périodes* indiquant un possible réajustement de l'horloge au début de la phase de réveil. Ainsi qu'une régulation spécifique des déiodinases induisant une augmentation de la synthèse de thyroxine dans le tissu adipeux brun et l'hypothalamus pendant la torpeur et le réveil.

Le récepteur MT2 du hamster d'Europe a été partiellement caractérisé génétiquement et pharmacologiquement. A la différence d'autres espèces de hamster dont le récepteur MT2 est tronqué, le récepteur étudié semble être fonctionnel pour la mélatonine et pourrait être critique durant l'hibernation.

Variation expression génique - Digital droplet PCR - Hibernation - *Cricetus cricetus* - Récepteurs mélatonine

Abstract

Living in the wild involves to cope with a variable seasonal environment availability. When winter is coming, animals use various strategies to adapt to hostile environment by limiting energy expenditure such as hibernation. In this study, expression of 21 selected genes was compared at different states of the hibernation cycle of the true hibernator European hamster. Level of mRNA encoding proteins involved in seasonal timing (melatonin receptors, thyroid metabolism, clock) and energy homeostasis were measured by digital droplet PCR in eight central and peripheral organs. During the arousal phase, *Periods* genes expression is increased in all organs indicating a possible resetting of body's clocks at the beginning of the active period. The brown adipose tissue displays a specific regulation of deiodinases leading to increased synthesis of thyroxine during both torpor and arousal.

The melatonin receptor MT2 of the European hamster had been partially cloned and pharmacologically characterized. While in most hamster species, MT2 is a natural knock out, the studied receptor seems to be functional and could be critical during hibernation.

Gene expression - Digital droplet PCR - Hibernation - *Cricetus cricetus* - Melatonin receptors