



HAL
open science

Réponse à la lumière de l'horloge rétinienne : photorécepteurs et mécanismes moléculaires mis en jeu

Hugo Calligaro

► **To cite this version:**

Hugo Calligaro. Réponse à la lumière de l'horloge rétinienne : photorécepteurs et mécanismes moléculaires mis en jeu. Neurosciences. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1053 . tel-01871942

HAL Id: tel-01871942

<https://theses.hal.science/tel-01871942>

Submitted on 11 Sep 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.



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1053

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 476
Neurosciences et Cognition

Spécialité de doctorat : Neurosciences

Soutenue publiquement le 06/04/2018, par :
HUGO CALLIGARO

**Réponse à la lumière de l'horloge rétinienne :
photorécepteurs et mécanismes moléculaires
mis en jeu**

Devant le jury composé de :

HICKS DAVID, DR, CNRS UPR3212, Strasbourg
KLARSFELD ANDRÉ, Professeur, ESPCI, Paris
DELETTRE CÉCILE, CR1, INSERM U1051, Montpellier
TILIKETE CAROLINE, PU-PH, INSERM U1028, Bron
DKHISSI-BENYAHYA OURIA, CR1, INSERM U1208, Bron

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Cette thèse a été préparée au

Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U1208

18 avenue Doyen Lépine
69675 Bron cedex - France

 +33 (0)4 72 91 34 75
 +33 (0)4 72 91 34 61
 u1208@inserm.fr
Site <http://www.sbri.fr>



Science is nothing but a series of
questions that lead to more questions.

Terry PRATCHETT (The Longue Earth)

All models are wrong but some are
useful.

George E. P. Box

RÉPONSE À LA LUMIÈRE DES HORLOGES RÉTINIENNES : PHOTORÉCEPTEURS ET MÉCANISMES MOLÉCULAIRES MIS EN JEU**Résumé**

La rétine contient une horloge endogène régulant différentes fonctions rythmiques et participae à la synchronisation de l'horloge centrale du SCN au temps géophysique. Cette synchronisation met en jeu les bâtonnets, les cônes et les cellules à mélanopsine. Contrairement au SCN, le rôle des photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne est controversé. Nos travaux et ceux d'autres équipes soutiennent un rôle de la mélanopsine alors que 2 études récentes suggèrent que seule la neuropsine est impliquée. Mon projet vise à disséquer le rôle des différents photorécepteurs par des approches *in vitro/ex vivo* chez des souris sauvages, *Per2^{Luc}* et/ou déficientes en photorécepteurs.

Des lumières monochromatiques ciblant différents photorécepteurs ont été appliquées à des explants rétiniens en culture de souris *Per2^{Luc}* ou déficientes en mélanopsine, cônes MW ou bâtonnets. Nos résultats montrent un rôle des bâtonnets dans le décalage de phase de l'horloge rétinienne par la lumière dans le spectre visible et une contribution additionnelle des cônes SW et/ou de la neuropsine dans l'UV. L'horloge rétinienne étant composée de plusieurs horloges et afin de déterminer leur réponse à la lumière, l'induction photique des gènes *Per1-Per2* et *C-Fos* a été analysée dans les couches rétiniennes isolées chez des souris sauvages et déficientes en photorécepteurs. Chez les souris sans mélanopsine ou cônes MW, l'induction de *Per1-Per2* est abolie dans toutes les couches, suggérant un rôle de ces photorécepteurs.

En résumé, nos résultats indiquent un rôle différentiel des photorécepteurs en fonction de la réponse mesurée (décalage de phase de *PER2::Luc* et induction des gènes de l'horloge par la lumière).

Mots clés : rétine ; horloge circadienne ; photoréception ; lumière ; bâtonnet

LIGHT RESPONSE OF THE RETINAL CLOCKS: PHOTORECEPTORS AND MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED**Abstract**

The mammalian retina contains an endogenous pacemaker regulating retinal physiology and participate to the sybchronization of the temporal phase of the central clock of the SCN to environmental time. This entrainment process involves rods, cones and melanopsin-containing retinal ganglion cells. In contrast with the SCN, the role of these photoreceptors in the light response of the retinal clock is still controversial. While recent studies suggest that none of them is involved in light response of the retinal clock, others support a role for melanopsin. My project aims to dissect the role of these different photoreceptors in wild-type, *Per2^{Luc}* and/or photoreceptor-deficient mice using *in vitro/ex vivo* approaches.

Monochromatic lights targeting different photoreceptors were applied to retinal explants of *Per2^{Luc}* or melanopsin-, MW cones- or rods-deficient mice. Our results demonstrate that rods are required for the light-induced phase shift of the retinal clock in the visible spectrum and suggest an additional contribution of SW cones and/or neuropsin in the UV. As the retinal clock is composed of several clocks and in order to determine their response to light, the photic induction of *Per1-Per2* and *C-Fos* genes was analyzed in isolated retinal layers from wild-type and photoreceptor-deficient mice. In mice without melanopsin or MW cones, *Per1-Per2* induction by light is abolished in all layers, suggesting a role for these photoreceptors.

In summary, our results propose a differential contribution of the retinal photoreceptors as a function of the response recorded (phase shift of *PER2::Luc* or induction of clock genes by light).

Keywords: retina; circadian clock; photoreception; light ; rod

Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U1208

18 avenue Doyen Lépine – 69675 Bron cedex - France –

Sommaire

Résumé	ix
Sommaire	xi
Avant-Propos	xv
Acronymes	xvii
Table des figures	xix
Liste des tableaux	xxi
1 Le système circadien	1
1.1 Rythmes circadiens : unités d'organisation de la vie physiologique	1
1.1.1 Historique	1
1.1.2 Définitions et lexique du système circadien	2
1.2 Le système circadien des mammifères	5
1.2.1 Fonctionnement moléculaire des horloges circadiennes	5
1.2.1.1 Découverte des gènes de l'horloge	5
1.2.1.2 Les boucles positive CLOCK / BMAL1 et négative PER / CRY	7
1.2.1.3 Les boucles secondaires : REV-ERB et ROR	9
1.2.1.4 Autres acteurs de régulation	9
1.2.2 L'organisation du système circadien	10
1.2.2.1 L'horloge centrale	10
1.2.2.2 Un réseau d'horloges	12
2 L'horloge de la rétine	17
2.1 Anatomie de la rétine	17
2.1.1 Anatomie générale	17
2.1.2 La couche des photorécepteurs	18
2.1.2.1 Les bâtonnets	18
2.1.2.2 Les cônes	18
2.1.3 La couche nucléaire interne	20

2.1.3.1	Les cellules bipolaires	20
2.1.3.2	Les cellules horizontales	20
2.1.3.3	Les cellules amacrines	20
2.1.4	La couche des cellules ganglionnaires	21
2.1.4.1	Les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles	22
2.1.5	Les cellules gliales et épithéliales	23
2.1.5.1	Les cellules de Müller	23
2.1.5.2	L'épithélium pigmentaire	23
2.2	Horloge rétinienne	24
2.2.1	Découverte de l'horloge rétinienne	24
2.2.2	Des activités rythmiques dans la rétine	24
2.2.3	Une horloge ou des horloges rétiniennes?	26
2.2.4	Couplage des horloges rétiniennes	28
2.2.5	Effet de la délétion de gènes de l'horloge	30
2.2.6	Maladies rétiniennes et lien avec l'horloge rétinienne	31
2.3	Réponse à la lumière de la rétine	32
2.3.1	Réception de l'information lumineuse	32
2.3.1.1	Opsines et sensibilité spectrale	32
2.3.1.2	Phototransduction au sein des bâtonnets et des cônes	33
2.3.1.3	Phototransduction des ipRGCs	34
2.3.2	Transmission de l'information lumineuse par les cônes et les bâtonnets	36
2.3.3	Transmission de l'information lumineuse par les ipRGCs	38
2.4	Entraînement et réponse à la lumière des horloges centrale et rétinienne	39
2.4.1	Horloge centrale	39
2.4.2	Horloge rétinienne	41
2.4.2.1	La lumière comme synchronisateur de l'horloge rétinienne	41
2.4.2.2	Rôles des photorécepteurs	44
3	Objectifs et stratégies expérimentales	47
3.1	Objectifs de la thèse	47
3.2	Stratégies expérimentales	49
3.2.1	Approche <i>in vitro</i> : intérêt de la bioluminescence	49
3.2.1.1	La souris <i>Per2^{Luc}</i>	49
3.2.1.2	Intérêt du modèle	49
3.2.1.3	Mesure de bioluminescence dans la rétine	50
3.2.2	Approche <i>in vivo</i> : intérêt de la microdissection des différentes couches de la rétine	51
3.2.3	Stimulations lumineuses monochromatiques	52
3.2.4	Modèles murins dépourvus de photorécepteurs	53
3.2.5	Développement de nouveaux modèles murins	56

4	Matériels et Méthodes	57
4.1	Animaux	57
4.1.1	Hébergement	57
4.1.2	Génotypage	57
4.1.3	Activité luciférase	58
4.1.4	Prélèvement de rétine pour la biologie moléculaire	59
4.2	Approche <i>in vitro</i> : analyse de l'horloge rétinienne par bioluminescence	59
4.2.1	Culture des explants rétiniens	59
4.2.2	Stimulations mécaniques et lumineuses des explants rétiniens .	60
4.2.3	Analyses	63
4.2.3.1	Oscillations de PER2 : :Luc	63
4.2.3.2	Détermination du temps biologique de l'horloge rétinienne <i>in vitro</i>	63
4.2.3.3	Décalage de phase de l'oscillation de PER2 : :Luc	63
4.2.3.4	Modélisation	65
4.3	Approche <i>in vivo</i> : analyse de la réponse à la lumière des horloges rétiniennes	66
4.3.1	Activité locomotrice	66
4.3.2	Stimulations lumineuses <i>in vivo</i>	66
4.3.3	Microdissection laser	67
4.4	Biologie moléculaire	67
4.4.1	Extraction des ARN totaux	67
4.4.2	Transcription inverse des ARN totaux	68
4.4.3	Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel	68
4.5	Histologie	69
4.6	Analyses statistiques	70
5	Résultats	71
5.1	Développement d'un protocole standardisé de culture d'explants de rétines	71
5.1.1	Effet du renouvellement de milieu de culture des explants sur la phase d'expression de PER2 : :Luc	71
5.1.2	Effets des déplacements mécaniques des explants rétiniens sur la phase de l'horloge rétinienne	72
5.2	Rôle des bâtonnets dans le décalage de phase par la lumière de l'horloge rétinienne	76
5.3	Induction par la lumière des gènes de l'horloge dans les oscillateurs rétiniens	102
5.3.1	Induction de <i>Per1</i> , <i>Per2</i> et <i>C-Fos</i> par la lumière visible chez les souris WT et photorécepteurs-déficientes	102
5.3.2	Induction de <i>Per1-Per2</i> et <i>C-Fos</i> par la lumière UV chez les souris WT	104

6	Discussion	107
6.1	Développement d'un protocole standardisé de culture d'explants rétiniens	107
6.1.1	Effet du déplacement des boîtes de culture sur la phase de PER2::Luc	109
6.2	Réponse globale de l'horloge rétinienne à lumière	111
6.2.1	Sensibilité à la lumière de l'horloge rétinienne	111
6.2.2	Rôle des photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'hor- loge rétinienne	113
6.2.3	Effet de l'absence d'un photopigment sur la période endogène de la rétine	116
6.3	Réponse des horloges rétiniennes à la lumière	118
7	Conclusions et perspectives	121
	Bibliographie	125
	Annexe 2 : Curriculum vitae	163

Avant-Propos

Dans ce manuscrit, j'ai choisi de conserver les abréviations anglaises qui sont les plus couramment utilisées et qui permettent d'être homogène avec les résultats présentés sous forme d'article en anglais.

Acronymes

A

ADNc ADN complémentaire
AMP adénosine mono-phosphate
ARNm ARN messenger
ATP adénosine tri-phosphate
AVP arginine-vasopressine

B

bHLH *basic Helix-Loop-Helix*
Bmal1 *brain and muscle arnt like 1*

C

CCG *Clock Controlled Genes*
Clock *circadian locomotor output cycles kaput*
CO₂ dioxyde de carbone
Cry *cryptochrom*
CT *circadian time*

D

DA dopamine
DC *dark control*
DD obscurité constante
DM dorsomédiale
dNTP désoxyribonucléotides
DTT dithiothréitol

E

EDTA éthylène diamine tétra-acétique

ERG électrorétinogramme

G

GCL *ganglion cell layer*
GRP *gastrin-releasing peptide*

I

INL *inner nuclear layer*
IPL *inner plexiform layer*
ipRGCs *intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells*

K

KI *knockin*
KO *knockout*

L

LL lumière constante

M

MW *middle-wavelength*

O

O₂ dioxygène
ONL *outer nuclear layer*
OPL *outer plexiform layer*

P

PAS *Period circadian protein - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein - Single-minded protein*
Per *Period*
PMT tubes photomultiplicateurs
Ppi pyrophosphate
PRC *phase response curve*

R

Reverb *reverse viral erythroblastis oncogene product*
RHT tractus rétino-hypothalamique

ROR <i>retinoic acid-related orphan receptor</i>	U
RORE <i>ROR responding element</i>	UV <i>ultra-violette</i>
RPE <i>épithélium pigmentaire</i>	V
RT-qPCR <i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>	VIP <i>vasoactive intestinal peptide</i>
S	VL <i>ventrolatérale</i>
SCN <i>noyau suprachiasmatique</i>	W
SW <i>short-wavelength</i>	WT <i>Wild-Type</i>
T	Z
Th <i>tyrosine hydroxylase</i>	ZT <i>zeitgeber time</i>

Table des figures

1.1	Paramètres d'un rythme biologique	3
1.2	Entraînement, libre cours et décalage de phase du rythme d'activité locomotrice d'une souris	5
1.3	Courbe de réponse de phase à la lumière du rythme de l'activité locomotrice chez un rongeur nocturne	6
1.4	Modèle du fonctionnement moléculaire de l'horloge circadienne de mammifère, basé sur des boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles positives et négatives	8
1.5	Représentation schématique des voies de synchronisation du système circadien	14
2.1	Anatomie de la rétine et des photorécepteurs chez la souris	19
2.2	Libération de mélatonine et entraînement par la lumière d'explants de rétines en culture	25
2.3	Enregistrement de l'expression de PER2::Luc dans un explant de rétine entière et dans les couches isolées	29
2.4	Sensibilité spectrale des différentes opsines de la rétine de souris	33
2.5	Schéma récapitulatif des voies de recyclage du <i>11-cis-retinal</i>	35
2.6	Circuits de transmission de l'information lumineuse des cônes, bâtonnets et ipRGCs	37
2.7	Modèle de contribution des photorécepteurs rétiniens dans la réponse à la lumière de l'horloge centrale du SCN à différents niveaux de lumière.	42
2.8	Induction d'un décalage de phase de l'horloge rétinienne par la lumière	43
2.9	Entraînement de l'horloge rétinienne par un cycle 9L/15D de lumière blanche	46
3.1	Représentation schématique du transgène de la lignée <i>Per2^{Luc}</i>	49
3.2	Équation de la réaction de bioluminescence	50
3.3	Exemple d'enregistrement de bioluminescence d'un explant rétinien de souris <i>Per2^{Luc}</i> sans changement de milieu	51
3.4	Voies de différenciation des progéniteurs en photorécepteurs de type cône et bâtonnet	55

4.1	Protocole de culture des explants rétiniens pour les expériences de bioluminescence	60
4.2	Dispositif de stimulation lumineuse des explants rétiniens	62
4.3	Fenêtre d'analyse des oscillations de PER2 : :Luc (Lumicycle Analysis)	64
4.4	Calcul du décalage de phase d'expression de PER2 : :Luc après une stimulation	65
5.1	Effet du renouvellement de milieu sur la phase et la période des oscillations de PER2 : :Luc après 4, 8, 9 et 10 jours de culture	73
5.2	Système initial de stimulation, placé hors du Lumicycle	74
5.3	Décalage de la phase de PER2 : :Luc en réponse à une stimulation lumineuse en fonction du CT	75
5.4	Effet du déplacement des boîtes de culture sur la phase d'expression de PER2 : :Luc	76
5.5	Evaluation par RT-PCR de la contamination des différentes couches nucléaires microdissequées chez les souris WT et déficientes en photorécepteurs	103
5.6	Induction par la lumière des gènes de l'horloge <i>Per1</i> et <i>Per2</i> , et de <i>C-Fos</i> dans les différentes couches de la rétine isolées par microdissection au laser	105
5.7	Induction de <i>Per1</i> , <i>Per2</i> et <i>C-Fos</i> après une stimulation par la lumière UV dans les différentes couches de la rétine	106
6.1	Sensibilités à la lumière de l'horloge centrale et de l'horloge rétinienne	112
6.2	Modèle décrivant les circuits utilisés par les bâtonnets pour l'entraînement par la lumière de l'horloge centrale du SCN selon le niveau de luminosité	115
6.3	Schéma récapitulatif des contributions des photorécepteurs rétiniens dans l'induction d'un décalage de phase de l'horloge centrale du SCN et de l'horloge rétinienne	117
6.4	Récapitulatif de l'induction de gènes dans les différentes couches de la rétine après une stimulation lumineuse	120

Liste des tableaux

4.1	Séquences des amorces, températures d'hybridation et concentrations de MgCl ₂ utilisées pour le génotypage des souris transgéniques	58
4.2	Concentrations des composés additionnés aux milieux de culture	61
4.3	Séquences des couples d'amorces utilisés en RT-qPCR en temps réel.	69

Le système circadien

1.1 Rythmes circadiens : unités d'organisation de la vie physiologique

1.1.1 Historique

La vaste majorité des organismes présents sur notre planète est soumise à des variations cycliques de nombreux paramètres de l'environnement (niveau de lumière, température...). Dès l'antiquité, les premières activités rythmiques ont été observées chez certaines plantes qui déployaient et fermaient leurs feuilles et fleurs selon le lever et le coucher du soleil. Les heures auxquelles l'ouverture et la fermeture des fleurs étant spécifiques à une espèce donnée, le naturaliste suédois Carl von Linné développa en 1751 une « horloge florale » permettant de déduire l'heure de la journée en fonction du comportement de plusieurs espèces florales.

Quelques décennies plus tôt, en 1729, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan, astronome français, avait constaté que ces mouvements n'étaient pas de simples réponses passives à la lumière de l'environnement. Il réalisa la première expérience de chronobiologie documentée, en plaçant à l'obscurité constante, un plant de *Mimosa pudica* et en observant que l'ouverture et la fermeture de ses feuilles persistaient en l'absence d'informations temporelles (D'Ortous de Mairan 1729). Ce résultat révéla le caractère endogène de cette rythmicité, avec une périodicité proche de 24 heures.

Charles Darwin consacra un de ses derniers ouvrages aux mouvements des feuilles des plantes qu'il décrivit en détail et suggéra que les caractéristiques de ces mouvements devaient être liées à l'hérédité (Darwin et Darwin 1880). Cet aspect fut démontré un

demi-siècle plus tard par l'étude de plants de haricot. Erwin Bünning montra, en effet, que différents plants présentaient une période propre de rythmicité des mouvements des feuilles. Le croisement de deux plants ayant des périodes endogènes distinctes conduisait à des descendants possédant une période endogène intermédiaire (Bünning 1932, 1935).

Au cours du XXe siècle, des rythmes journaliers furent identifiés chez de nombreuses espèces de tous les domaines du vivant (bactéries, champignons, plantes, animaux, etc.). Les connaissances accumulées finirent par être généralisées en 1960 à l'initiative de Jürgen Aschoff et Colin Pittendrigh lors d'une conférence entièrement consacrée aux « horloges biologiques » (Pittendrigh 1960) et qui donna naissance à une nouvelle discipline : la biologie des rythmes.

1.1.2 Définitions et lexique du système circadien

La biologie des rythmes, ou chronobiologie, est la branche de la biologie s'intéressant aux rythmes biologiques. Un rythme biologique est caractérisé par plusieurs paramètres (Figure 1.1).

- La **phase** est le temps auquel survient un élément de l'oscillation. Par exemple, l'acrophase (ou pic) correspond au temps auquel la valeur maximale de la variable biologique mesurée est observée. De même, la bathyphase (ou creux) correspond au temps auquel la valeur minimale est observée.
- La **période** correspond à l'intervalle de temps mesuré entre deux épisodes identiques qui se reproduisent au cours de l'oscillation, par exemple entre deux acrophases. Différents rythmes sont définis selon leur période endogène appelée tau (τ). Les rythmes dits « circadiens » (du grec *circa* « environ » et *diem* « jour ») correspondent aux rythmes dont la période est proche de 24 h, comprise entre 20 et 28 h. Les rythmes dits « ultradiens » ont des périodes plus courtes (<20 h). C'est le cas, par exemple, des battements cardiaques ou des cycles de sommeil. Les rythmes « infradiens » correspondent aux rythmes dont la période varie de plusieurs jours à plusieurs mois comme la migration, la reproduction ou l'hibernation.
- Le **mesor** est la moyenne arithmétique de toutes les valeurs instantanées équidistantes d'une variable, obtenues au cours d'une période.
- L'**amplitude** est la différence entre le maximum et le niveau moyen.

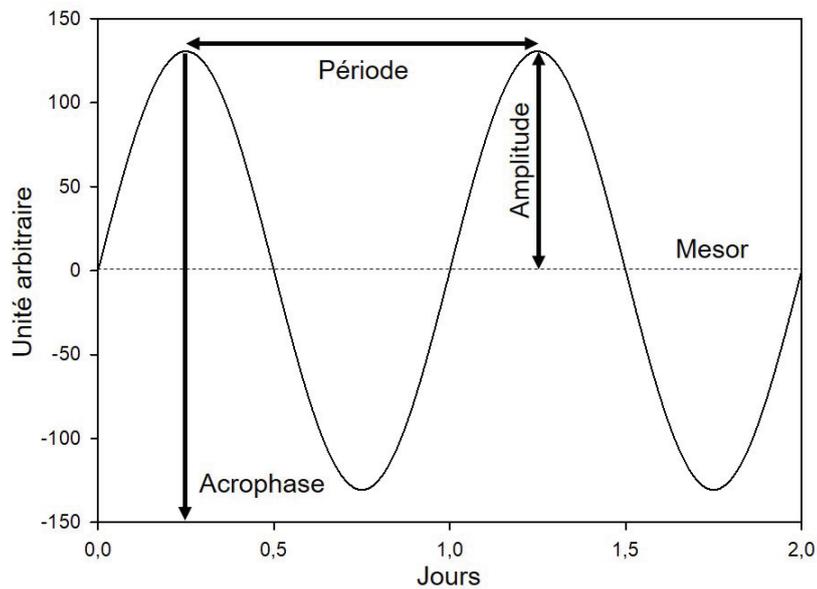


FIGURE 1.1 – Paramètres d'un rythme biologique

Dans ce mémoire, je me concentrerai sur les rythmes circadiens qui sont caractérisés par trois propriétés principales :

1. Ils sont générés par une horloge endogène dont le fonctionnement rythmique perdure en absence de facteurs externes tels que les variations de lumière ou de température.
2. Ils sont entraînés par des stimuli externes ou internes. Leur période endogène est alors synchronisée ou entraînée à la période imposée par des facteurs environnementaux, permettant une adaptation aux variations de l'environnement. Les facteurs pouvant entraîner une horloge sont appelés *Zeitgeber* (de l'allemand « donneur de temps »). Le principal *Zeitgeber* chez les mammifères est la lumière (cycle jour/nuit).
3. Ils doivent répondre au critère de compensation thermique qui permet d'éviter que les variations de la température extérieure modifient la vitesse de fonctionnement des mécanismes de l'horloge.

L'étude des horloges circadiennes nécessite de se placer dans des conditions constantes. Chez les rongeurs, l'un des rythmes circadiens le plus étudié est celui de l'activité

locomotrice qui présente une alternance entre une phase de repos et une phase d'activité au cours d'un nycthémère (un cycle jour/nuit).

L'enregistrement de l'activité locomotrice d'animaux nocturnes, par exemple la souris, montre que dans un environnement lumineux cyclique (12 heures de lumière (L) suivi de 12 heures d'obscurité (D) ou cycle 12L/12D), le rythme de l'activité locomotrice présente une période d'exactly 24 h. Les animaux sont inactifs à l'allumage de la lumière (temps *zeitgeber time* (ZT) 0) et deviennent actifs à l'extinction de la lumière (ZT12). Ainsi, en condition 12L/12D, le rythme de l'activité locomotrice est remis à l'heure chaque jour par les variations de l'environnement afin d'assurer une synchronisation exacte de ce rythme avec les cycles extérieurs de 24 h (**Figure 1.2**). On parle d'entraînement ou de synchronisation par la lumière du rythme de l'activité locomotrice. Lorsque les souris sont ensuite placées en obscurité constante (DD) ou en lumière constante (LL), elles ne disposent plus des repères temporels de leur environnement. Cependant, l'activité locomotrice demeure rythmique (rythmes en libre-cours ou *free-run*) démontrant l'existence d'une horloge endogène. Dans ces conditions, on parle de temps circadien ou *circadian time* (CT), le début de l'activité locomotrice correspondant à CT12. La phase de repos de l'animal correspond alors au jour biologique (jour subjectif) et la phase d'activité à la nuit biologique (nuit subjective). Ainsi, en l'absence de signal temporel externe, l'horloge biologique exprime sa rythmicité endogène d'une période proche de 24 h. Chez la souris, la période endogène de ce rythme est en moyenne légèrement inférieure à 24 h (**Figure 1.2**).

L'adaptation d'un organisme à un nouvel environnement lumineux, se traduisant par des modifications comportementales, dépend du moment auquel le rongeur est exposé à la lumière. Une exposition lumineuse qui a lieu en début de nuit biologique, va entraîner un retard de phase, c'est-à-dire que les jours suivants, l'activité locomotrice commencera plus tard (**Figure 1.3B**). À l'inverse, appliqué en fin de nuit biologique, le stimulus lumineux entraîne une avance de phase, l'activité locomotrice commencera plus tôt pendant les jours suivants (**Figure 1.3C**). Enfin, si le stimulus lumineux a lieu pendant le jour biologique, peu d'effet est observé (**Figure 1.3A**). Les différents déphasages observés en fonction de l'heure d'exposition à des stimulations lumineuses permettent de définir une courbe de réponse de phase ou *phase response curve* (PRC) à la lumière (**Figure 1.3**). Les déphasages comportementaux provoqués par la lumière vont permettre aux horloges biologiques de s'adapter aux variations des facteurs externes, comme dans le cas d'un changement de fuseau horaire qui entraîne un déphasage entre l'heure réelle et l'heure biologique.

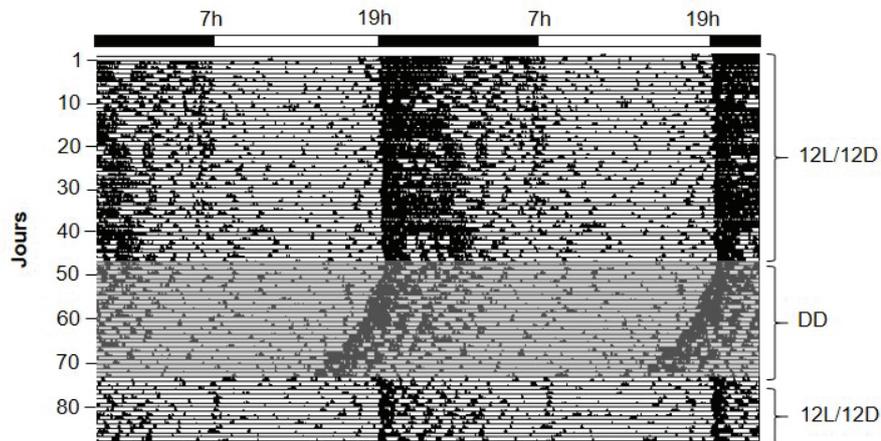


FIGURE 1.2 – **Entraînement, libre cours et décalage de phase du rythme d'activité locomotrice d'une souris.** Actogramme représentant l'activité locomotrice d'une souris exposée tout d'abord à un cycle 12L/12D (lumière ON à 7h et OFF à 19h) pendant 48 jours. Son rythme d'activité locomotrice est synchronisé au cycle 12L/12D avec un début d'activité qui coïncide avec l'extinction de la lumière. La souris est ensuite placée en obscurité constante (DD, rectangle grisé). Le rythme de son activité locomotrice est alors en libre cours, avec une période endogène inférieure à 24 h. Le cycle 12L/12D est ensuite rétabli. Au bout de quelques jours, le rythme d'activité locomotrice de la souris est à nouveau entraîné au cycle 12L/12D.

Cette propriété permet donc aux horloges biologiques de s'adapter aux variations des facteurs externes, comme dans le cas d'un changement de fuseau horaire qui entraîne un déphasage entre l'heure réelle et l'heure biologique.

1.2 Le système circadien des mammifères

1.2.1 Fonctionnement moléculaire des horloges circadiennes

1.2.1.1 Découverte des gènes de l'horloge

Le fonctionnement moléculaire endogène des horloges circadiennes est commun à la majorité des cellules d'un organisme et est très conservé dans les différents taxons (pour revue, voir Takahashi 2016). Ce mécanisme repose sur un système autorégulateur de boucles de rétrocontrôles transcriptionnelles et traductionnelles, impliquant une dizaine de gènes appelés gènes de l'horloge. Ces derniers codent pour des protéines de l'horloge, agissant comme des facteurs de transcription et permettant ainsi la formation de messages rythmiques sur une période d'environ 24 h (Dunlap 1999 ; Reppert 1998).

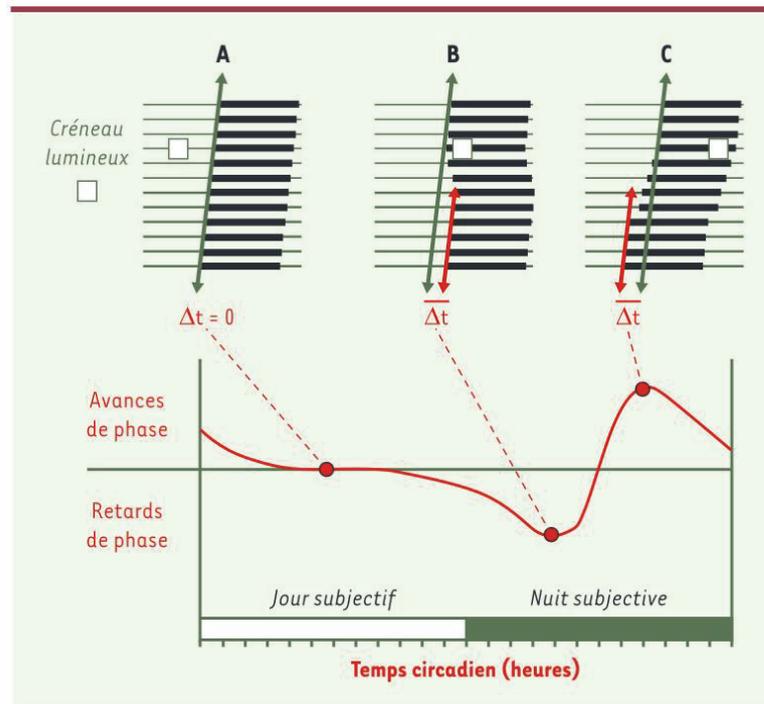


FIGURE 1.3 – **Courbe de réponse de phase à la lumière du rythme de l'activité locomotrice chez un rongeur nocturne.** La souris est placée à l'obscurité constante et est exposée à des créneaux lumineux (carré blanc). A. Lorsque le créneau lumineux a lieu pendant le jour biologique, aucun décalage de phase n'est observé (le cercle rouge représente la différence de phase ou $\Delta\tau$). B. Quand le stimulus est appliqué au début de la nuit biologique, l'activité commence plus tard et correspond à un retard de phase. C. Une exposition à la lumière, en fin de la nuit subjective entraîne les jours suivants une avance de phase du rythme de l'activité locomotrice (d'après Dardente et Cermakian 2005).

Le premier gène de l'horloge fut identifié chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) en mesurant l'activité locomotrice de drosophiles, exposées à du méthanesulfonate d'éthyle, un mutagène chimique induisant des mutations aléatoires. Trois mutants furent décrits : l'un était arythmique, un autre présentait une période endogène très réduite (19 h) et le dernier un allongement de la période (28 h). L'analyse génétique a conduit à l'identification de trois mutations différentes d'un même gène, appelé *Period* (Per), codant pour la protéine PERIOD (PER) (Konopka et Benzer 1971 ; Reddy et al. 1984).

En parallèle, deux équipes ont montré que le phénotype observé dépendait bien de la mutation du gène *Per*. En effet, le transfert du gène *Per* non-muté chez les trois mutants, restaure le phénotype sauvage (Bargiello et al. 1984 ; Zehring et al. 1984). Il a été ensuite

démontré que la quantité de la protéine PER varie au cours d'un cycle jour/nuit, ainsi qu'en obscurité constante, démontrant la rythmicité circadienne de l'expression de cette protéine (Siwicki et al. 1988) et de son ARN messager (ARNm) (Hardin et al. 1990).

Des expériences de mutagenèse et de clonage ont ainsi fait émerger un ensemble de gènes contrôlant les rythmicités circadiennes. Chez les mammifères, le premier gène de l'horloge découvert est le gène *circadian locomotor output cycles kaput (Clock)* (Vitaterna et al. 1994). Ensuite, deux homologues du gène *Per* de la drosophile ont été identifiés simultanément : *Per1* et *Per2* (Shearman et al. 1997 ; Sun et al. 1997 ; Tei et al. 1997). Par la suite, une dizaine d'autres gènes ont été décrits (*Per3*, *cryptochrom (Cry)1*, *Cry2*, *brain and muscle arnt like 1 (Bmal1)*, *reverse viral erythroblastis oncogene product (Reverb)- α* , *retinoic acid-related orphan receptor (ROR)- α ...*), qui ont permis de décrypter le mécanisme moléculaire de genèse des oscillations endogènes, basé sur deux boucles de rétrocontrôles transcriptionnelles : une boucle de régulation positive et une boucle de régulation négative (**Figure 1.4**).

1.2.1.2 Les boucles positive CLOCK / BMAL1 et négative PER / CRY

La boucle de régulation positive est constituée des gènes de l'horloge *Bmal1* et *Clock*. Leurs protéines BMAL1 et CLOCK possèdent un site de liaison protéine-protéine nommé *Period circadian protein - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein - Single-minded protein (PAS)* et peuvent former un hétérodimère. Ce dernier peut entrer dans le noyau de la cellule et se lier, grâce aux domaines *basic Helix-Loop-Helix (bHLH)*, à une séquence E-Box (CACGTG), située dans la région promotrice d'autres gènes de l'horloge (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry 1* et *Cry 2*) ainsi que des gènes contrôlés par l'horloge ou *Clock Controlled Genes (CCG)* et activer leur transcription (Gekakis 1998 ; X. Jin et al. 1999 ; Kume et al. 1999). Les CCG ne sont pas impliqués dans la genèse des oscillations endogènes mais constituent un signal de sortie vers les systèmes effecteurs pour contrôler la rythmicité de nombreuses fonctions physiologiques (X. Jin et al. 1999). Les protéines PER et CRY dont la production est activée par l'hétérodimère CLOCK/BMAL1 forment les éléments négatifs de la boucle de rétroaction. Les hétérodimères PER / CRY pénètrent dans le noyau des cellules et bloquent l'action de CLOCK / BMAL1, et vont donc inhiber leur propre transcription (Griffin et al. 1999 ; Kume et al. 1999). Suite à cette inhibition et à la dégradation des ARNm et des protéines, la quantité de l'hétérodimère PER/CRY chute et entraîne une levée d'inhibition qui conduit au début d'un nouveau cycle (Ripperger et Brown 2010).

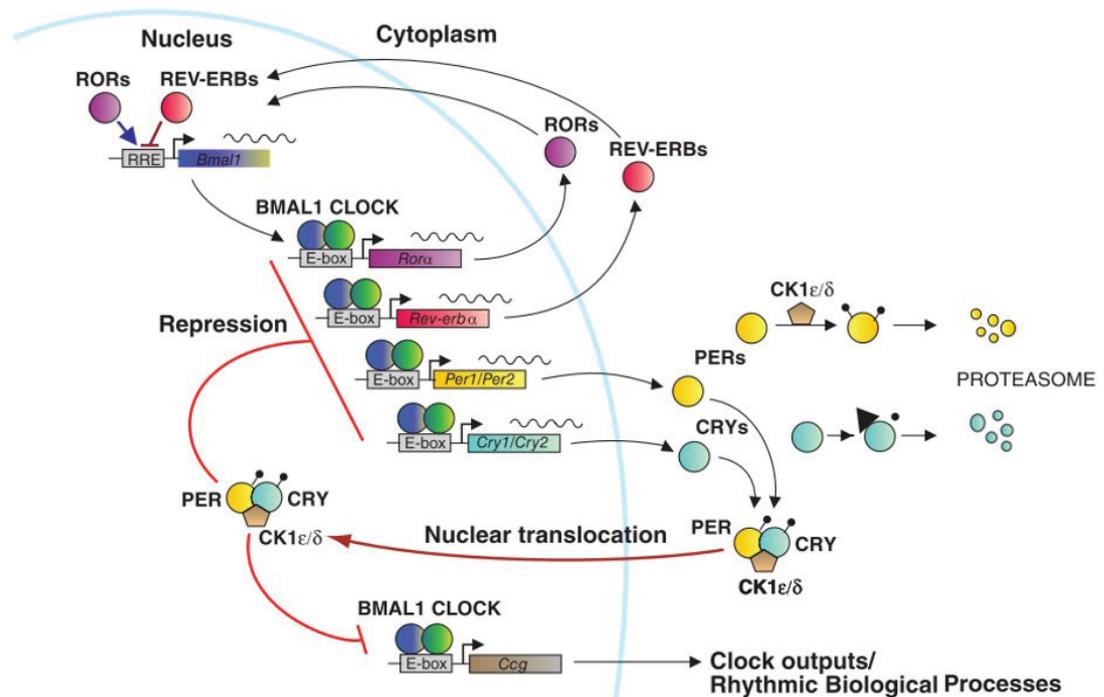


FIGURE 1.4 – Modèle du fonctionnement moléculaire de l’horloge circadienne de mammifère, basé sur des boucles de rétrocontrôle transcriptionnelles positives et négatives. Voir le texte pour plus de détails (modifiée d’après Takahashi 2015)

1.2.1.3 Les boucles secondaires : REV-ERB et ROR

En plus de la boucle moléculaire principale, le mécanisme moléculaire de genèse des oscillations endogènes est composé de boucles secondaires qui assurent la régulation transcriptionnelle des gènes de la boucle principale d'autocontrôle. Les protéines ROR (α , β et γ) et Rev-ERB (α et β) ont respectivement un rôle activateur ou inhibiteur de la transcription de *Bmal1* en se fixant sur une séquence d'ADN nommée "élément répondant à ROR" ou *ROR responding element* (RORE), présente dans la région promotrice de ce gène. Tout comme pour *Per* et *Cry*, la transcription des gènes *Ror* et *Rev-erb* est activée par le dimère CLOCK/BMAL1 par liaison à la séquence E-Box de leur région promotrice, et inhibée par l'action du dimère PER/CRY sur CLOCK/BMAL1 (Ripperger et Brown 2010). Ainsi se forme un équilibre entre activation et inhibition des gènes de l'horloge, assurant la variation rythmique des quantités d'ARN et des protéines de l'horloge avec une période d'environ 24 h.

1.2.1.4 Autres acteurs de régulation

Un premier mécanisme de contrôle a été élucidé grâce à l'observation d'un rythme d'activité locomotrice de période courte (20 h), associé à la mutation *tau*, dans une population d'hamsters doré (*Mesocricetus auratus*; Ralph et Menaker 1988). La mutation *tau* affecte le gène codant pour une caséine kinase 1 ϵ (CK1 ϵ ; Lowrey et al. 2000). Cette enzyme agit au niveau post-traductionnel en phosphorylant les protéines PER, et conduit *in fine* à une diminution de la stabilité des protéines PER à cause d'une augmentation de leur adressage au protéasome pour être recyclées (**Figure 1.4**). Ainsi, chez les mutants *tau*, la protéine CK1 ϵ induit l'augmentation de la phosphorylation de PER1 et PER2 cytoplasmiques qui entrent plus vite dans le noyau. Le cycle moléculaire est accéléré, se traduisant par un raccourcissement de la période endogène (Dey et al. 2005; Gallego, Kang et al. 2006; Gallego et Virshup 2007).

D'autres protéines ont des effets inverses comme la phosphatase PP1 dont les déphosphorylations de PER permettent sa stabilisation et son accumulation dans le noyau (Gallego, Eide et al. 2006; Schmutz et al. 2011). De nombreuses autres régulations post-traductionnelles (phosphorylation, SUMOylation et ubiquitination) permettant d'assurer le trafic intracellulaire, la fonctionnalité et la dégradation des protéines de l'horloge, sont cruciales pour le fonctionnement de la boucle moléculaire sur 24 h (pour revue, voir Hirano et al. 2016).

En 2002, une étude de Panda et collègues a étudié le transcriptome circadien dans deux tissus murins : le noyau suprachiasmatique (SCN) et le foie. Ils ont identifié

environ 650 gènes ayant une rythmicité circadienne sur les 7000 étudiés. Les gènes exprimés de façon circadienne ne sont pas les mêmes dans les 2 tissus et présentent des fonctions spécifiques au tissu. Par exemple, dans le foie, c'est le cas des gènes associés au métabolisme, à la dégradation des acides gras et au stockage des sucres. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'en étudiant plus de tissus, jusqu'à 10 % des gènes pourraient présenter une expression rythmique (Panda et al. 2002). Cette étude fut réalisée quelques années plus tard par R. Zhang et al. (2014) avec l'étude du transcriptome de 12 tissus différents dont le SCN, le foie, le cœur et les poumons. Ils démontrent en effet, que plus de 43 % des gènes codant pour des protéines présentent un profil de transcription circadien, spécifique du tissu. Une étude très récente de l'équipe, réalisée sur 64 tissus différents dont 22 provenant de régions cérébrales chez un primate non-humain, a montré que jusqu'à 81 % des gènes codant pour des protéines cyclent de manière tissu-spécifique sous un cycle L/D et représentent principalement des fonctions cellulaires essentielles (Mure et al. 2018).

1.2.2 L'organisation du système circadien

L'expression des rythmes circadiens n'est pas basée sur la simple oscillation circadienne des gènes de l'horloge dans les cellules et organes mais résulte également d'un fonctionnement des horloges circadiennes en un réseau hiérarchisé.

1.2.2.1 L'horloge centrale

Chez les mammifères, l'horloge principale, appelée « horloge centrale », est une paire de noyaux localisés dans l'hypothalamus ventral, située au-dessus du chiasma optique, la zone de décussation partielle des nerfs optiques (**Figure 1.5**). Les deux noyaux sont séparés par le 3^e ventricule cérébral. Ce noyau est appelé noyau suprachiasmatique (SCN) de l'hypothalamus et est composé d'environ 20000 neurones (Abrahamson et Moore 2001). Le rôle central du SCN dans l'expression des rythmes circadiens a été mis en évidence après des études de lésion de cette structure, qui ont conduit à la perte des rythmes de l'activité locomotrice et de la prise hydrique ainsi que du rythme de sécrétion de la corticostérone (Moore et Eichler 1972 ; Stephan et Zucker 1972). En 1990, Ralph et al. (1990) ont démontré que la période des rythmes est imposée par le SCN grâce à des expériences de transplantation d'un SCN de hamster *tau* (période endogène courte) à un hamster de phénotype sauvage dont le SCN avait été lésé plusieurs semaines auparavant. Après transplantation, la période du rythme d'activité locomotrice de l'animal receveur devient similaire à celle de l'individu donneur (Ralph et al. 1990).

Le SCN est subdivisé anatomiquement selon l'axe ventro-dorsal, entre les régions ventro-latérale (VL) et dorsomédiale (DM) (Yamaguchi et al. 2003) conduisant à une régionalisation des fonctions. Par exemple, la région VL reçoit *via* la voie rétino-hypothalamique l'information lumineuse qui est ensuite transmise à la région DM (Shigeyoshi et al. 1997 ; Yan et Okamura 2002 ; Yan et Silver 2002). Lorsque des rats sont soumis à un retard (10 h) ou une avance (6 h) du cycle 12L/12D simulant un jet lag, le rythme d'expression des gènes *Per1*, *Per2* et *Cry1*, ainsi que celui de la protéine CRY1 est en phase avec le nouveau cycle de lumière imposé dès le second jour dans la région VL tandis que ces mêmes gènes et protéines ne se resynchronisent que progressivement dans la région DM. De 5 à 7 jours sont nécessaires pour que les deux régions VL et DM présentent des rythmes en phase (Nagano et al. 2003). Ces deux régions sont également caractérisées par des productions de peptides différents : la région VL possède des cellules à peptide vasoactif intestinal ou *vasoactive intestinal peptide* (VIP) et à bombésine ou *gastrin-releasing peptide* (GRP), tandis que la région DM possède des cellules à arginine-vasopressine (AVP) et somatostatine (Abrahamson et Moore 2001 ; Van Den Pol et Tsujimoto 1985). Le SCN présente, en outre, une différence de rythme de son activité électrique selon un axe antéro-postérieur. En effet, l'enregistrement de couches horizontales de SCN a mis en évidence la présence de deux pics d'activité survenant respectivement à l'allumage et à l'extinction de la lumière (Jagota et al. 2000). Ce résultat indique que l'horloge centrale est composée d'au moins deux composants oscillants et couplés, régulés par la lumière. Toutes les cellules du SCN contiennent une horloge moléculaire qui exprime leur propre rythme avec de légères différences de période et de phase (Herzog et al. 1997 ; Honma et al. 1998 ; Welsh et al. 1995). La rythmicité globale du SCN résulte d'une synchronisation entre les oscillateurs cellulaires (Honma et al. 2004) dont le couplage met en jeu différents neurotransmetteurs et neuropeptides spécifiques de chaque région. Le VIP est considéré comme un facteur majeur de synchronisation de la région VL, en induisant l'expression de *Per1* et *Per2* *via* la protéine kinase A (Nielsen et al. 2002). En effet, en l'absence du VIP ou de son récepteur (VPAC2), on observe une perte de synchronie des rythmes d'influx calciques et d'activation de transcription dans les neurones du SCN (Brancaccio et al. 2013), ainsi que des niveaux réduits de *Per1* et *Per2* (Pakhotin et al. 2006). L'application d'un agoniste du VIP restaure d'une part, la rythmicité de l'activité électrique d'explants de SCN de souris dont l'expression du VIP a été sélectivement supprimé dans le SCN (Aton et Herzog 2005) et induit d'autre part, des décalages de phase comportementaux similaires à ceux induits par la lumière chez des souris sauvages (Piggins et al. 1995 ; Reed et al. 2001 ; Watanabe et al. 2000). L'AVP, produit par la région DM, contrebalance l'effet du VIP en agissant sur la région VL. Les deux neuropeptides

forment ainsi une balance permettant de générer des oscillations stables (Herzog et al. 2017). En plus des neuropeptides, les jonctions chimiques (Shirakawa et al. 2000) et le GABA (Aton et al. 2006) participent également au couplage des oscillateurs du SCN. Les astrocytes présents dans le SCN contiennent une horloge circadienne (Prolo et al. 2005) et pourraient participer à la régulation du rythme d'expression du gène *Per2* via le glutamate dans le SCN (Brancaccio et al. 2017).

L'horloge centrale est entraînée par le cycle environnemental grâce à l'information lumineuse, réceptionnée par la rétine et transmise au SCN via le tractus rétino-hypothalamique (RHT) dont les terminaisons sont glutamatergiques. Le glutamate libéré agit sur le SCN en activant des récepteurs ionotropiques du glutamate de type AMPA et NMDA qui induisent une activation de la voie des *Mitogen Associated Protein* (MAP) Kinases dépendante de l'influx calcique. La cascade d'activation intracellulaire conduit finalement à l'activation des gènes d'expression précoces comme *C-Fos*, mais également les gènes de l'horloge *Per1* et *Per2* (Kuhlman et al. 2003). L'induction par la lumière des gènes *Per1* et *Per2* a été très étudiée dans le SCN et présente des différences temporelles et spatiales. Alors que *Per1* est rapidement induit pendant toute la nuit biologique dans la région VL, *Per2* est induit rapidement en début de nuit biologique et plus lentement en fin de nuit biologique dans les régions ventro- et dorsolatérales. En fin de nuit biologique, *Per1* est exprimé dans tout le SCN (Albrecht et al. 1997 ; Shearman et al. 1997 ; Yan et Okamura 2002 ; Zylka et al. 1998). Le rôle fondamental de *Per1* et *Per2* dans le mécanisme de synchronisation par la lumière a été mis en évidence par des injections intra-cérebroventriculaires de sondes oligo-désoxynucléotides dirigées contre *Per1* et *Per2* et qui bloquent tout décalage de phase comportemental induit par la lumière (Akiyama et al. 1999 ; Wakamatsu et al. 2001).

En conclusion, l'horloge centrale du SCN est composée de différents oscillateurs dont le couplage met en jeu divers facteurs chimiques et électriques afin de générer un rythme global cohérent et pouvant être entraînés par la lumière.

1.2.2.2 Un réseau d'horloges

La découverte des gènes de l'horloge a permis de mettre en évidence l'existence d'horloges circadiennes dans la plupart des structures nerveuses (rétine, habenula latérale...), hors SCN, et au niveau des tissus périphériques comme le foie, la peau ou les poumons (Salaberry et al. 2017 ; Sandu et al. 2015 ; Tosini et Menaker 1996 ; Welsh et al. 2004 ; Yamazaki et al. 2000 ; Yoo et al. 2004 ; Zylka et al. 1998). Ces oscillateurs sont appelés

horloges périphériques, en opposition à l'horloge centrale du SCN.

Plusieurs différences fonctionnelles entre l'horloge centrale du SCN et les horloges périphériques ont pu être identifiées. Tout d'abord, bien que se basant sur les mêmes boucles de régulations moléculaires, l'expression et le rôle d'un gène de l'horloge sont spécifiques d'un tissu. Par exemple, l'absence de la protéine CLOCK abolit la rythmicité moléculaire dans l'horloge périphérique du foie (DeBruyne et al. 2007) mais pas dans le SCN grâce à l'expression de NPAS2, un homologue de CLOCK pouvant assurer son rôle en se dimérisant avec BMAL1 (DeBruyne et al. 2006). À l'inverse, chez des souris déficientes en *Bmal1*, la transcription de *Per1* et *Per2* n'est plus rythmique dans le SCN (Bunger et al. 2000), tandis que, dans les cellules du foie, les amplitudes de l'expression de PER1 et PER2 ne sont que peu ou pas affectées (Kornmann, Schaad, Bujard et al. 2007 ; Kornmann, Schaad, Reinke et al. 2007). De plus, la protéine de la boucle secondaire ROR α n'est exprimée que dans les tissus nerveux dont le SCN (Schaeren-Wiemers et al. 1997). Enfin, les facteurs de synchronisation externes sont différents : le SCN est principalement entraîné par la lumière tandis que les horloges périphériques sont sensibles à d'autres facteurs. Par exemple, l'accès limité à de la nourriture durant la période lumineuse modifie le rythme d'expression des gènes de l'horloge au niveau des horloges périphériques dont le foie mais pas au niveau du SCN (Damiola et al. 2000).

Le système circadien est donc un système complexe qui repose sur la présence d'une multitude d'oscillateurs, le SCN jouant un rôle de « chef d'orchestre » permettant à chaque horloge de fonctionner de façon optimale selon le moment de la journée. La synchronisation des horloges périphériques par le SCN peut se faire par plusieurs voies, directes ou indirectes (**Figure 1.5**). Les influences directes mettent en jeu le système nerveux sympathique (Ishida et al. 2005). Par exemple, une lésion du nerf vague entraîne une perte de l'expression rythmique de *Per2* dans les tissus des voies respiratoires (larynx, trachée, poumon ; Bando et al. 2007). Les voies indirectes sont plus diverses et correspondent à des fonctions régulées par le SCN mais n'influençant peu ou pas le fonctionnement du SCN en retour. Ces voies indirectes comprennent notamment la prise alimentaire (Asher et al. 2010 ; Damiola et al. 2000 ; Stokkan et al. 2001), la température (Buhr et al. 2010) et la signalisation par les glucocorticoïdes (Balsalobre et al. 2000). Le rôle de ces derniers a été mis en évidence sur des fibroblastes en culture dans lesquels l'application de dexaméthasone, un agoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes, induit l'expression de *Per1* (Balsalobre et al. 2000). *In vivo*, quand la prise alimentaire est restreinte à la période lumineuse, des souris déficiente en récepteurs aux glucocorticoïdes présentent un découplage entre les rythmes des horloges périphériques (foie, reins,...) et centrale se mettant en place plus rapidement que chez les souris sauvages. Ainsi,

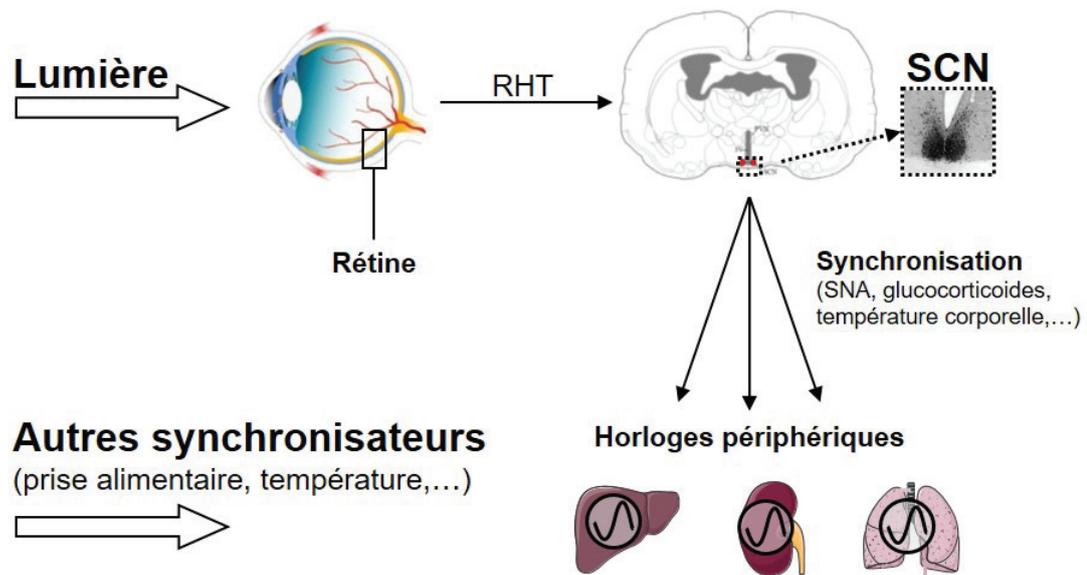


FIGURE 1.5 – Représentation schématique des voies de synchronisation du système circadien. Le SCN est synchronisé aux cycles de lumière de l’environnement grâce à l’information lumineuse captée par la rétine et transmise par le tractus hypothalamo-rétinien (RHT). Le SCN synchronise l’activité des horloges périphériques par plusieurs voies (système nerveux autonome (SNA), variation de la température corporelle, glucocorticoïdes). Les horloges périphériques sont également influencées par d’autres *Zeitgeber* (prise alimentaire, activité physique, température).

la signalisation des glucocorticoïdes renforcerait le couplage entre SCN et horloges périphériques (Le Minh et al. 2001). De plus, cette signalisation par les glucocorticoïdes n’affecte pas le SCN car il s’agit d’un des rares tissus ne possédant pas de récepteurs aux glucocorticoïdes (Balsalobre et al. 2000 ; Rosenfeld et al. 1988).

Le modèle de fibroblaste en culture a été très largement étudié (Balsalobre et al. 2000, 1998 ; Welsh et al. 2004) et a montré que chaque fibroblaste est doté de sa propre horloge circadienne moléculaire. La présence d’une horloge cellulaire a ensuite été établie dans de nombreux tissus, y compris le SCN (Balsalobre et al. 1998 ; Welsh et al. 1995 ; Yamazaki et al. 2000 ; Yoo et al. 2004 ; pour revue, voir Mohawk et al. 2012). Ces travaux ont mis en évidence que la plupart des cellules somatiques sont dotées d’horloges circadiennes moléculaires. Ainsi, il existe des horloges non seulement au niveau tissulaire mais également au niveau cellulaire.

Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à l’horloge rétinienne de mammifères. Dans les prochains chapitres, je détaillerai plus précisément l’anatomie de la rétine, le fonctionnement endogène de l’horloge rétinienne ainsi que ses propriétés de

réponse à la lumière.

L'horloge de la rétine

La rétine est un modèle remarquable d'horloge car elle rassemble en son sein les systèmes de photoréception, la fonction d'horloge et les sorties physiologiques. Ces particularités font de l'horloge rétinienne un excellent modèle pour étudier les régulations mises en jeu dans les processus d'entraînement des horloges circadiennes.

2.1 Anatomie de la rétine

2.1.1 Anatomie générale

La rétine est un tissu neural tapissant le fond de l'œil et possédant de nombreux types cellulaires spécialisés. Les cellules composant la rétine sont organisées en couches successives, s'étendant de la membrane limitante interne à la membrane limitante externe. On distingue les couches nucléaires contenant les noyaux des cellules et les couches plexiformes contenant les contacts synaptiques entre les cellules (**Figure 2.1**). Les couches nucléaires sont, de l'extérieur vers l'intérieur de l'œil, la couche nucléaire externe ou *outer nuclear layer* (ONL), la couche nucléaire interne ou *inner nuclear layer* (INL), et la couche des cellules ganglionnaires ou *ganglion cell layer* (GCL). Les couches plexiformes sont, de l'extérieur vers l'intérieur de l'œil, la couche plexiforme externe ou *outer plexiform layer* (OPL), et la couche plexiforme interne ou *inner plexiform layer* (IPL). La lumière atteignant la rétine traverse d'abord la GCL puis l'INL et en dernier l'ONL.

2.1.2 La couche des photorécepteurs

La couche des photorécepteurs est la plus externe de la rétine, la dernière à être atteinte par les photons. Elle contient deux types de photorécepteurs qui réceptionnent l'information lumineuse et élaborent l'influx nerveux : les cônes et les bâtonnets (**Figure 2.1**).

2.1.2.1 Les bâtonnets

Les bâtonnets sont les photorécepteurs majoritaires au sein de la rétine de souris (97,2% des cellules de l'ONL ; Jeon et al. 1998) et d'humains (~ 95%). Ce sont les photorécepteurs les plus sensibles de la rétine répondant à des niveaux de lumière très faibles, dits scotopiques ($10^7 - 10^9$ photons/cm²/s). L'opsine des bâtonnets permettant la photoréception est la rhodopsine.

2.1.2.2 Les cônes

Chez la souris, les cônes constituent les 2,8% des photorécepteurs restants (Jeon et al. 1998) et répondent à des intensités de lumière dites mésopiques ($10^{10} - 10^{12}$ photons/cm²/s) et élevées ou photopiques ($>10^{13}$ photons/cm²/s). Contrairement aux bâtonnets, il existe plusieurs sous-types de cônes permettant la vision des couleurs : les cônes sensibles aux longueurs d'ondes courtes ou *short-wavelength* (SW)), ou aux longueurs d'onde moyennes ou *middle-wavelength* (MW), en fonction de l'opsine présente. Ces deux opsines se distinguent par leur sensibilité spectrale. Chez la souris, l'opsine SW est sensible à la lumière ultra-violette (UV) avec un maximum de sensibilité (λ_{max}) à 359 nm tandis que l'opsine MW a un pic de sensibilité spectrale à 508 nm (**Figure 2.4**). Chez les grands singes dont l'homme, une troisième opsine est décrite : l'opsine LW (long-wavelength) qui est sensible aux longues longueurs d'ondes du spectre lumineux avec un pic de sensibilité à 564 nm.

Chez la souris, la répartition spatiale des cônes est basée sur une distribution selon un gradient dorso-ventral où les cônes MW sont principalement dorsaux et les cônes SW principalement ventraux (Szél et al. 1993). De plus, certains cônes co-expriment les opsines SW et MW (Röhlich et al. 1994).

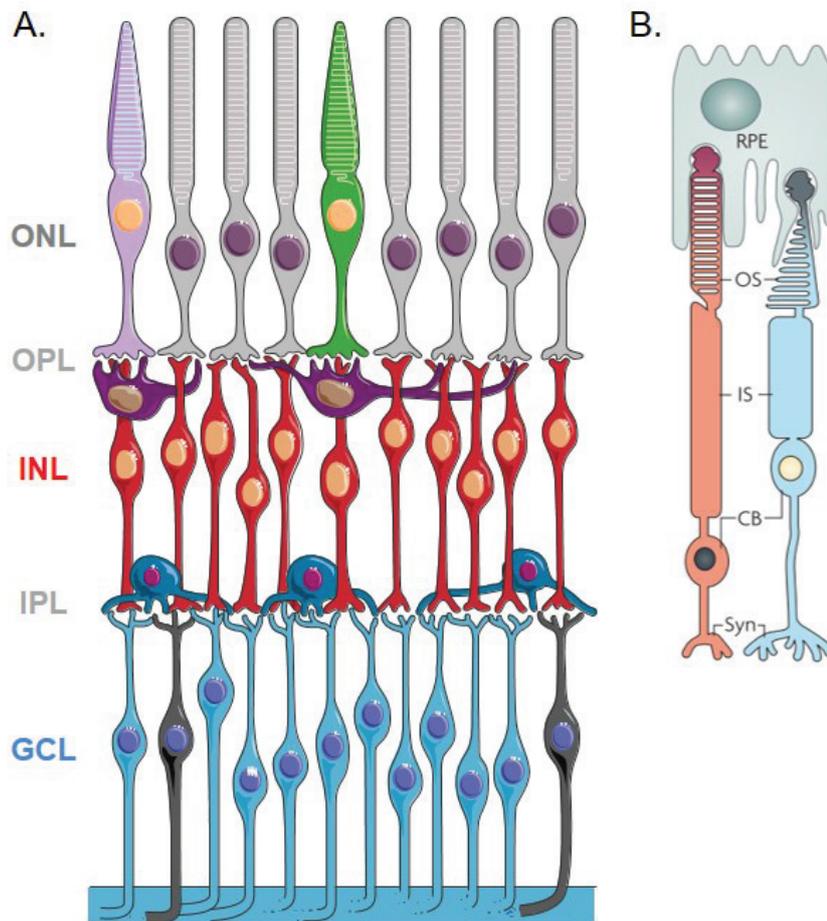


FIGURE 2.1 – Anatomie de la rétine et des photorécepteurs chez la souris. A. La rétine est organisée en trois couches cellulaires : la couche nucléaire externe (ONL) composée des bâtonnets (gris), des cônes MW (vert) et des cônes SW (violet clair) ; la couche nucléaire interne (INL) contient des cellules bipolaires (rouge), des cellules horizontales (violet) et des cellules amacriques (bleu foncé) ; et la couche des cellules ganglionnaires (GCL) composée des cellules ganglionnaires (bleu clair) et des cellules ganglionnaires à mélanopsine (noir). OPL = Couche plexiforme externe, IPL = Couche plexiforme interne (Modifiée d'après Servier Medical Art). B. Les cônes et les bâtonnets sont constitués d'un corps cellulaire (CB) présentant un prolongement formant des contacts synaptiques au niveau de l'OPL (Syn), d'un segment interne (IS) et externe (OS). Le segment externe diffère entre cône et bâtonnet : celui de cône consiste en un repliement de la membrane plasmique alors que celui de bâtonnet contient des saccules membranaires empilés. Les segments externes de cône et de bâtonnet possèdent une forte concentration de protéines impliquées dans la phototransduction dont les opsines. Les cellules de l'épithélium pigmentaire (RPE) entourent le segment externe et permet le recyclage des disques des photorécepteurs. (Modifiée d'après Swaroop et al. 2010)

2.1.3 La couche nucléaire interne

2.1.3.1 Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont des cellules glutamatergiques assurant la transmission de l'information lumineuse des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires et amacrines. Il existe plusieurs sous-types de cellules bipolaires selon leurs réponses électrophysiologiques et les cellules auxquelles elles sont connectées.

Les cônes sont en contact avec deux types de cellules bipolaires de cônes, ON ou OFF, selon les récepteurs du glutamate présents. Les bipolaires de type OFF expriment des récepteurs ionotropiques du glutamate (AMPA/Kainate/NMDA) et les bipolaires de type ON, des récepteurs métabotropiques (mGluR6). Les bipolaires de cônes de type ON et OFF sont également classées en sous-classes selon la stratification de leurs prolongements dans l'IPL et le type de cônes auquel elles sont connectées. Une étude récente distingue ainsi 11 sous-types de cellules bipolaires de cônes (Breuninger et al. 2011). Les cellules bipolaires de cônes de type OFF et ON peuvent avoir une réponse soutenue ou transitoire, selon la vitesse de récupération de la désensibilisation des récepteurs au glutamate (Masland 2001). Ces cellules bipolaires de type ON reçoivent également des informations venant des cellules amacrines, en particulier les cellules amacrines AII, par des synapses électriques (jonctions communicantes) excitatrices, et les cellules de type OFF par des synapses glycinergiques inhibitrices (Tsukamoto et Omi 2017).

Les bâtonnets sont principalement en contact avec un seul type de cellules bipolaires, les bipolaires de bâtonnets de type ON possédant à la fois des récepteurs métabotropiques et ionotropiques du glutamate (Euler et al. 1996 ; Hughes 1997 ; Masland 2001). Néanmoins, les bâtonnets sont également connectés aux cellules bipolaires de cônes de type OFF (Hack et al. 1999 ; Soucy et al. 1998).

2.1.3.2 Les cellules horizontales

Les cellules horizontales sont présentes dans la partie la plus externe de l'INL et constituent 5% des cellules de cette couche. Elles sont GABAergiques et possèdent des connexions synaptiques avec les bâtonnets et les cônes (Masland 2001).

2.1.3.3 Les cellules amacrines

Les cellules amacrines sont présentes dans la partie interne de l'INL. Il s'agit de la population de cellules rétiniennes la plus variée avec une trentaine de sous-types définis

selon des critères morphologiques et leur neurotransmetteur principal. Les cellules amacrines sont connectées aux cellules bipolaires de cônes et de bâtonnets, aux cellules ganglionnaires et entre elles. La grande majorité des cellules amacrines sont inhibitrices (GABAergiques ou glycinergiques) mais certains sous-types produisent également de la dopamine (DA) ou de l'acétylcholine (Masland 2012). Les cellules amacrines jouent un rôle notamment dans la détection d'objets en mouvement (Masland 2003).

Deux sous-types de cellules amacrines sont particulièrement intéressants dans notre étude :

- les cellules amacrines AII : ces cellules sont glycinergiques et transmettent l'information venant des cellules bipolaires de bâtonnets vers les cellules bipolaires de cônes ON et OFF. Ces cellules constituent une des voies de transfert de l'information lumineuse issue des bâtonnets (**Voir section 2.3.2**).
- les cellules amacrines dopaminergiques : ce sont des cellules interplexiformes, c'est-à-dire qu'elles possèdent des prolongements dans les couches plexiformes interne et externe, produisent de la DA en plus du GABA (Hirasawa et al. 2009 ; Puopolo et al. 2001). Les cellules amacrines dopaminergiques permettent d'ajuster la réponse de la rétine en fonction de l'intensité de la lumière. En effet, la DA par son action paracrine va diminuer la conductance des jonctions communicantes entre les cellules horizontales (Piccolino et Trimarchi 1987), les cellules amacrines (Hampson et al. 1992) et les photorécepteurs (Ribelayga et al. 2008). Ainsi, à faible luminosité, le niveau de DA est faible et la conductance des jonctions communicantes est forte, tandis qu'à forte luminosité, la concentration de DA augmente ce qui diminue la conductance entre les cellules et conduit à leur découplage.

2.1.4 La couche des cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont les cellules les plus internes de la rétine. Elles transmettent l'information nerveuse vers l'encéphale (notamment le corps genouillé latéral et le colliculus supérieur) via le nerf optique. De fait, ce sont les seuls neurones de la rétine à produire des potentiels d'action et à avoir un axone myélinisé.

Les cellules ganglionnaires sont classées en plus d'une vingtaine de sous-types (Völgyl et al. 2009) en fonction de leur arborisation dendritique et du type de cellules bipolaires et amacrines auquel elles sont connectées : les cellules bipolaires ON contactent les cellules ganglionnaires ON et les bipolaires OFF les ganglionnaires OFF.

2.1.4.1 Les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles

Parmi les cellules ganglionnaires, il existe une sous population de cellules ganglionnaires, intrinsèquement photosensibles ou *intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells* (ipRGCs). Chez les rongeurs, 1 à 2 % des cellules ganglionnaires expriment la mélanopsine (Hattar et al. 2002) alors que 0,2 à 0,8 % de cellules ganglionnaires expriment ce photopigment chez l'Homme (Dacey et al. 2005). La mélanopsine est localisée au niveau du soma, des dendrites, ainsi que dans l'axone (Hattar et al. 2002) et présente un pic de sensibilité spectrale à 480 nm (Lucas et al. 2001). Les ipRGCs utilisent le glutamate et le PACAP (*Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) comme neurotransmetteurs.

Il existe plusieurs classes d'ipRGCs selon des critères morphologiques et fonctionnels. À ce jour, 5 types ont été caractérisés et nommés M1 à M5. Les ipRGCs de type M1 expriment un niveau élevé en mélanopsine et émettent des dendrites dans la partie externe de l'IPL (Hattar et al. 2006 ; Provencio et al. 2002). Les ipRGCs de type M2 possèdent un corps cellulaire plus large, expriment moins de mélanopsine et présentent des prolongements dendritiques dans la partie interne de l'IPL (Baver et al. 2008 ; Berson et al. 2010 ; Hattar et al. 2006 ; Schmidt et Kofuji 2009). Le type M3 est plus rare et émet des prolongements à la fois dans les parties interne et externe de l'IPL (Berson et al. 2010 ; Schmidt et Kofuji 2009 ; Schmidt et al. 2011). L'expression de mélanopsine est intermédiaire, entre les types M1 et M2 (Berson et al. 2010). Les types M4 et M5 sont caractérisés par une expression très faible en mélanopsine et des prolongements dendritiques dans la partie interne de l'IPL (Berson et al. 2010 ; Ecker et al. 2010 ; Hughes et al. 2013). Le type M4 se distingue par un corps cellulaire plus gros que les M5 (Ecker et al. 2010). D'un point de vue fonctionnel, les ipRGCs de type M1 ont un seuil de réponse à la lumière plus bas (~10 fois plus sensibles), une amplitude de réponse plus importante et plus rapide, comparés aux types M2 (Ecker et al. 2010 ; Schmidt et al. 2011 ; X. Zhao et al. 2014). Les types M4 et M5 ont une sensibilité semblable aux M2 mais avec une amplitude réduite et une latence de réponse plus élevée (X. Zhao et al. 2014).

En outre, il existe également une population d'ipRGCs de type M1 possédant des prolongements dendritiques jusque dans la couche des photorécepteurs (Sondereker et al. 2017). Le corps cellulaire de ces cellules est localisé dans la couche des cellules ganglionnaires et dans la partie interne de l'INL, on parle alors de M1d (d pour déplacées).

Les ipRGCs projettent vers de nombreuses régions de l'encéphale *via* notamment le tractus rétino-hypothalamique et rétino-prétectal, régulant tout un panel de fonctions non visuelles à la lumière (Hattar et al. 2006 ; Lucas et al. 2003). Ces projections diffèrent

selon le type d'ipRGCs. Ainsi, l'horloge centrale du SCN est innervée majoritairement par des ipRGCs de type M1 (80 %) et M2 (20 %) (Baver et al. 2008). Le noyau olivaire pretectal (OPN), responsable de la constriction pupillaire à la lumière, est principalement innervé par des ipRGCs de type M2 dans sa région centrale (~55 %) et des M1 dans sa région périphérique (~45 %) (Baver et al. 2008), bien que cette structure soit également innervée par des cellules ganglionnaires non-photosensibles (Güler et al. 2007). Les ipRGCs régulent également les fonctions visuelles grâce à des projections de tous les types (M1 à M5) vers le noyau geniculé latéral et le colliculus supérieur, deux régions cérébrales associées à la perception visuelle (Ecker et al. 2010).

2.1.5 Les cellules gliales et épithéliales

2.1.5.1 Les cellules de Müller

Les cellules de Müller sont la principale population de cellules gliales de la rétine. Bien que leur noyau se situe au niveau de l'INL, ces cellules présentent des prolongements de la membrane limitante interne à la membrane limitante externe, et sont en contact avec les autres types neuronaux de la rétine, ainsi qu'avec les cellules de l'épithélium pigmenté via des microvillosités.

Elles exercent les rôles classiques des cellules gliales dans le système nerveux, à savoir un rôle de soutien et de régulation de l'homéostasie des neurones : apport de nutriments aux neurones, recapture de glutamate, régulation des concentrations d'ion potassium (K^+) (Reichenbach et Bringmann 2013 ; Reichenbach et al. 1995). Les cellules de Müller interviennent également dans le cycle visuel en participant au recyclage du rétinol (**voir section 2.3.1.2**).

2.1.5.2 L'épithélium pigmentaire

Les cellules de l'épithélium pigmentaire (RPE) ne font pas partie de la rétine mais sont intrinsèquement liées à son fonctionnement. L'épithélium pigmentaire tapisse le fond de l'œil. Son pôle apical est formé de microvillosités en contact proche avec les segments externes des photorécepteurs.

Ces cellules assurent le transport des nutriments et des ions, sécrètent des facteurs neurotrophiques, jouent un rôle majeur dans le cycle visuel (**voir section 2.3.1.2**) et permettent le recyclage des segments externes de photorécepteurs ou phagocytose. La phagocytose par le RPE permet l'élimination des protéines et des lipides endommagés lors d'expositions à la lumière qui peuvent altérer le fonctionnement des photorécepteurs.

Les prolongements des cellules du RPE entourent l'extrémité du segment externe des photorécepteurs qui est ensuite séparé du reste du segment externe et phagocyté par la cellule épithéliale. Le segment phagocyté sera ensuite recyclé (Strauss 2005). Afin de maintenir les photorécepteurs en état d'excitabilité permanente, les segments externes sont constamment renouvelés (Nguyen-Legros et Hicks 2000).

Le processus de phagocytose est fondamental pour la survie des photorécepteurs. En effet, chez un modèle de rat porteur de la mutation *rdy* empêchant toute activité de phagocytose, on observe une dégénérescence progressive de la couche des photorécepteurs (Mullen et Lavail 1976).

2.2 Horloge rétinienne

2.2.1 Découverte de l'horloge rétinienne

L'existence d'une horloge dans la rétine de mammifères fut démontrée pour la première fois chez le hamster doré (Tosini et Menaker 1996). Dans cette étude, les auteurs ont mesuré la sécrétion de mélatonine d'explants rétiniens, isolés du SCN et maintenus en culture sous un cycle 12L/12D (**Figure 2.2**). Dans cette condition, la sécrétion de mélatonine est rythmique avec une sécrétion maximale en fin de nuit. Les auteurs ont ensuite soumis les mêmes explants rétiniens à l'obscurité constante. La sécrétion de mélatonine demeure rythmique pour tous les explants, montrant ainsi que ce rythme n'est pas une réponse passive à la lumière mais bien contrôlée de façon endogène, par une horloge circadienne. Les mêmes auteurs démontreront par la même approche, deux ans plus tard, l'existence d'une horloge chez la souris (Tosini et Menaker 1998).

2.2.2 Des activités rythmiques dans la rétine

De nombreuses fonctions rythmiques ont été observées dans la rétine et ceci bien avant la découverte des gènes de l'horloge (pour revue, Felder-Schmittbuhl et al. 2017). La plus ancienne fonction décrite est la phagocytose des segments externes des photorécepteurs (Lavail 1976), que ce soit celle des bâtonnets (Goldman et al. 1980) ou des cônes (Bobu et Hicks 2009 ; Krigel et al. 2010). Plus récemment, la rythmicité du transcriptome de la rétine a été analysé en conditions LD et DD. Les auteurs ont montré que près de 3000 gènes ont une expression rythmique sous un cycle LD, rythme qui se maintient pour près de 300 d'entre eux en condition DD, démontrant leur régulation par l'horloge rétinienne (Storch et al. 2007). Parmi ces gènes, on retrouve des fonctions cellulaires très diverses, allant du métabolisme à la transmission synaptique. Notamment, des

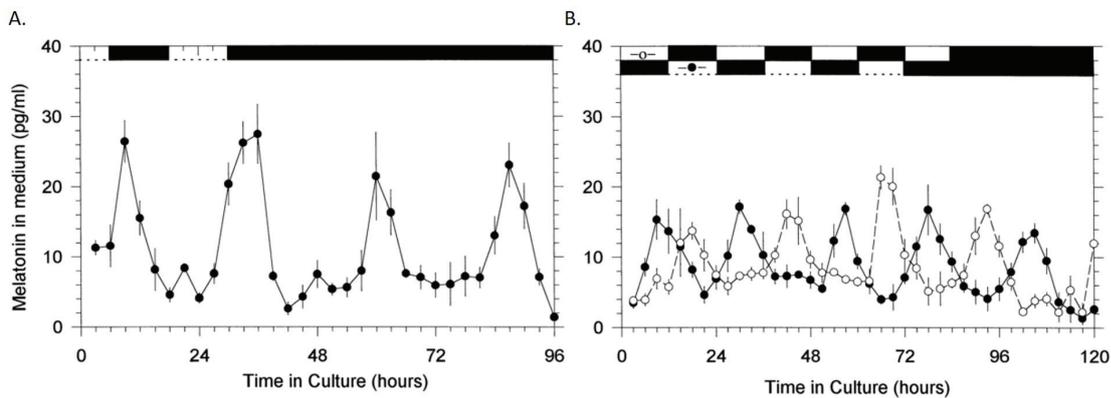


FIGURE 2.2 – **Libération de mélatonine et entraînement par la lumière d'explants de rétines en culture.** A. Les explants rétinien soumis à des cycles lumineux (12L/12D, barres blanches et noires) présentent une libération de mélatonine maximale en fin de phase obscure. Les explants placés ensuite en obscurité constante continuent d'avoir une libération rythmique de mélatonine. B. Des explants de rétine soumis à des cycles lumineux en antiphase présentent une libération de mélatonine également en antiphase, avec toujours un niveau maximal en fin de phase obscure (modifiée d'après Tosini et Menaker 1998).

gènes responsables du développement rétinien comme *Nr2e3*, et intervenant dans la différenciation de précurseurs neuronaux en bâtonnets, ont une expression cyclique en DD (Kunst et al. 2015). Ces données soulignent l'importance de l'horloge circadienne lors des premiers stades de développement. Un tableau résumant les études qui ont décrit une expression rythmique des gènes de sorties dans la rétine en condition LD et DD a récemment été publié (Felder-Schmittbuhl et al. 2017, Annexe 1).

Nous allons nous focaliser sur certaines fonctions rythmiques de la rétine, plus importante dans le cadre de mon projet de thèse. En ce qui concerne les photorécepteurs, un rythme circadien des ARNm des opsines des cônes SW et MW et de la rhodopsine, avec une acrophase vers CT12, a été observé chez la souris C3H (Schantz et al. 1999), tandis que chez la souris C57Bl/6, aucun rythme de ces ARNm n'a été détecté (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). La mélanopsine, quant à elle, présente un rythme d'expression en condition LD et DD chez la souris et le rat (Hannibal et al. 2013, 2005 ; Sakamoto et al. 2005, 2004).

La DA et la mélatonine, principaux neurotransmetteurs de la rétine sont également sous contrôle circadien et jouent un rôle important dans la rythmicité de la physiologie rétinienne. Dans la rétine, la mélatonine, produite par les photorécepteurs, inhibe la sécrétion de la DA pendant la nuit (Dubocovich 1983) alors que la libération de DA par les cellules amacrines inhibe la synthèse de mélatonine, pendant la phase

lumineuse (Iuvone et al. 2005 ; Manglapus et al. 1999). La libération circadienne de la DA rétinienne dépend donc de la libération rythmique de la mélatonine (Iuvone et al. 2005), mais en absence de celle-ci, la lumière contrôle la sécrétion rythmique de la DA (Doyle et al. 2002). C'est le cas de nombreuses souches de souris (dont la C57Bl/6) qui produisent peu ou pas de mélatonine suite à des mutations dans les gènes qui codent les enzymes impliquées dans sa biosynthèse (arylalkylamine N-acétyltransférase ou AANAT et hydroxyindole-O-méthyltransférase ou HIOMT : Ebihara et al. 1986). Chez ces souris déficientes en mélatonine, la DA et le GABA interagissent afin de réguler le fonctionnement de l'horloge rétinienne sur un cycle de 24h (Ruan et al. 2008).

Chez les souches de rongeurs qui produisent de la mélatonine (rat Wistar ou souris BALB/c, par exemple), deux de ses enzymes de synthèse l'AA-NAT et l'HIOMT présentent une expression rythmique ainsi que le gène de la tyrosine hydroxylase (Th), enzyme de synthèse de la DA, et la DA (Niki et al. 1998 ; Sakamoto et Ishida 1998 ; Sakamoto et al. 2005, 2000).

L'expression rythmique de la DA modifie également le couplage des photorécepteurs pendant un nyctémère : en effet, en début de jour, lorsque les concentrations en DA sont élevées, l'activation des récepteurs de type D2 de la DA diminue la conductance des jonctions communicantes entre les cônes et les bâtonnets, diminuant ainsi leur couplage pendant la journée (N. G. Jin et al. 2015 ; Ribelayga et al. 2008).

Certaines fonctions impliquées dans la vision sont également rythmiques, comme la sensibilité au contraste (Hwang et al. 2013 ; Jackson et al. 2012) ou la réponse électrique de la rétine à la lumière ou électrorétinogramme (ERG) (Barnard et al. 2006 ; Cameron et al. 2008 ; Jackson et al. 2012 ; Storch et al. 2007). L'ERG est sous le contrôle de la mélatonine rétinienne (Baba et al. 2009) *via* le récepteur MT1 de la mélatonine (Sengupta et al. 2011).

Le nombre important et la variété des fonctions physiologiques et des expressions géniques rythmiques au sein de la rétine renforcent l'importance d'une meilleure compréhension du fonctionnement endogène de l'horloge rétinienne.

2.2.3 Une horloge ou des horloges rétiniennes ?

S'il est établi qu'il existe une horloge au sein de la rétine, la question de sa localisation est toujours le sujet d'un long débat. La rétine est en effet un tissu composé de nombreux types cellulaires comme nous l'avons vu précédemment. Les différentes études ont cherché à déterminer si l'horloge circadienne de la rétine est localisée dans une couche cellulaire, un groupe de cellules, voire un type cellulaire.

Une première approche a été d'analyser l'expression des gènes de l'horloge dans les couches de la rétine par diverses méthodologies (qPCR, immunomarquage, Western blot, hybridations *in situ*) et a conduit à des résultats parfois contradictoires. Ainsi, l'une des premières études a observé que *Clock* était exprimé dans toutes les couches nucléaires, avec cependant une expression plus importante dans l'INL (Gekakis 1998). Les études suivantes confirmèrent une prévalence de l'expression des gènes de l'horloge dans l'INL et dans la GCL (García-Fernández et al. 2007 ; Gustincich et al. 1999 ; Namihira et al. 2001, 1999 ; Storch et al. 2007 ; Witkovsky et al. 2003). De plus, chez un modèle murin dont les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) dégénèrent (*rd/rd*), aucune modification de l'expression des gènes de l'horloge n'a été observé dans les couches internes (Dinet et al. 2007 ; Ruan et al. 2006). L'imagerie *in vitro* par bioluminescence de l'expression de PER2::Luc (un rapporteur bioluminescent couplé au gène de l'horloge *Per2*) dans les couches de la rétine a confirmé ces résultats avec l'enregistrement d'un signal provenant principalement de l'INL. Tous ces résultats ont suggéré que l'ONL n'exprimait que peu, voire pas les gènes de l'horloge et que l'horloge de la rétine n'était pas localisée dans la couche des photorécepteurs (Ruan et al. 2008) à l'inverse des vertébrés non-mammaliens (Green 2003). Cependant, lorsque la GCL et l'INL sont détruites par l'injection d'acide kaïnique, l'expression de *Per1* persiste dans la couche des photorécepteurs, maintenue en culture chez le rat *Per1^{Luc}* (Tosini et al. 2007). Ces résultats ont été confirmés après l'isolement de l'ONL, soit mécaniquement chez le rat (Sandu et al. 2011) ou par microdissection laser chez la souris (Dkhissi-Benyahya et al. 2013), et par la quantification des gènes de l'horloge. Récemment, par immunohistochimie, X. Liu et al. (2012) ont conclu que tous les types neuronaux de la rétine, à l'exception notable des bâtonnets, exprimaient les protéines de l'horloge.

Cependant, la seule présence des gènes de l'horloge au sein des cellules de la rétine ne permet pas de conclure à l'existence d'une horloge, il est essentiel de déterminer si cette expression est circadienne au niveau des différentes couches de la rétine et/ou des populations cellulaires qui les composent. En 2007, Tosini et al. (2007) ont montré grâce à un gène rapporteur bioluminescent que la protéine PER1 oscille de façon circadienne dans l'ONL. En mesurant l'expression d'ARNm au cours d'un cycle circadien sur des couches rétinienne isolées par microdissection, Dkhissi-Benyahya et al. (2013) ont identifié plusieurs gènes, exprimés de façon circadienne dans l'ONL (*Per1*, *Per2*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Reverba*, *Rora*) et dans la rétine interne (GCL+INL) (*Per1*, *Per2*, *Rora*, *Clock*). De plus, dans cette étude, les auteurs ont montré que le rythme d'expression de certains gènes de l'horloge est en antiphase entre l'ONL et la rétine interne, suggérant que les différentes couches rétinienne ne sont pas en phase et que l'horloge rétinienne

pourrait être composée de plusieurs horloges ou oscillateurs (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). Ces résultats pourraient expliquer le fait que l'amplitude du rythme d'expression des gènes de l'horloge est faible lorsqu'elle est mesurée dans la rétine entière par comparaison à d'autres horloges périphériques (Peirson et al. 2006).

A un niveau cellulaire, une première étude a démontré que les cellules horizontales, bipolaires, amacrines (dopaminergiques et catécholaminergiques) et ganglionnaires expriment les principaux gènes de l'horloge (*Bmal1*, *Clock*, *Cry1-2*, *Per1-2*) mais pas les bâtonnets (Ruan et al. 2006). Par la suite, Dorenbos et al. (2007) ont démontré que les cellules amacrines dopaminergiques présentent une expression rythmique de ces mêmes gènes de l'horloge, alors que X. Liu et al. (2012) ont observé que seul CRY2 était exprimé de manière circadienne dans ces cellules. Les cônes, quant à eux expriment de façon circadienne plusieurs protéines de l'horloge (CLOCK, BMAL1, PER1, PER2 et CRY2 ; X. Liu et al. 2012).

Enfin, il a été démontré récemment que les cellules de Müller expriment les principaux gènes de l'horloge (*Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*), qu'elles sont capables de générer des oscillations circadiennes d'expression de PER2::Luc, même en absence des autres types cellulaires (Xu et al. 2016). Toutes ces études ont abouti à la conclusion que toutes les cellules de la rétine, neuronales et gliales, expriment les gènes de l'horloge de façon rythmique, à l'exception des bâtonnets.

La question qui reste à résoudre est de déterminer si ces diverses populations cellulaires constituent des horloges distinctes et par quels mécanismes elles se synchronisent entre elles au niveau d'une couche et/ou du tissu.

2.2.4 Couplage des horloges rétinienne

En 2015, Jaeger et al. (2015) ont isolé mécaniquement, à l'aide d'un vibratome, les trois couches rétinienne (GCL, INL et ONL) chez des souris *Per2^{Luc}* (Yoo et al. 2004) et enregistrée par bioluminescence l'expression de la protéine PER2::Luc dans chacune de ces couches mises en culture. Cette approche innovante a mis en évidence que ces 3 couches isolées présentaient une expression robuste et rythmique de PER2::Luc (**Figure 2.3**) avec des périodes endogènes (GCL : $\tau = 25.97 \pm 0.44$ h ; INL : $\tau = 26.25 \pm 0.51$ h ; ONL : $\tau = 26.32 \pm 0.56$ h) significativement supérieures à la période mesurée dans des explants de rétines entières ($\tau = 22.89 \pm 0.10$ h). Ce résultat a démontré la présence d'une horloge circadienne autonome dans chacune des couches (GCL, INL et ONL) de la rétine de souris.

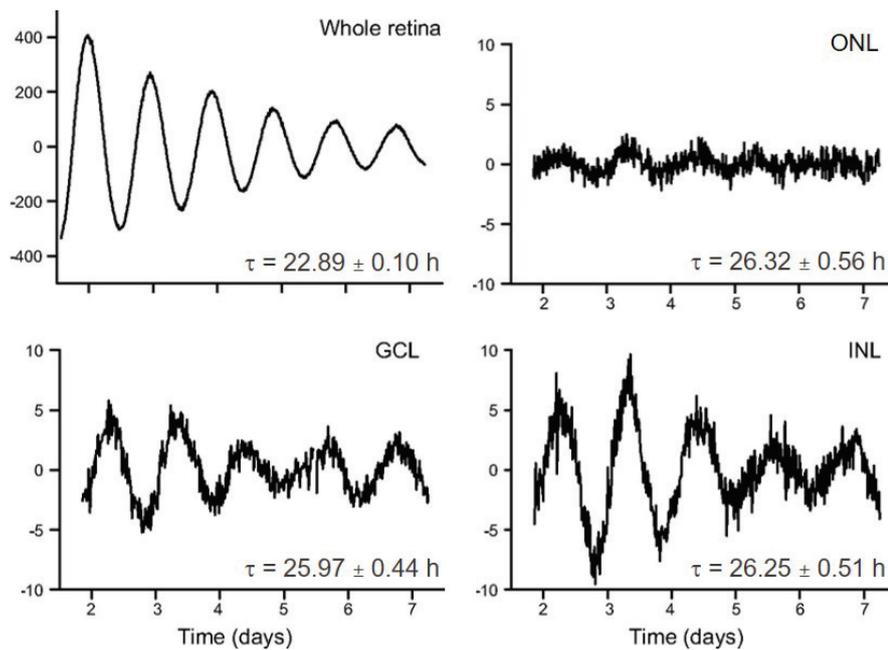


FIGURE 2.3 – Enregistrement de l'expression de PER2::Luc dans un explant de rétine entière et dans les couches isolées. Les couches sont isolées mécaniquement à l'aide d'un vibratome et l'expression de PER2::Luc est enregistrée par bioluminescence. Chaque couche (GCL, INL et ONL) présente une expression rythmique de PER2::Luc avec une période propre, différente de celle de la rétine entière. (Modifiée d'après Jaeger et al. 2015)

Pour étudier le couplage entre les couches, des cultures de différentes couches ont été réalisées. Lorsqu'une couche unique contenant la GCL et l'INL (GCL-INL) est mise en culture, elle présente une période endogène moyenne intermédiaire ($\tau = 23,36 \pm 0,10$ h) entre les périodes de ces couches isolées et la période des rétines entières. Une culture des couches INL-ONL a cependant une période équivalente ($\tau = 27,46 \pm 0,70$ h) à celle des couches isolées, indiquant que les couches INL et GCL sont plus fortement couplées que les couches INL et ONL.

Différents mécanismes de couplage ont été proposés : un couplage faisant intervenir les jonctions communicantes, les neurotransmetteurs ou neuropeptides. Néanmoins, l'application de DA, d'agonistes dopaminergiques (ADTN, quinpirole), d'antagonistes des récepteurs à la DA (sulpiride), ou de bloqueurs de la libération de DA (Tétrotoxine, reserpine, L-AMPT), ne modifie pas la période endogène des explants rétiniens adultes (Jaeger et al. 2015 ; Ruan et al. 2008). La glycine est le seul neurotransmetteur décrit qui modifie la période de la rétine entière, bien que cet effet soit très faible par rapport aux différences de période observées lorsque les couches rétinienne sont isolées mécaniquement (Jaeger et al. 2015). La modification des transmissions glutamatergique et GABAergique modifie l'amplitude du rythme de PER2::Luc sans affecter la période (Jaeger et al. 2015 ; Ruan et al. 2008). Le couplage entre les oscillateurs pourrait également mettre en jeu les jonctions communicantes entre les cellules, étant donné que des cellules rétinienne dissociées présentent une période endogène bien supérieure à celle des explants de rétine entière. Cependant, l'inhibition des jonctions communicantes par la carbenoxolone n'induit qu'une faible augmentation de la période (Jaeger et al. 2015).

Ces résultats démontrent la complexité du réseau d'horloges présentes dans la rétine. L'identification des facteurs de couplage est à son début et demeure fondamentale afin de comprendre les mécanismes de synchronisation des horloges de la rétine.

2.2.5 Effet de la délétion de gènes de l'horloge

L'utilisation de modèles transgéniques, invalidés pour un ou plusieurs gènes de l'horloge, a permis de caractériser le rôle de ces différents gènes dans le fonctionnement de l'horloge rétinienne. Tout d'abord, l'invalidation de certains gènes de l'horloge peut modifier l'expression d'autres gènes de l'horloge : cet effet varie en fonction du gène invalidé dans la rétine. Par exemple, la suppression de *Per3* ou *Cry2* entraîne une modification de la période d'expression de PER2::Luc alors que la suppression de *Per2* modifie la période de Per1::Luc. L'absence de *Per1*, *Cry1* ou *Clock* va abolir tout rythme de

PER2::Luc (Ruan et al. 2012). L'inactivation spécifique de *Bmal1* dans la rétine entraîne une perte de l'expression rythmique des gènes *Per1-2*, *Cry1*, *Rev-erba* et *Dbp* (Storch et al. 2007).

La délétion des gènes de l'horloge peut également affecter le développement de la rétine. En effet, les souris *Per2*^{-/-} présentent une réduction de l'épaisseur de la rétine et des modifications de sa vascularisation (Bhatwadekar et al. 2009, 2013 ; Jadhav et al. 2016) tandis que le double knockout *Per1*^{-/-}/*Per2*^{-/-} présente une diminution de l'expression des opsines de cônes SW et MW et une modification de la distribution spatiale des cônes (Ait-Hmyed et al. 2013). La même équipe a montré également que la suppression de *Rev-erba* conduit à l'augmentation (62 %) du nombre d'ipRGCs par comparaison à la souris *Wild-Type* (WT) et à une hypersensibilité à la lumière (Ait-Hmyed Hakkari et al. 2016). Une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG, qui correspond à la réponse électrique des cellules bipolaires, est également observée chez les souris *knockout* (KO) pour *Per2*, *Cry1/Cry2* ou *Bmal1* (Cameron et al. 2008 ; Jadhav et al. 2016 ; Storch et al. 2007) suggérant que la réponse électrique de la rétine est également régulée par l'horloge rétinienne.

Ces résultats montrent que bien que tous les gènes de l'horloge ne soient pas indispensables à la machinerie moléculaire de l'horloge rétinienne, son intégrité est essentielle au développement de la rétine et à son bon fonctionnement, notamment celui de la vision.

2.2.6 Maladies rétiniennes et lien avec l'horloge rétinienne

L'horloge rétinienne est également mise en jeu dans des contextes pathologiques.

Un exemple bien décrit est celui du diabète. En effet, des modèles de diabète de type 1 et 2 présentent des altérations, spécifiquement dans la rétine, de l'expression de gènes horloges dont *Clock*, *Bmal1*, *Per1-2*, *Cry1-2*, voire une perte de l'expression circadienne de *Per3* (Busik et al. 2009 ; Lahouaoui et al. 2016). Les rétines de souris diabétiques présentent également une atteinte de leur système dopaminergique avec une réduction du nombre de cellules amacrines dopaminergiques, une diminution de la libération de dopamine et de l'expression de la TH suite à un stimulus lumineux (Lahouaoui et al. 2014, 2016).

Si des pathologies rétiniennes induisent des modifications de la régulation génique de l'horloge, l'inverse est également vrai. En effet, des souris déficientes pour les gènes horloges *Bmal1* ou *Clock* présentent des déficiences oculaires telles qu'une augmentation de la prévalence de la cataracte, ainsi qu'une kératinisation, une inflammation et une vascularisation aberrante de la cornée (Kondratov et al. 2006 ; Yang et al. 2016). Des

mutations un gène *Clock* ou la suppression de *Bmal1* entraînent l'apparition d'un diabète de type 1 (Marcheva et al. 2010) tandis que les rétines de souris dont le gène *Per2* est invalidé présentent un phénotype semblable à celui de rétines de souris souffrant d'un diabète de type 2 (Bhatwadekar et al. 2009, 2013 ; Jadhav et al. 2016).

De plus, dans des cas de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Huntington ou dans le cas d'un glaucome, une perte des populations de photorécepteurs (cônes, bâtonnets et ipRGCs) est observée, ce qui a de possibles répercussions sur la régulation photique de l'horloge rétinienne et centrale (La Morgia 2016 ; Drouyer et al. 2008 ; Ouk et al. 2016).

Ces exemples montrent la proximité entre des perturbations de l'horloge rétinienne et des maladies rétinienne, montrant ainsi l'importance de l'étude de l'horloge circadienne de la rétine pour la compréhension des mécanismes causaux et des conséquences induites par des perturbations de l'horloge.

2.3 Réponse à la lumière de la rétine

2.3.1 Réception de l'information lumineuse

2.3.1.1 Opsines et sensibilité spectrale

La photoréception est la réaction qui permet la transformation de l'information lumineuse en information électrique au sein d'un photorécepteur par la modification des potentiels de membranes. Chez les mammifères, la détection des photons est réalisée grâce à des opsines, des protéines spécifiques à chaque photorécepteur : la rhodopsine pour les bâtonnets, les opsines SW et MW pour les cônes et la mélanopsine pour les ipRGCs.

Les opsines sont très conservées dans l'ensemble du monde animal, des insectes aux mammifères. Il s'agit de protéines transmembranaires faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, dont l'activation du récepteur par la lumière va entraîner l'activation de la protéine G. Les opsines sont liées au chromophore 11-cis-retinal, l'ensemble formé par ces deux molécules est appelé photopigment.

Chaque opsine présente une sensibilité spectrale spécifique correspondant à la capacité d'une opsine à absorber un photon selon sa longueur d'onde. La sensibilité maximale correspond à la longueur d'onde pour laquelle l'absorption du photon génère une réponse maximale. Chez la souris, les pics de sensibilité sont de respectivement 360 nm et 508 nm pour les cônes SW et MW (Jacobs et al. 1991 ; Sun et al. 1997), 498 nm pour les bâtonnets (Bridges 1959) et 480nm pour la mélanopsine (Lucas et al. 2001). L'absorption

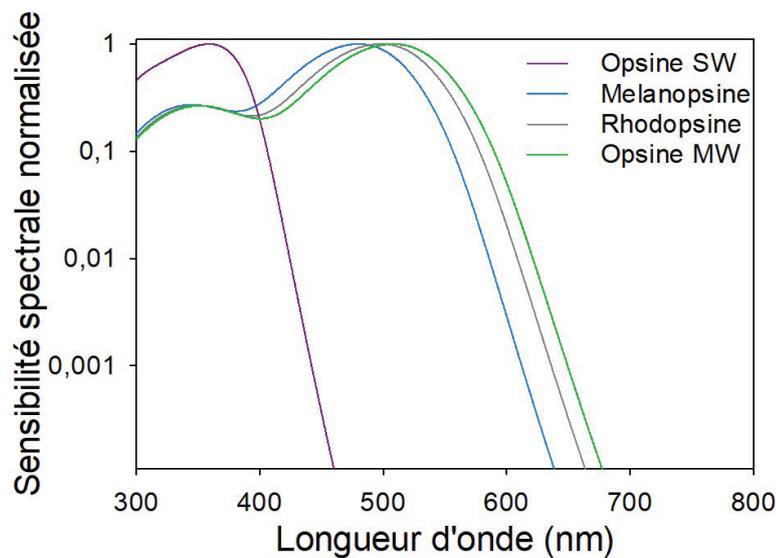


FIGURE 2.4 – **Sensibilité spectrale des différentes opsines de la rétine de souris.** Les courbes de sensibilité spectrale des opsines (Bridges 1959 ; Jacobs et al. 1991 ; Lucas et al. 2001 ; Sun et al. 1997) ou nomogrammes sont obtenues grâce à l'équation établie par Govardovskii et al. (2000).

d'un photon décroît à mesure que la longueur d'onde du photon s'éloigne (augmentation ou diminution) de la valeur maximale selon une courbe, nommée nomogramme (Figure 2.4), établi par Govardovskii et al. (2000).

2.3.1.2 Phototransduction au sein des bâtonnets et des cônes

La phototransduction a lieu dans les disques des segments externes des cônes et des bâtonnets, contenant une forte concentration d'opsines. Le mécanisme de la phototransduction des cônes étant similaire à celui des bâtonnets avec des protéines homologues, je prendrais l'exemple des bâtonnets pour en décrire le déroulement (Kefalov 2011).

À l'obscurité, les canaux cationiques de la membrane plasmique sont maintenus ouverts par la présence de GMP cyclique (GMPc) qui permet une entrée continue d'ions sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}). Cet influx de cation entraîne une dépolarisation constante de la membrane qui se traduit par une libération continue du neurotransmetteur des bâtonnets, le glutamate.

Lors d'une stimulation lumineuse, les photons vont être captés par la rhodopsine. Le rétinol va s'isomériser et induire un changement de conformation du *11-cis-rétinal* en *all-trans-rétinal*, ce qui provoque une cascade de réactions chimiques dans le photorécepteur. La rhodopsine va activer sa protéine G, une transducine, qui elle-même active une

phosphodiesterase. La phosphodiesterase hydrolyse le GMPc en 5'-GMP et conduit à la fermeture des canaux cationiques, stoppant les influx ioniques et entraînant une hyperpolarisation de la membrane. La libération de glutamate est alors diminuée, constituant le signal d'activation du bâtonnet (Fu et Yau 2007 ; Pepe 2001).

En parallèle, le *all-trans-retinal*, va être recyclé pour permettre un nouveau cycle de phototransduction. La voie la plus connue implique les cellules du RPE (**Figure 2.5A**). La liaison entre l'opsine (rhodopsine ou opsine des cônes) et le *all-trans-retinal* est hydrolysée. Ce dernier est ensuite transformé en *all-trans-retinol* par l'action d'une enzyme, la *all-trans-retinal* deshydrogénase. Le composé formé est transporté hors du segment externe du photorécepteur vers le RPE ou les cellules gliales de Müller. Au sein du RPE, le composé *all-trans-retinol* va être reconverti en *11-cis-retinal* par des voies enzymatiques indépendantes de la lumière, puis transporté dans le segment externe du photorécepteur, prêt à se lier de nouveau à une opsine (Lamb et Pugh 2004).

En outre, un cycle alternatif plus court permettant aux cônes de continuer de répondre en condition de lumière continue a été découvert au sein de la rétine et met en jeu les cellules de Müller (**Figure 2.5B**). Le *all-trans-retinol* est transporté dans les cellules de Müller puis converti en *11-cis-retinol*. Le *11-cis-retinol* est transféré dans le segment interne du cône où il va subir une oxydation en *11-cis-retinal*, complétant ainsi le recyclage (Arshavsky 2002 ; Mata et al. 2002 ; Wang et al. 2009 ; Wang et Kefalov 2011). Une étude récente a mis en évidence un mécanisme de recyclage, non enzymatique et lumière-dépendant du *all-trans-retinal* en *11-cis-retinal*. Ce mécanisme est localisé dans les segments externes des photorécepteurs de type cône et bâtonnet (**Figure 2.5C**) et implique la formation d'un complexe composé du *all-trans-retinal* et de la phosphatidylethanolamine (PE) : le *all-trans-N-retinylidene-PE* peut subir une photoisomérisation ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) conduisant à la forme *11-cis-retinal-N-retinylidene-PE*. Le *11-cis-retinal* est ensuite séparé de la PE et se lie à nouveau à l'opsine pour former un photopigment. Ce mécanisme a été démontré *in vitro* et *in vivo* chez la souris et le bœuf (Kaylor et al. 2017). Cette voie de recyclage permettrait donc de conserver une photosensibilité des cônes et des bâtonnets lors de stimulations lumineuses prolongées, même en absence de RPE.

2.3.1.3 Phototransduction des ipRGCs

Contrairement aux cônes et bâtonnets, la phototransduction dans les ipRGCs est semblable à celle des invertébrés : elle ne va pas conduire à une hyperpolarisation mais à une dépolarisation de la membrane plasmique générant *in fine* un potentiel d'action.

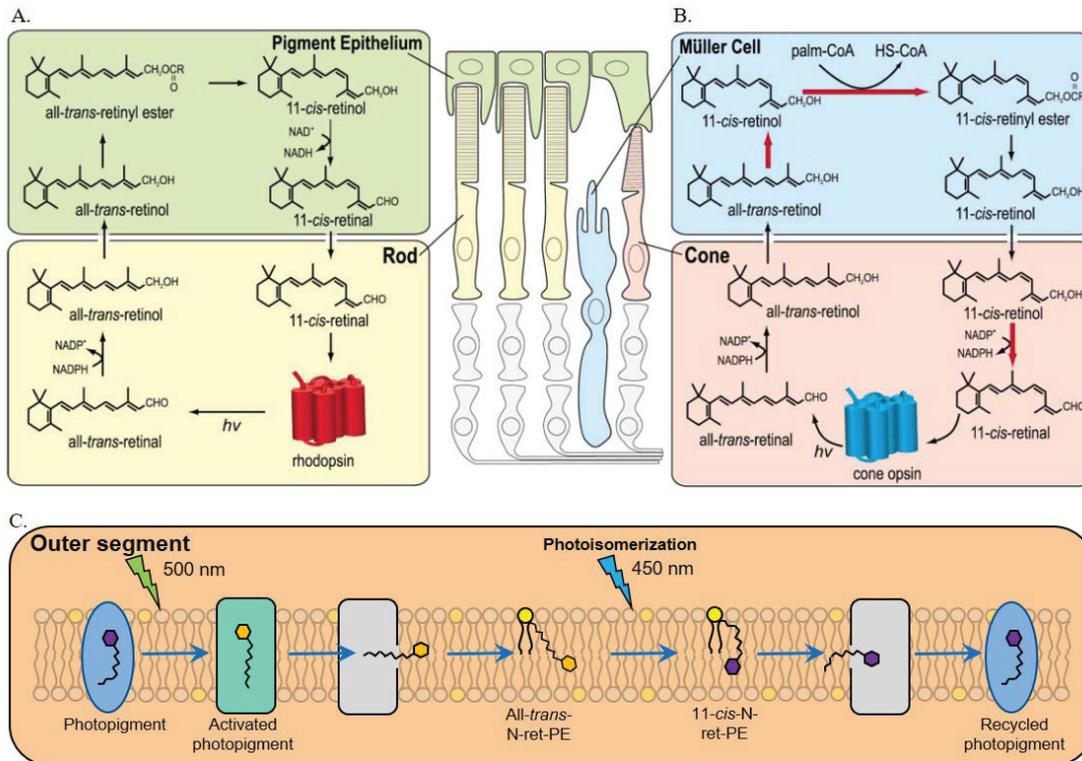


FIGURE 2.5 – Schéma récapitulatif des voies de recyclage du *11-cis-retinal*. A. Cycle visuel permettant le recyclage des opsines des bâtonnets et des cônes grâce au RPE. B. Cycle spécifique des cônes mettant en jeu les cellules de Müller (D'après Arshavsky 2002). C. Voie de recyclage nouvellement décrite au sein des segments externes de bâtonnets et de cônes, dépendante de la lumière et indépendante des cellules de Müller et du RPE. Voir le texte pour le détail des voies (D'après Kaylor et al. 2017). N-ret-PE = N-retinylidene-PE ; $h\nu$ = photon.

L'activation de la mélanopsine par l'absorption de photons va conduire au changement de conformation du *11-cis-retinal* en *all-trans-retinal*. La mélanopsine activée va ensuite induire l'action d'une protéine G de type Gq/11 qui stimule l'activité de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse du phosphoinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Ceci conduit à l'ouverture des canaux cationiques de la membrane plasmique et à un influx d'ions Ca^{2+} et Na^+ induisant une dépolarisation de la membrane plasmique (Hughes et al. 2012).

La mélanopsine est un photopigment bistable : elle présente un pic de photosensibilité dans le bleu à 480 nm et une fonction isomérase activée par une stimulation lumineuse dans le rouge autour de 590 - 620 nm. Sa régénération est donc dépendante de la lumière : une stimulation lumineuse autour de 620 nm permet de régénérer le photopigment et potentialiser les effets d'une lumière bleue (480 nm, Mure et al. 2007).

Cette régénération du photopigment pourrait ne pas être la seule voie de recyclage des photopigments dans les ipRGCs. En effet, une étude récente a conclu que le cycle visuel présent dans le RPE, via les cellules de Müller, serait indispensable pour que les ipRGCs répondent à des stimulations lumineuses prolongées (X. Zhao et al. 2016).

2.3.2 Transmission de l'information lumineuse par les cônes et les bâtonnets

Les informations lumineuses sont transmises dans la rétine selon différents canaux en fonction du photorécepteur réceptionnant la lumière.

Les cônes de type MW et SW possèdent les mêmes voies de transfert de l'information lumineuse, il n'y aura donc pas de distinction en fonction du type de cônes et je parlerais uniquement de la voie des cônes. Cette dernière est simple : les cônes présentent des contacts synaptiques avec les cellules bipolaires de cônes de type ON et OFF. À l'obscurité, le glutamate libéré par les cônes active les récepteurs ionotropiques des cellules bipolaires OFF, ce qui cause un influx d'ions sodiques et donc une dépolarisation. En réponse à la lumière, la libération de glutamate diminue et par conséquent la dépolarisation de la cellule bipolaire OFF également, rendant ainsi la cellule inactive. À l'obscurité, le glutamate libéré par les cônes active les récepteurs métabotropiques des cellules bipolaires ON conduisant à la fermeture des canaux cationiques et donc à une hyperpolarisation. À la lumière, la libération de glutamate par les cônes diminue, ainsi que l'hyperpolarisation de la cellule bipolaire ON, ce qui conduit *in fine* à son activation. Les bipolaires de cône ON et OFF contactent ensuite les cellules ganglionnaires correspondantes ON et OFF (Masland 2001 ; Nelson et Connaughton 2007)

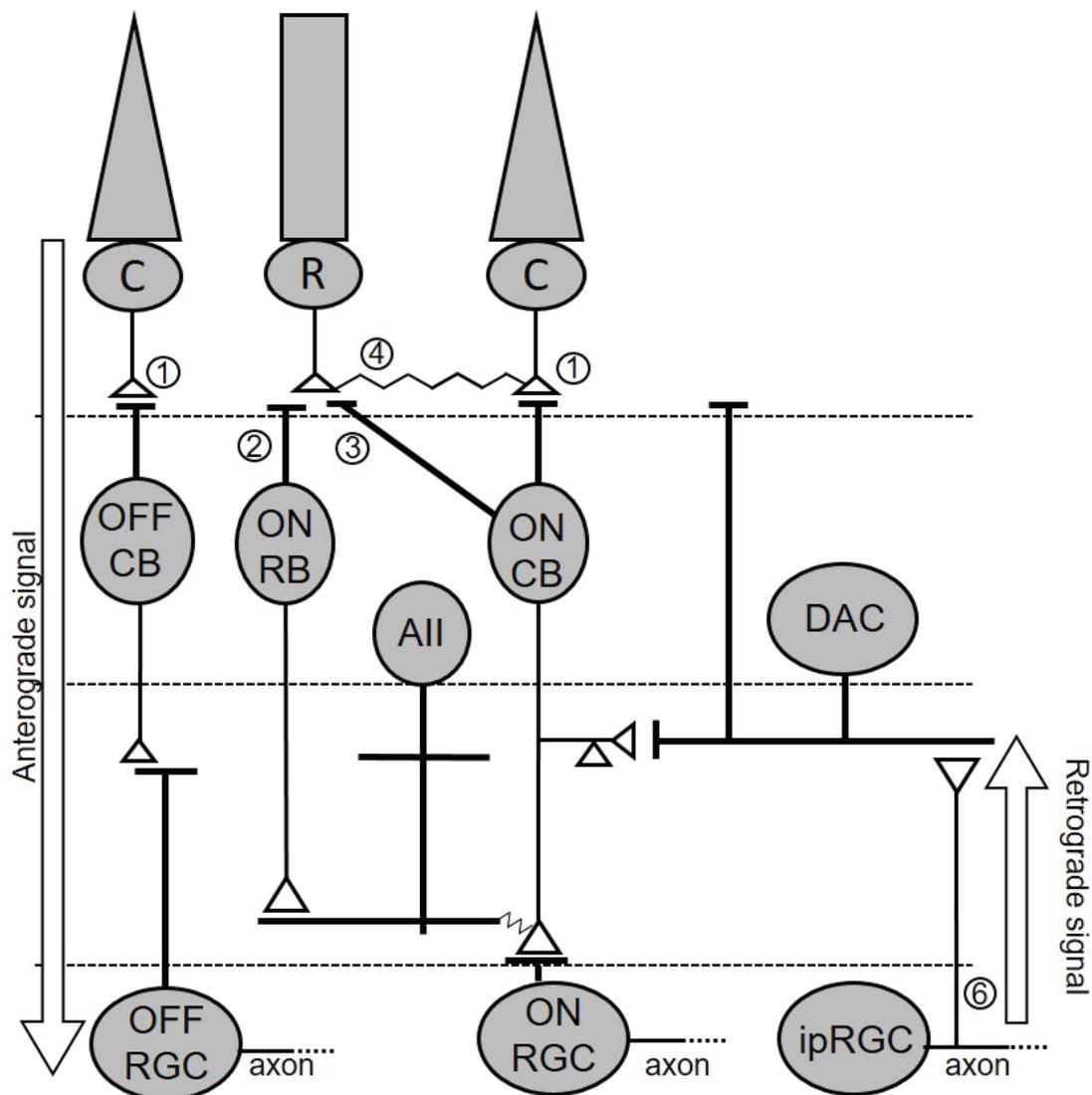


FIGURE 2.6 – Circuits de transmission de l'information lumineuse des cônes, bâtonnets et ipRGCs. Les cônes transmettent l'information lumineuse via les bipolaires de cônes puis les cellules ganglionnaires (1). L'information lumineuse issue des bâtonnets peut emprunter trois voies : soit (2) la voie classique à travers les bipolaires de bâtonnets, les cellules amacriques AII et les bipolaires de cônes, soit (3) en contactant directement les bipolaires de cônes, soit (4) en passant par la voie les cônes via les jonctions communicantes entre cônes et bâtonnets. Les ipRGCs transmettent directement l'information lumineuse reçue vers l'encéphale et forment des collatérales innervant les cellules amacriques dopaminergiques (6) (Voir le texte pour plus de détails sur ces différentes voies de transmission). Les triangles représentent l'élément pré-synaptique et les zigzags des jonctions communicantes. R = bâtonnets ; C = cônes ; CB = Cellule bipolaire de cône ; RB = Cellule bipolaire de bâtonnet ; AII = Cellule amacrine AII ; DAC = Cellule amacrine dopaminergique ; ipRGC = Cellule ganglionnaire à mélanopsine (Modifiée d'après X. Zhao et al. 2017).

La transmission de l'information lumineuse *via* les bâtonnets est plus complexe. Il existe une première voie dans laquelle les bâtonnets contactent les cellules bipolaires des bâtonnets. Ces cellules bipolaires vont transmettre l'information aux cellules amacrines AII qui sont connectées aux terminaisons des cellules bipolaires de cônes ON et OFF. Les cellules ganglionnaires de type ON et OFF sont ensuite contactées par les cellules bipolaires, les mêmes que pour la voie des cônes. Une deuxième voie des bâtonnets a été mise en évidence dans laquelle l'information lumineuse passe par les cellules bipolaires de cônes. Cette transmission se fait soit directement par un contact entre les bâtonnets et les cellules bipolaires de cône OFF (Hack et al. 1999 ; Soucy et al. 1998), soit par des synapses électriques entre cônes et bâtonnets (Nelson 1977 ; Schneeweis et Schnapf 1995 ; Smith et al. 1986). Ces deux voies montrent que les bâtonnets, apparus plus tardivement dans l'évolution que les cônes, s'appuient sur les réseaux de ces derniers pour transmettre l'information lumineuse (Masland 2001).

2.3.3 Transmission de l'information lumineuse par les ipRGCs

Les ipRGCs peuvent réceptionner directement l'information lumineuse grâce à la mélanopsine mais elles reçoivent également des informations issues des cônes et des bâtonnets. Cependant, les ipRGCs constituent le relais final de transfert de l'information vers l'encéphale afin de réguler de nombreuses fonctions non-visuelles à la lumière. En effet, chez des souris déficientes en mélanopsine, la constriction pupillaire en réponse à une stimulation lumineuse est diminuée, mais pas abolie, suggérant que la mélanopsine mais aussi les cônes et les bâtonnets sont impliqués dans la réponse pupillaire (Hatori et al. 2008). Cependant, le réflexe pupillaire est complètement aboli, tandis que les fonctions visuelles sont préservées (ERG, acuité visuelle), chez des souris exprimant la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de la mélanopsine et qui n'ont donc plus d'ipRGCs (Güler et al. 2008 ; Hatori et al. 2008).

Pendant longtemps, il a été considéré que la transmission de l'information lumineuse était unidirectionnelle, des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires. Récemment, des études anatomiques et fonctionnelles ont montré que l'information lumineuse réceptionnée par les ipRGCs peut également être transmise, de manière rétrograde aux cellules amacrines de l'INL. Une première preuve de l'existence d'une voie rétrograde de transmission de l'information lumineuse dans la rétine provient de données électrophysiologiques. En effet, l'exposition de cellules amacrines dopaminergiques à des stimulations lumineuses brèves (3 s), génèrent 2 profils de réponses : une 1^e population cellulaire présente une réponse transitoire avec un retour à l'activité de base avant la fin

de la stimulation, et une 2^e population présente une réponse soutenue, perdurant même après la fin de la stimulation. Lorsqu'un agoniste des récepteurs métabotropiques au glutamate de type mGluR6 (L-AP4), bloquant la transmission du signal nerveux entre photorécepteurs et cellules bipolaires de type ON, est appliqué, toute réponse transitoire disparaît alors que la réponse soutenue est préservée. Cependant, cette dernière peut être bloquée par l'application complémentaire d'un antagoniste glutamatergique, le DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione). Ce type de réponse soutenue étant caractéristique des ipRGCs, les auteurs ont ensuite établi un spectre d'action avec une sensibilité spectrale de ~ 480 nm (D.-Q. Zhang et al. 2008). L'implication des ipRGCs dans la réponse soutenue des cellules dopaminergiques à la lumière a été ensuite confirmée chez des souris déficientes en mélanopsine (D.-Q. Zhang et al. 2012). Ces données fonctionnelles ont été validées par des données anatomiques mettant en évidence que les cellules amacrines dopaminergiques sont contactées par des collatérales des axones des ipRGCs (**Figure 2.6**; Joo et al. 2013; Prigge et al. 2016). Les contacts synaptiques formés sont glutamatergiques et mettent en jeu les récepteurs AMPA (D.-Q. Zhang et al. 2008) et NMDA (L.-L. Liu et al. 2017). Une autre population de cellules amacrines, déplacées au sein de la GCL, reçoit également des informations issues des ipRGCs par l'intermédiaire de jonctions communicantes excitatrices (Reifler et al. 2015). Enfin, les ipRGCs M1d récemment décrits et dont les prolongements dendritiques s'étendent jusqu'à l'ONL pourraient également avoir une action rétrograde (Sondereker et al. 2017).

2.4 Entraînement et réponse à la lumière des horloges centrale et rétinienne

2.4.1 Horloge centrale

Il a longtemps été admis que l'information lumineuse en tant que synchronisateur du système circadien était détectée par les photorécepteurs "classiques", les cônes et les bâtonnets, puis transmise aux cellules ganglionnaires dont les axones projettent sur le SCN. Ce schéma classique a été remis en question lorsque dans les années 90, Freedman et al. (1999) et Lucas et al. (1999) ont montré que l'entraînement des rythmes circadiens et la constriction pupillaire par la lumière sont conservés chez des souris transgéniques dépourvues de cônes (*coneless* ou *Cl*) ou de bâtonnets (*rodless* ou *rd/rd*). Ces études ont suggéré que les photorécepteurs "classiques" ne sont pas essentiels à l'entraînement photique et que d'autres photopigments interviennent pour synchroniser l'horloge biologique avec son environnement lumineux.

En étudiant la constriction pupillaire de souris dépourvues de bâtonnets et de cônes (modèle *rd/rd cl*), en réponse à des stimulations lumineuses monochromatiques de différentes longueurs d'onde, il fut établi que le photorécepteur mis en jeu présentait un maximum de sensibilité à 479 nm (Lucas et al. 2001). En parallèle, Berson et al. (2002) ont identifié par un marquage rétrograde, un petit groupe de cellules ganglionnaires projetant au SCN chez le rat. L'enregistrement électrophysiologique de ces cellules a montré leur capacité à répondre à des stimulations lumineuses même lorsque la réponse électrique des cônes et des bâtonnets est bloquée pharmacologiquement. La mélanopsine, une opsine précédemment identifiée dans des mélanophores de xénopes (*Xenopus laevis*) (Provencio et al. 1998) fut finalement identifiée dans une sous-population de cellules ganglionnaires intrinséquement photosensibles ou ipRGCs (Hattar et al. 2002 ; Provencio et al. 2002). La démonstration de l'importance de la mélanopsine a été apportée par le développement de souris invalidées pour ce gène (*Opn4^{-/-}* ; Panda et al. 2002). Bien que la présence de mélanopsine ne soit pas indispensable pour la réponse à la lumière des rythmes circadiens, les réponses de décalage de phase comportementale par la lumière sont diminuées de 40% et la constriction pupillaire est incomplète chez les souris *Opn4^{-/-}* (Hattar et al. 2003 ; Panda et al. 2002 ; Ruby 2002). De plus, les souris triple KO, sans bâtonnets et cônes fonctionnels, et sans mélanopsine (*Gnat1^{-/-}* ; *Cnga3^{-/-}* ; *Opn4^{-/-}*) sont aveugles et présentent une perte de l'entraînement photique et toute réponse pupillaire (Hattar et al. 2003 ; Panda et al. 2003). Goz et al. (2008) ont développé une immunotoxine spécifique, la saporine qui détruit de 60 à 70% des ipRGCs. Ils ont observé que la perte importante de ces cellules atténue la photosensibilité du système circadien et que certains animaux ne présentent plus la capacité à être entraînés au cycle LD. Une autre étude confirme que l'ablation génétique des ipRGCs chez les souris *Opn4^{aDTA/+}* provoque la perte totale de toute réponse du système circadien à la lumière (Güler et al. 2008 ; Hatori et al. 2008) par comparaison au souris *Opn4^{-/-}* (Lucas et al. 2003 ; Panda et al. 2002 ; Ruby 2002).

Malgré le rôle important des ipRGCs, les photorécepteurs « classiques », cônes et bâtonnets contribuent également à la réponse à la lumière de l'horloge centrale du SCN. Cependant, ces différents photorécepteurs ont une sensibilité spectrale très proche, ce qui complexifie la détermination de leur contribution chez la souris sauvage. L'utilisation de modèles murins transgéniques KO et *knockin* (KI) a permis de simplifier le système de photoréception afin de disséquer le rôle respectif des photorécepteurs. Chez un modèle de souris dépourvus de cônes MW, l'entraînement du rythme de l'activité locomotrice et le décalage de phase comportemental sont altérés (Dkhissi-Benyahya et al. 2007 ; Dollet et al. 2010) et l'induction de *Per1* et *Per2* est réduite (Dollet et al. 2010) suggérant une

diminution de la sensibilité du système circadien à la lumière liée à l'absence des cônes MW. Ces résultats viennent d'ailleurs contredire une étude plus ancienne qui n'avait pas observé de différence de sensibilité en absence de tous cônes (Freedman et al. 1999). Un modèle murin KI a été développé chez lequel l'opsine MW a été remplacée par l'opsine humaine LW ayant un pic de sensibilité à 555 nm (*Opn1mwR*; Smallwood et al. 2003). Ainsi, les pics de sensibilité des cônes MW et des bâtonnets sont plus éloignés, permettant de disséquer le rôle respectif de chacun en utilisant des lumières monochromatiques. Les auteurs montrent que les souris *Opn1mwR* présentent une sensibilité plus importante de la constriction pupillaire et du décalage de phase comportemental à 500 nm suggérant un rôle prépondérant des bâtonnets par rapport aux cônes (Lall et al. 2010).

En résumé, les données actuelles convergent vers un modèle où les trois types de photorécepteurs, cônes, bâtonnets et ipRGCs, sont impliqués dans la régulation de la réponse à la lumière de l'horloge centrale du SCN (**Figure 2.7**). Chacun de photorécepteurs encode différents paramètres de la lumière. Les cônes participent à la réponse à partir de niveaux de lumière mésopiques, tandis que des niveaux photopiques sont nécessaires pour mettre en jeu les ipRGCs. Les bâtonnets répondent à des niveaux scotopiques mais également à des intensités plus élevées en passant par la voie des cônes, via les jonctions communicantes (Altimus et al. 2010).

2.4.2 Horloge rétinienne

2.4.2.1 La lumière comme synchronisateur de l'horloge rétinienne

L'effet synchronisateur de la lumière sur l'horloge rétinienne est connu depuis la toute première démonstration de l'existence de cette dernière (Tosini et Menaker 1998). En effet, l'exposition d'explants rétiniens à des cycles inversés de lumière montre un entraînement du rythme de la libération de mélatonine (**Figure 2.2**). Cependant, et contrairement au SCN, les caractéristiques de réponse à la lumière et les photorécepteurs impliqués dans cet entraînement ont été peu étudiés jusqu'à récemment.

L'effet de la lumière sur l'horloge rétinienne a d'abord été évalué en quantifiant l'induction des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2* suite à une stimulation lumineuse. Après une stimulation de lumière blanche, le gène *Per1* est induit entre CT2 et CT14 et *Per2* uniquement à CT2 (Namiyama et al. 2001), tandis qu'une stimulation lumineuse monochromatique (480 nm) à CT16 induit *Per1* et *Per2* dans la rétine (Lahouaoui et al. 2014, 2016). La disparité entre ces résultats pourrait s'expliquer par l'utilisation d'approches

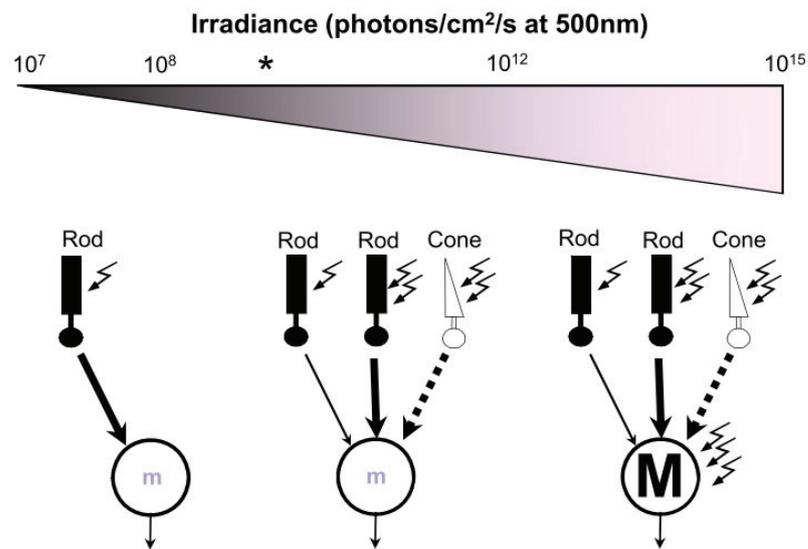


FIGURE 2.7 – Modèle de contribution des photorécepteurs rétiniens dans la réponse à la lumière de l'horloge centrale du SCN à différents niveaux de lumière. A un niveau de lumière scotopique, seuls les bâtonnets contribuent à la réponse à la lumière de l'horloge centrale via la voie classique des bâtonnets. À un niveau de lumière mésopique, les cônes contribuent en addition des bâtonnets. À un niveau photopique, les trois types de photorécepteurs sont mis en jeu. m : faible contribution des ipRGCs et M = forte contribution des ipRGCs, flèche = lumière D'après Lall et al. 2010.

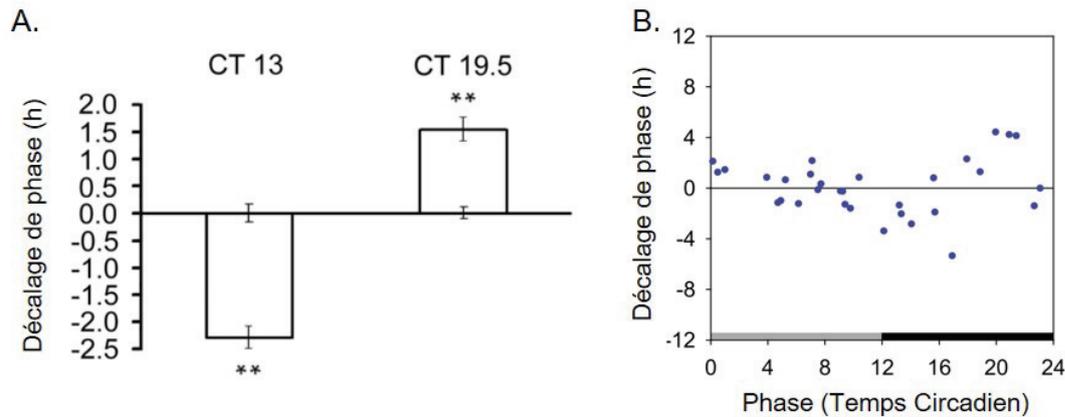


FIGURE 2.8 – **Induction d'un décalage de phase de l'horloge rétinienne par la lumière.** A. Une stimulation de lumière blanche (500 lux, 1h) induit un décalage de phase dépendant du CT auquel la stimulation est appliquée (Ruan et al. 2008). B. L'horloge rétinienne répond à une stimulation monochromatique (475 nm, 10^{15} photons/cm²/s, 3h) selon une PRC (retard ou avance de phase lorsque la stimulation est appliquée soit en début, soit en fin de nuit biologique ; Buhr et Van Gelder 2014).

(hybridation *in situ* et qPCR) et de modèles différents (rat Wistar et souris C57Bl/6J).

Le développement d'une part de modèles animaux porteurs d'un gène rapporteur bioluminescent et d'autre part la culture d'explants de rétine adulte a permis une avancée majeure dans l'étude de la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne. La première expérience réalisée par Ruan et al. (2008) a évalué l'effet de la lumière sur l'horloge rétinienne en mesurant le décalage de phase en fonction du CT. Des explants de rétines de souris *Per2^{Luc}* ont été exposés à des stimulations de lumière blanche (500 lux) d'une heure, appliquées à CT13 et CT19,5 soit respectivement au début et à la fin de la nuit biologique. Ces stimulations ont induit un retard à CT13 et une avance à CT19,5 de la phase de *PER2::Luc* (Ruan et al. 2008 ; **Figure 2.8A**). En utilisant un protocole semblable mais avec de la lumière monochromatique (475 nm), Buhr et Van Gelder (2014) ont stimulé des explants rétiniens à différents CT sur un cycle complet (**Figure 2.8B**) et ont établi que l'horloge rétinienne répond à la lumière selon une PRC classique (Buhr et Van Gelder 2014), comparable à celle décrite pour le SCN.

Le mécanisme par lequel la lumière agit sur la phase de l'horloge rétinienne met en jeu la DA. En effet, en absence du récepteur de type D2 de la DA, présent au niveau des photorécepteurs, l'induction de *Per1* est fortement réduite en réponse à une stimulation lumineuse. Les auteurs ont proposé que cet effet est lié à l'activation de la voie MEK qui, *in fine*, active la transcription de *Per1* (Yujnovsky et al. 2006). Une étude suivante a

abouti à des conclusions partiellement contradictoires en combinant des stimulations lumineuses (lumière blanche, 500 lux) et l'application d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques lors d'enregistrement de l'expression de PER2::Luc d'explants rétiniens. En effet, l'induction d'un décalage de phase de PER2::Luc est réduit lors de l'application d'un antagoniste des récepteurs D1 mais aucun effet n'est observé lors d'ajout d'un antagoniste des récepteurs D2. Le décalage de phase résulterait donc en partie des récepteurs D1 (Ruan et al. 2008). Cette divergence montre que le rôle de la DA sur l'horloge rétinienne n'est pas complètement établi et reste un sujet à explorer.

Ces approches utilisant pour la plupart de la lumière polychromatique blanche ont permis d'établir la capacité de l'horloge rétinienne à répondre à la lumière mais ne renseignent pas sur le(s) photorécepteur(s) responsables de cet effet.

2.4.2.2 Rôles des photorécepteurs

Contrairement à l'horloge centrale du SCN dont l'entraînement photique met en jeu les cônes, les bâtonnets et les ipRGCs (**Section 2.4.1**), l'identité de(s) photorécepteur(s) impliqué(s) dans la régulation par la lumière de l'horloge rétinienne demeure controversée et peu explorée. Pour étudier cette question, deux stratégies sont possibles : l'utilisation de lumières monochromatiques qui permettent de cibler préférentiellement un ou plusieurs photorécepteurs en fonction de leurs sensibilités spectrales, et l'utilisation de modèles génétiques déficients en un ou plusieurs photorécepteurs (**Voir Stratégies expérimentales**).

Compte tenu des données fonctionnelles et anatomiques mettant en évidence l'existence d'une voie rétrograde de transmission de l'information lumineuse au sein de la rétine et impliquant les ipRGCs (**Section 2.3.3**), notre équipe a analysé l'induction des gènes de l'horloge et de la DA par une stimulation lumineuse à 480 nm (Dkhissi-Benyahya et al. 2013) chez des souris sauvages et déficientes en mélanopsine (*Opn4^{-/-}*). Chez les souris *Opn4^{-/-}*, la lumière est incapable d'induire la libération de DA et l'induction des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2* au niveau de la rétine externe (ONL). L'induction de *Per1* et *Per2* est à l'inverse conservée dans la rétine interne (GCL + INL). Ces résultats suggèrent que la mélanopsine, *via* la voie rétrograde, est impliquée dans l'induction par la lumière des gènes de l'horloge dans la couche des photorécepteurs.

Plus récemment, le rôle des différents photorécepteurs dans l'entraînement de l'horloge rétinienne a été analysé chez des souris *Per2^{Luc}* (Buhr et Van Gelder 2014). Deux groupes d'explants rétiniens ont été soumis à 2 cycles de lumière/obscurité (9L/15D), de lumière

blanche en antiphase (décalage de 12h) (**Figure 2.9A**). Après quatre jours d'exposition à ces cycles de lumière, l'expression de PER2::Luc est enregistrée par bioluminescence et les oscillations observées sont en antiphase pour les 2 groupes, démontrant que l'horloge rétinienne est entraînée au cycle de lumière imposé (**Figure 2.9B**). L'expérience a ensuite été réalisée chez des souris *Per2^{Luc}::Opn4^{-/-}::rd1/rd1* déficientes en mélanopsine et dont les cônes et les bâtonnets dégénèrent progressivement (*rd1/rd1*). Malgré l'absence de toutes les classes de photorécepteurs, les rétines sont entraînées au cycle lumineux imposé (**Figure 2.9C**). Les auteurs ont donc conclu à l'existence d'un autre type de photorécepteur dans la rétine, responsable de l'entraînement de l'horloge rétinienne par la lumière. En effet, en l'absence de neuropsine (OPN5), les explants rétiniens de souris *Opn5^{-/-}* ne sont plus entraînés aux cycles de lumière en anti-phase (**Figure 2.9D**). D'après ces auteurs, la neuropsine est la seule opsine responsable de l'entraînement par la lumière de l'horloge rétinienne de mammifères (Buhr et al. 2015). Cependant, cette étude présente plusieurs biais expérimentaux qui seront discutés en détail dans la discussion.

Chez les mammifères, la neuropsine a été identifiée en 2003 en comparant les séquences caractéristiques des opsines avec tout le génome humain et murin (Tarttelin et al. 2003). Selon les études, la neuropsine a été détectée dans les testicules, la peau d'oreille, l'encéphale, l'œil, le RPE, la cornée et au niveau de la rétine, plus précisément dans les cellules ganglionnaires, amacrines et horizontales (Buhr et al. 2015 ; Kojima et al. 2011 ; Tarttelin et al. 2003). La neuropsine humaine et murine présente une sensibilité maximale à la lumière UV ($\lambda_{\max} = 380$ nm). Il a été également montré que la neuropsine présentait une propriété de bistabilité semblable à celle de la mélanopsine et était couplée aux protéines Gi (Kojima et al. 2011). Cependant, chez les mammifères, les niveaux d'expression de la neuropsine restent très faibles dans la rétine et aucune fonction ne lui a été associée chez les mammifères avant l'étude de Buhr et al. (2015).

En résumé, l'horloge rétinienne demeure relativement peu connue en comparaison des connaissances accumulées au sujet de l'horloge centrale. En particulier, la synchronisation par la lumière de l'horloge rétinienne et les photorécepteurs impliqués demeurent des sujets controversés.

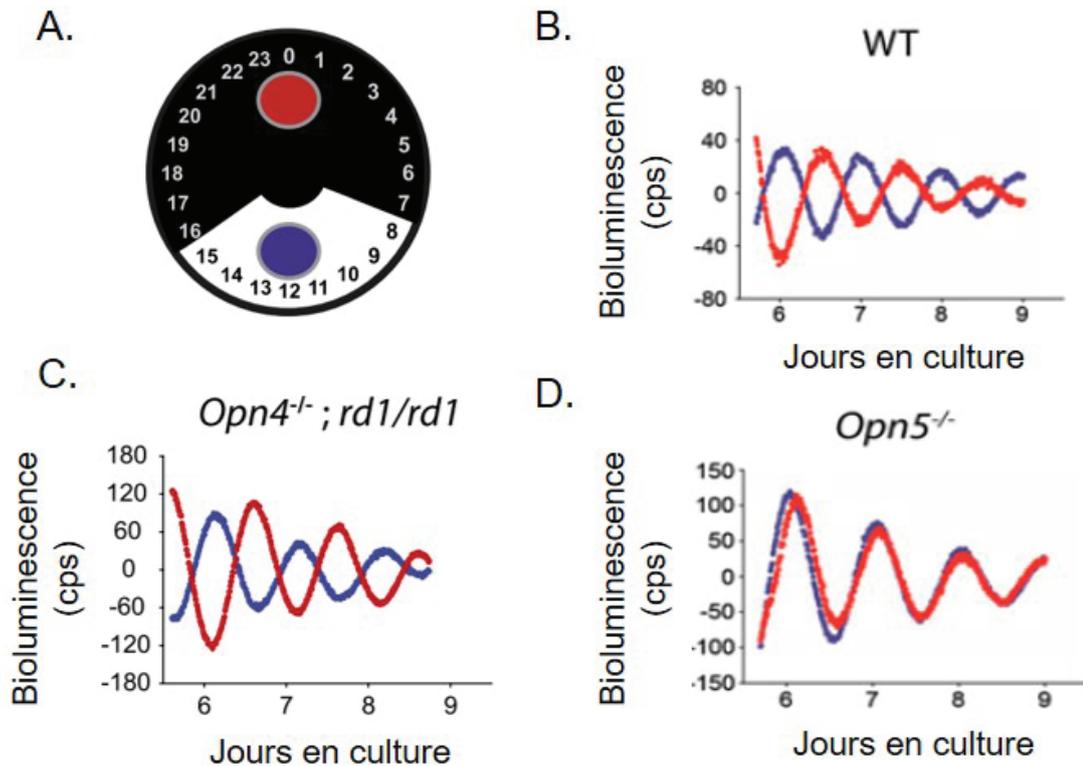


FIGURE 2.9 – **Entraînement de l'horloge rétinienne par un cycle 9L/15D de lumière blanche.** A. Dispositif de stimulation lumineuse dans lequel un explant rétinien en culture est placé à chacune des positions colorées (rouge et bleue). La zone noire correspond à la zone où la lumière est bloquée, la rétine est donc à l'obscurité. Dans la zone blanche, les explants rétiniens sont exposés à une lumière blanche. La plaque sur laquelle sont posés les explants tourne avec une période de 24 h, ce qui permet d'appliquer un cycle 9L/15D pendant 4 jours aux rétines. B. Tracés de bioluminescence de 2 explants rétiniens de souris *Per2^{Luc}* soumis à ce dispositif lumineux. Quel que soit le cycle, l'expression de *PER2::Luc* est entraînée par la lumière avec des oscillations en anti-phase. C. Malgré l'absence de la mélanopsine, des cônes et des bâtonnets, l'expression de *PER2::Luc* est toujours entraînée aux cycles lumineux en anti-phase. D. En absence de neuropsine, aucun entraînement de l'expression de *PER2::Luc* par la lumière est observé. Modifié d'après Buhr et Van Gelder 2014 ; Buhr et al. 2015.

Objectifs et stratégies expérimentales

3.1 Objectifs de la thèse

Buhr et al. (2015) attribuent l'entraînement de l'horloge rétinienne uniquement à la neuropsine et ignorent les données anatomiques et fonctionnelles mettant en avant un rôle de la mélanopsine (Dkhissi-Benyahya et al. 2013 ; D.-Q. Zhang et al. 2012, 2008). Cependant, ces résultats posent un certain nombre de questions théoriques et pratiques. En particulier, les stimulations lumineuses appliquées sont très longues (3 h) et de fortes irradiances (10^{15} photons/cm²/s), ce qui peut induire une phototoxicité de la rétine ou conduire à une saturation de la réponse mesurée ne permettant pas de détecter de différences dans la réponse selon les conditions appliquées. De plus, l'utilisation principalement d'une lumière blanche dans ces expérimentations ne représente pas l'approche la plus adaptée pour étudier le rôle des photorécepteurs compte tenu de leurs sensibilités spectrales proches.

Afin de résoudre la question du rôle des différents photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne, ma thèse s'est articulée autour de trois objectifs :

1. **Mettre au point un protocole standardisé de culture et de calcul des paramètres fondamentaux de l'horloge rétinienne *in vitro***

L'étude de Buhr et Van Gelder (2014) a montré en 2014 que l'effet de la lumière sur la phase de l'horloge rétinienne est dépendante de son heure biologique. Il est donc essentiel pour pouvoir comparer différentes stimulations lumineuses que celles-ci soient appliquées au même temps circadien. Nous avons donc développé une méthode objective permettant de calculer l'heure biologique de chaque explant rétinien en culture et plus précisément, les CT du pic et du creux d'une

oscillation de PER2::Luc.

2. Déterminer *in vitro* la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne et les photorécepteurs impliqués

L'étude de l'effet de la lumière sur l'horloge rétinienne n'en étant encore qu'à ces débuts avec seulement deux études publiées au début de ma thèse, une première étape a été d'optimiser les paramètres de la stimulation lumineuse (irradiance et durée) *in vitro*. Une fois les conditions et paramètres des stimulations lumineuses optimisés, nous avons ensuite étudié le rôle des différents photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne.

Pour cela, des explants de rétine de souris KI *Per2^{Luc}* et de souris *Per2^{Luc}* déficientes en un type de photorécepteur ont été exposés à des stimulations lumineuses monochromatiques de différentes longueurs d'onde, *in vitro*. Le décalage de phase de PER2::Luc induit par la stimulation a été mesuré et comparé dans les différentes conditions.

3. Identifier l'horloge « maître » de la rétine répondant à la lumière : approche *in vivo*

Une horloge indépendante a été décrite dans chaque couche de la rétine. Afin d'évaluer l'existence d'une horloge « maître », principale cible de la lumière et assurant la synchronisation des oscillateurs rétiniens secondaires, l'approche *in vitro* ne peut être utilisée. En effet, elle ne permet pas de distinguer le signal de bioluminescence issu des différentes couches de la rétine car le luminomètre utilisé enregistre le signal global de bioluminescence émis par la rétine et ne présente pas de résolution spatiale.

Nous avons exposé des souris sauvages ou déficientes en un type de photorécepteur à des stimulations monochromatiques ciblant préférentiellement un type de photorécepteur. Les différentes couches ont été ensuite isolées par microdissection au laser et l'induction par la lumière des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2*, ainsi que le marqueur d'activité neuronale *c-Fos*, a été analysé par réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel ou *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) dans chaque couche.

3.2 Stratégies expérimentales

3.2.1 Approche *in vitro* : intérêt de la bioluminescence

3.2.1.1 La souris *Per2^{Luc}*

Cette lignée de souris KI *Per2^{Luc}* (Yoo et al. 2004) possède le transgène de la luciférase, une enzyme retrouvée notamment chez la luciole et qui entraîne l'émission d'un signal de bioluminescence en présence de son substrat, la luciférine. Ce gène rapporteur est couplé au gène de l'horloge *Per2*, permettant la synthèse d'une protéine de fusion, composée de la protéine d'horloge PER2 et de la luciférase (Luc) (Figure 3.1).

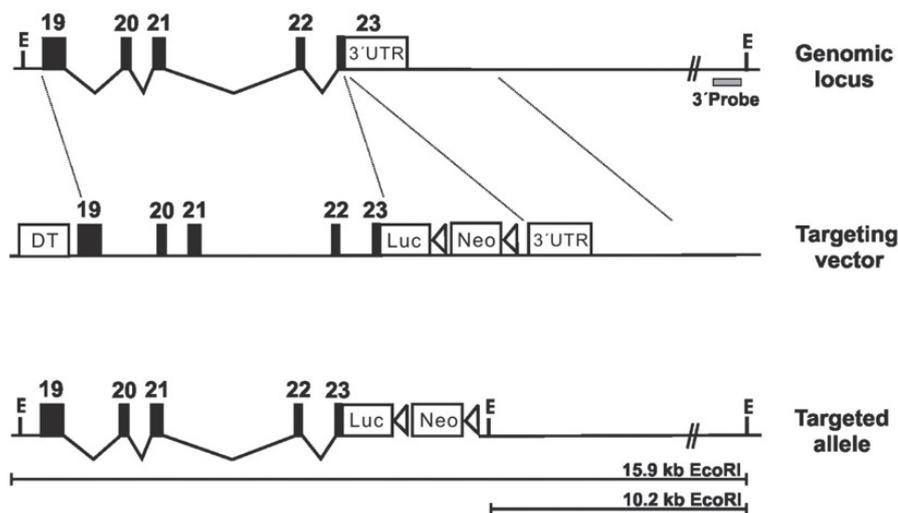


FIGURE 3.1 – Représentation schématique du transgène de la lignée *Per2^{Luc}*. Diagramme du locus génomique de *Per2*, du vecteur contenant le gène modifié et de l'allèle muté. La séquence codante de la luciférase a été insérée à la suite du dernier exon n°23 du gène *Per2*. Ainsi, lors de la transcription de *Per2*, le gène de la luciférase est également exprimé et la protéine obtenue sera composée des protéines PER2 et Luc. E = enzyme de restriction EcoRI ; DT, toxine diphtérique ; Neo = gène de résistance à la néomycine ; rectangles noirs = exons de *Per2* ; triangle = site loxP ; 3'UTR = Région 3' non traduite (d'après Yoo et al. 2004).

La réaction d'oxydation de la luciférine par la luciférase se fait selon la formule indiquée dans la figure 3.2.

3.2.1.2 Intérêt du modèle

La création de lignées de souris transgéniques, possédant un gène rapporteur régulé par un gène de l'horloge, a permis un essor considérable de l'étude des horloges circadiennes *in vitro*. Cette technique présente l'avantage de suivre et de quantifier, sur le même

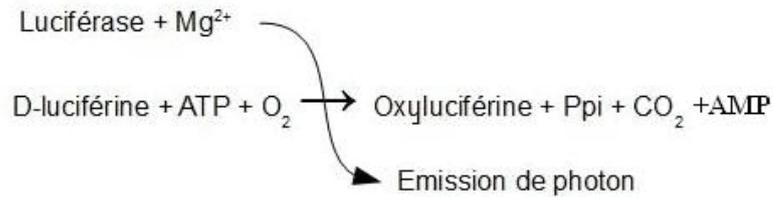


FIGURE 3.2 – **Équation de la réaction de bioluminescence.** La luciférase catalyse l'oxydation de son substrat, la luciférine, en consommant une molécule d'adénosine tri-phosphate (ATP) et de dioxygène (O_2). Cela entraîne la production de lumière (~ 612 nm, H. Zhao et al. 2005), d'une molécule d'adénosine mono-phosphate (AMP), de pyrophosphate (Ppi) et de dioxyde de carbone (CO_2) (d'après Welsh et Noguchi 2012).

tissu, le fonctionnement moléculaire d'une horloge circadienne sur une longue période de temps (**Figure 3.3**) et d'observer directement les changements de la phase ou de la période, induits par différentes molécules pharmacologiques ou par des stimulations lumineuses. Dans le cas de l'horloge rétinienne, cela était auparavant difficile avec les techniques habituellement utilisées pour quantifier l'expression des gènes/protéines de l'horloge (RT-qPCR, hybridation *in situ*, Western-blot, immunohistochimie, RNA-seq, etc.). De plus, la présence de la protéine de fusion n'affecte pas les différents paramètres du système circadien : les souris $Per2^{Luc}$ présentent un rythme de l'activité locomotrice, une période endogène, une capacité d'entraînement et de décalage de phase comportemental induit par la lumière identiques aux souris WT (Yoo et al. 2004).

La construction $Per2^{Luc}$ présente plusieurs avantages supplémentaires. D'une part, contrairement à d'autres constructions ($Per1-luc$, Yamazaki et al. 2000), la luciférase est exprimée et dégradée avec la même cinétique que la protéine PER2, représentant donc fidèlement son rythme d'expression. D'autre part, le gène $Per2$ est l'un des seuls gènes de l'horloge dont l'expression est induite par la lumière dans le SCN et dans la rétine (Dkhissi-Benyahya et al. 2013 ; Shigeyoshi et al. 1997 ; Yan et al. 1999 ; Yujnovsky et al. 2006), ce qui en fait un modèle d'autant plus intéressant pour analyser les réponses à la lumière de l'horloge rétinienne *in vitro*.

3.2.1.3 Mesure de bioluminescence dans la rétine

Nous avons utilisé des explants rétiniens de souris $Per2^{Luc}$ en culture, placés dans un luminomètre nommé « Lumicycle » (Actimetrics). Cet appareil peut enregistrer jusqu'à 32 boîtes de culture simultanément grâce à 4 tubes photomultiplicateurs (PMT) qui intègrent l'émission de bioluminescence des échantillons pendant 1 minute toutes les

dix minutes, ce qui donne une très bonne résolution temporelle de 6 points horaires. Pour le détail du protocole utilisé, se reporter à la session correspondante dans le « Matériels et méthodes » (Section 4.2.1).

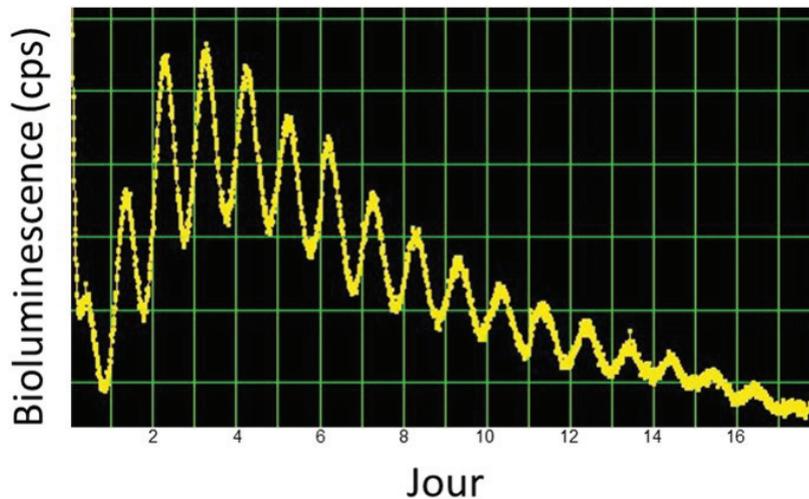


FIGURE 3.3 – Exemple d’enregistrement de bioluminescence d’un explant rétinien de souris $Per2^{Luc}$ sans changement de milieu.

La rétine étant un tissu photosensible, il était pertinent de vérifier si la lumière émise par la protéine de fusion PER2::Luc affecte le fonctionnement de l’horloge de la rétine. Pour cela, Ruan et al. (2008) ont enregistré des explants rétiniens non supplémentés en luciférine (pas d’émission de bioluminescence) pendant 2 cycles circadiens. De la luciférine a ensuite été ajoutée au milieu de culture des explants expérimentaux. L’ajout retardé de luciférine dans le groupe expérimental par comparaison à des explants contrôles ne modifie ni l’amplitude ni la phase d’expression de PER2::Luc, suggérant que la lumière émise par bioluminescence n’affecte pas le rythme rétinien de PER2::Luc (Ruan et al. 2008). De plus, les photons émis par bioluminescence à 37°C ont une longueur d’onde d’ ~ 612 nm (H. Zhao et al. 2005), ce qui est très éloigné des maximums de sensibilités spectrales des photorécepteurs rétiniens.

3.2.2 Approche *in vivo* : intérêt de la microdissection des différentes couches de la rétine

L’étude *in vivo* de l’effet de la lumière sur l’horloge rétinienne est rendue complexe par l’existence d’au moins une horloge dans chacune des couches rétiniennes. L’approche *in vitro* précédemment décrite ne présente pas de résolution spatiale permettant de distin-

guer la bioluminescence émise par chaque couche. Pour disséquer le réseau d'horloges et sa réponse à la lumière, nous avons donc choisi de séparer les différentes couches nucléaires de la rétine par microdissection laser après une stimulation lumineuse réalisée *in vivo* chez l'animal. Cette approche *in vivo* permet également de prendre en compte toutes les régulations présentes dans un animal entier.

Des souris sauvages WT, sans mélanopsine ou sans cônes MW (respectivement *Opn4^{-/-}* et *TRβ^{-/-}*, voir **section 3.2.4**), ont été stimulées par des lumières monochromatiques (360, 480 et/ou 530 nm), à une irradiance et une durée précédemment décrite comme suffisante pour induire les gènes *Per* dans les couches isolées de la rétine (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). Un groupe contrôle pour chaque lignée n'a pas été exposé à la lumière (Dark Control ou DC). Nous avons ensuite séparé l'ONL, l'INL et la GCL par microdissection laser et quantifié les ARNm de nos gènes d'intérêt.

Nous avons pu ainsi analyser, dans un premier temps, l'effet des différentes stimulations lumineuses sur l'induction des gènes dans les différentes couches de la rétine et dans un deuxième temps évaluer l'effet de l'absence d'un des photorécepteurs sur cette réponse. Nous nous sommes focalisés sur les gènes de l'horloge *Per1* et *Per2*, et le marqueur d'activité neuronale *C-Fos*. Les deux premiers présentent le double intérêt de faire partie des principaux gènes de l'horloge et d'être induits par la lumière (Dkhissi-Benyahya et al. 2013 ; Lahouaoui et al. 2014, 2016 ; Yujnovsky et al. 2006). *C-Fos* permet de confirmer l'activation des neurones en réponse à une stimulation lumineuse et présente, de plus, une gamme d'induction plus importante que celles des gènes de l'horloge (Dkhissi-Benyahya et al. 2000 ; Lahouaoui et al. 2014, 2016).

3.2.3 Stimulations lumineuses monochromatiques

Pour déterminer le rôle respectif des différents photorécepteurs dans la réponse à la lumière des horloges, une approche classique en photobiologie consiste à utiliser des stimulations lumineuses monochromatiques ciblant préférentiellement un ou plusieurs photorécepteurs en fonction de leur sensibilité spectrale (Voir **section 2.3.1.1**). Trois longueurs d'onde ont été sélectionnées : ~380 nm proche des maximums de sensibilité de la neuropsine et de l'opsine SW des cônes, ~480 nm proche de celui de la mélanopsine et ~520 nm proche de ceux de l'opsine MW des cônes et de la rhodopsine, et excluant toute réponse de la neuropsine et des cônes SW.

3.2.4 Modèles murins dépourvus de photorécepteurs

Disséquer le rôle respectif de chaque photorécepteur par l'approche décrite ci-dessus est cependant complexe chez la souris sauvage compte tenu de la proximité de la sensibilité spectrale maximale de certains d'entre eux, notamment les cônes MW, les bâtonnets et les ipRGCs. Pour disséquer le rôle respectif de chaque photorécepteur, nous avons donc eu recours à différents modèles de souris transgéniques déficientes en un type de photorécepteurs :

— Les souris *Opn4* (Hattar et al. 2002)

Après la découverte de la mélanopsine (voir **section 2.1.4.1** pour plus de détails), et afin de déterminer son rôle dans l'entraînement photique du système circadien, une souris KO pour ce gène (*Opn4*^{-/-}) fut développée en remplaçant tout le locus du gène par celui de la *β-galactosidase* (Hattar et al. 2002). Une autre équipe a généré une autre lignée de souris KO pour la mélanopsine en remplaçant l'exon 1 du gène par un gène de résistance à la néomycine (Panda et al. 2002).

En utilisant ce modèle, plusieurs études ont mis en évidence que la mélanopsine, en collaboration avec les cônes et les bâtonnets, joue un rôle essentiel dans la régulation d'un large panel de réponses « non visuelles » à la lumière comprenant : l'entraînement des rythmes biologiques, la régulation du cycle veille/sommeil, les sécrétions hormonales (mélatonine), le réflexe pupillaire et des fonctions du système autonome (rythme cardiaque, vigilance). En effet, les souris *Opn4*^{-/-} présentent une diminution du décalage de phase comportemental, de l'entraînement du rythme de l'activité locomotrice et de la réponse pupillaire en réponse à la lumière et un allongement de la période endogène en lumière constante par rapport aux WT (Hattar et al. 2003 ; Lucas et al. 2003 ; Panda et al. 2003, 2002). De plus, l'induction du sommeil par la lumière, reportée chez les rongeurs nocturnes, est abolie chez les souris *Opn4*^{-/-} (Altimus et al. 2008 ; Lupi et al. 2008) et certaines présentent une activité diurne sous certaines conditions (Mrosovsky et Hattar 2005).

Au niveau de la rétine et de l'horloge rétinienne, différentes études ont mis également en évidence un rôle important de la mélanopsine. L'onde b de l'ERG présente des variations circadiennes dont l'amplitude, observée durant la journée, est réduite chez les souris *Opn4*^{-/-} (Barnard et al. 2006). Une étude de l'équipe a montré que l'absence de mélanopsine abolit toute expression circadienne des gènes de l'horloge (*Per2*, *Bmal1*, *Cry1-2*, *Reverba*, *Rorβ*, *Dbp*, *E4Bp4*) dans la couche des photorécepteurs et serait la conséquence d'une désynchronisation des horloges cellulaires des photorécepteurs (Dkhissi-Benyahya

et al. 2013). Cette désynchronisation pourrait être liée à une altération du système dopaminergique reportée chez les *Opn4^{-/-}* (augmentation des niveaux de *Th* et de DA en début de jour biologique ; Dkhissi-Benyahya et al. 2013). De plus, la lumière n'induit pas la libération de la DA chez les souris *Opn4^{-/-}* (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). Ce résultat est en accord avec la perte de la composante soutenue de la réponse électrique des cellules amacrines dopaminergiques après une stimulation lumineuse à 480 nm. Cette composante soutenue, mélanopsine-dépendante, est liée à l'innervation des ipRGCs sur les terminaisons des cellules dopaminergiques formant une voie rétrograde de régulation par la lumière de la rétine interne et externe (Joo et al. 2013 ; Prigge et al. 2016 ; D.-Q. Zhang et al. 2012, 2008).

— les souris *TRβ* (Gauthier et al. 1999)

Les souris *TRβ^{-/-}* ont une délétion des exons 4 et 5 par recombinaison homologue du gène codant pour le récepteur de l'hormone thyroïdienne de type β (β_1 et β_2 ; Gauthier et al. 1999). Au niveau de la rétine, l'absence de ce sous-type de récepteurs entraîne une modification du devenir des précurseurs des photorécepteurs. En effet, l'activation du récepteur de sous-type β par l'hormone thyroïdienne T3 conduit à une inhibition de la différenciation des précurseurs des cônes en cône SW et une stimulation de la différenciation en cône MW (**Figure 3.4** ; Ng et al. 2001). Pour revue, voir Swaroop et al. (2010). Les souris *TRβ^{-/-}* ont donc leur population de cônes MW remplacée par des cônes SW. Cette différence se retrouve également chez les souris *TRβ₂^{-/-}* dont seul le variant du récepteur β_2 est supprimé. Cela se traduit par une diminution, en condition photopique, de la sensibilité lumineuse des souris *TRβ^{-/-}* en réponse à des stimulations à 450 nm, mesurée par ERG : une intensité 3 fois supérieure est nécessaire pour induire la même réponse que chez les WT (Ng et al. 2001).

Une diminution de la sensibilité à la lumière de l'horloge centrale a également été mise en évidence chez les souris *TRβ^{-/-}* : leur rythme d'activité locomotrice est entraîné à un cycle 12L/12D de 10 lux, mais avec un angle de phase anormal et est en libre-cours à une plus faible intensité lumineuse (1 lux, Dkhissi-Benyahya et al. 2007). De plus, une diminution du décalage de phase de l'activité locomotrice et de l'induction des gènes *Per1* et *Per2* est observée en réponse à des stimulations de courte durée à 480 ou 530 nm chez les souris *TRβ^{-/-}* par rapport aux souris WT (Dkhissi-Benyahya et al. 2007 ; Dollet et al. 2010) indiquant un rôle des cônes MW dans la réponse à la lumière de l'horloge centrale.

— les souris *Nrl* (Mears et al. 2001)

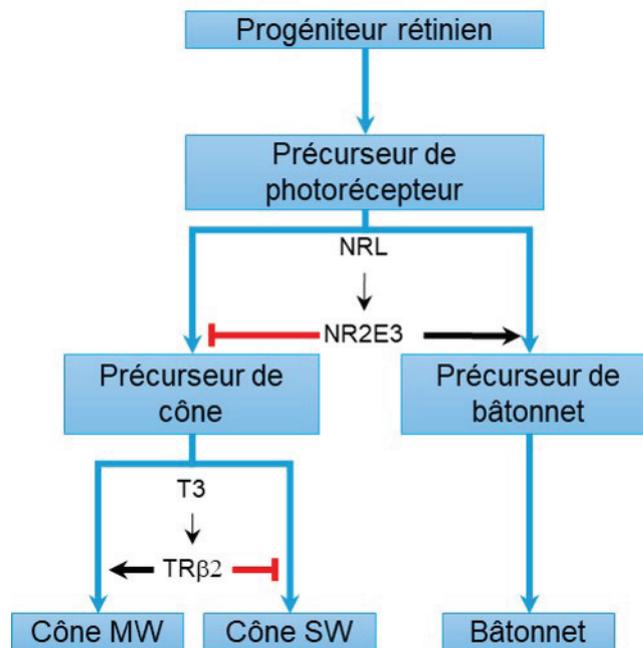


FIGURE 3.4 – Voies de différenciation des progéniteurs en photorécepteurs de type cône et bâtonnet. Les protéines NRL et TR β 2 jouent un rôle clef dans la différenciation en bâtonnets et en cônes MW, respectivement. La délétion du gène *Nrl* conduit à la levée d’inhibition de la différenciation en cône et de la stimulation de la différenciation des précurseurs en bâtonnets. Tous les progéniteurs deviennent donc des cônes et la rétine ne contient aucun bâtonnet. La délétion de *Trβ*₂ conduit à la différenciation de tous les précurseurs de cônes en cônes SW. La population de bâtonnets n’est pas affectée (Modifiée d’après Swaroop et al. 2010)

Le gène *Nrl* code pour un facteur de transcription (NRL) s’exprimant dans certains précurseurs de photorécepteurs et qui induit l’expression de plusieurs gènes spécifiques aux bâtonnets, notamment le récepteur nucléaire NR2E3 (pour revue, voir Swaroop et al. 2010). Le complexe NRL-NR2E3 inhibe l’expression des gènes spécifiques aux cônes entraînant la différenciation du précurseur en bâtonnet (**Figure 3.4**). Chez l’homme, des mutations du gène *Nrl* ont été corrélées à des cas de rétinites pigmentaires caractérisées par la dégénérescence des photorécepteurs progressive, débutant par les bâtonnets périphériques.

Les souris *Nrl*^{-/-} ont été obtenues par délétion des exons 2 et 3 du gène *Nrl* par recombinaison homologe (Mears et al. 2001). L’absence de la protéine NRL lors du développement de la rétine conduit au remplacement de la population de bâtonnets par des photorécepteurs possédant des caractéristiques structurales, histochimiques et électrophysiologiques de type cônes SW (Daniele et al. 2005 ; Mears et al. 2001).

L'absence des bâtonnets a été confirmée par immunomarquages, quantification d'expression génique de marqueurs spécifiques des bâtonnets (*rhodopsine*, *Gnat1*, *Nr2r3*) et par enregistrement de l'ERG (Daniele et al. 2005 ; Mears et al. 2001 ; Strettoi et al. 2004). La population de bâtonnets étant majoritaire dans la rétine de souris, la délétion du gène *Nrl* conduit à une surpopulation de cônes SW entraînant la formation de « rosettes », des repliements de la couche des photorécepteurs (Daniele et al. 2005 ; Mears et al. 2001), et une phase de dégénérescence après la 6^e semaine de développement (Daniele et al. 2005 ; Roger et al. 2012). Cette dégénérescence se stabilise par la suite, avec une population de cônes stable (Roger et al. 2012). Les anomalies observées au niveau des rétines de souris *Nrl*^{-/-} par ERG, rapportent une augmentation du seuil de sensibilité à la lumière associé à un décalage de la sensibilité spectrale vers l'UV, cohérent avec l'enrichissement en cônes SW (Mears et al. 2001). En absence de bâtonnets, les photorécepteurs de type cônes SW qui les remplacent sont connectés aux cellules bipolaires de bâtonnets et utilisent donc la voie des bâtonnets pour transmettre l'information lumineuse (Strettoi et al. 2004, **section 2.3.2**).

3.2.5 Développement de nouveaux modèles murins

Pour étudier les rôles des différents photorécepteurs dans l'effet de la lumière sur l'horloge rétinienne *in vitro*, nous avons utilisé les modèles précédemment décrits, *Opn4*^{-/-} et *TRβ*^{-/-}, croisés au sein du laboratoire à notre modèle *Per2*^{Luc} pour obtenir les nouveaux modèles d'étude de l'effet de la lumière sur l'horloge rétinienne : *Opn4*^{-/-}::*Per2*^{Luc} et *TRβ*^{-/-}::*Per2*^{Luc}. Dans le cadre d'une collaboration avec M-P FELDER-SCHMITTBUHL de l'Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives de Strasbourg, nous avons pu également utiliser la lignée *Nrl*^{-/-}::*Per2*^{Luc}.

L'utilisation combinée de ces différents modèles génétiques avec les stimulations lumineuses monochromatiques nous a permis de disséquer les rôles respectifs des photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne.

Matériels et Méthodes

4.1 Animaux

4.1.1 Hébergement

Toutes les souris utilisées (femelles et mâles) sont de souche C57bl/6J, âgées de 2 à 5 mois, à l'exception des souris *Nr1^{-/-}::Per2^{Luc}* qui ont été utilisées à 4 semaines. Les animaux sont hébergés dans une pièce à température constante ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) sous un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité (12L/12D; ~ 200 lux) avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Tous les efforts ont été faits pour minimiser les souffrances. Toutes les procédures utilisées sont en strict accord avec les réglementations nationales et internationales concernant l'expérimentation animale et ont été approuvées par le comité d'éthique local (C2EA42-13-02-0402-005).

4.1.2 Génotypage

Le génotypage des souris transgéniques a été réalisé à partir d'un morceau de tissu lysé dans 100 μL d'une solution contenant 25 mM NaOH et 0,2 mM éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) pendant 35 min à 95°C . 100 μL d'une solution de 40 mM Tris:HCl sont ensuite ajoutés. 2 μL de l'ADN présent dans le surnageant sont mélangés à 3 μL d'un tampon 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,3, 200 mM de chlorure de potassium et 50 mM de sulfate d'ammonium), du MgCl_2 (voir **tableau 4.1** pour la concentration finale), 1 μL désoxyribonucléotides (dNTP) (10 mM), 0,5 μL d'amorces (50 μM) et 0,25 μL de Taq DNA polymérase (1,25 U, Maxima Hot Start DNA Polymerase, Fermentas), H_2O qsp. 30 μL .

L'amplification de l'ADN est réalisée par PCR et se déroule comme suit :

- 5 min à 94°C : Dénaturation initiale
- 35 cycles :
 - 1 min à 94°C : Dénaturation
 - 1 min à 55°C : Hybridation des amorces
 - 1 min à 72°C : Élongation
- 5 min à 72°C : Extension finale

Les produits amplifiés sont déposés sur un gel d'agarose (1,5 %, Dutscher) avec du SYBR Safe (1 µg/mL, Invitrogen), migrés par électrophorèse et révélés à la lumière UV. Les séquences des amorces utilisées sont indiquées dans le **tableau 4.1**.

Gène	Allèle	5'→3'	Séquence	Taille	Température d'hybridation	Concentration finale MgCl ₂
<i>Per2^{Luc}</i>	WT+KI	Sens	CTGTGTTTACTGCGAGAGT	WT = 229 pb KI = 600 pb	55°C	2 mM
	WT	Anti-sens	GGGTCCATGTGATTAGAAAC			
	KI	Anti-sens	TAAAACCGGGAGGTAGATGAGA			
<i>TRβ</i>	WT+KO	Sens	GCCAGAACAATTCTTATT	WT = 600 pb KO = 210 pb	54°C	1,5 mM
	WT	Anti-sens	GTTCTTAAGCATGATGTTTC			
	KO	Anti-sens	CCTCTTCGCTAT ACGCCAG			
<i>Opn4</i>	WT	Sens	TGACAATCAGTGCGACCTTGGC	WT = 500 pb KO = 410 pb	60°C	2,5 mM
		Anti-sens	CCCCTGCTCATCATCTTCTG			
	KO	Sens	GCGATGGGTAACAGTCTTGG			
		Anti-sens	CGGTAGTTCAGGCAGTTCAATC			
<i>Nrl</i>	WT	Sens	TGCTCAGTCCCAGAATGG	WT = 371 pb KO = 359 pb	WT = 57°C KO = 52°C	2,5 mM
		Anti-sens	GAATAGTAGCCAAGAGGC			
	KO	Sens	TGACAGTGACTACGTCATCTC			
		Anti-sens	GTTCTAATTCCATCAGAAGCTGAC			

TABLEAU 4.1 – Séquences des amorces, températures d'hybridation et concentrations de MgCl₂ utilisées pour le génotypage des souris transgéniques. WT = allèle sauvage ; KO = allèle knockout ; KI = allèle knockin. Les amorces correspondant aux allèles "WT+KO" ou "WT+KI" sont utilisées pour amplifier l'allèle sauvage ou mutant (KO ou KI) simultanément.

4.1.3 Activité luciférase

La mesure de l'activité luciférase des animaux porteurs du gène rapporteur *Per2^{Luc}* permet de sélectionner les individus ayant la meilleure activité luciférase pour la reproduction et les expériences de cultures *in vitro*.

Un bout de tissu est lysé dans un tampon de lyse contenant 2mM d'EDTA, 1 mM de

dithiothréitol (DTT), 10% de glycérol et 25 mM Tris phosphate (pH 7,8) grâce à un ultrathurax. Le lysat est centrifugé (3 min, 6000 rotations par minutes), puis 50 µL du surnageant sont déposés dans une plaque 96 puits opaques à fond blanc. Une solution contenant le substrat de la luciférase, la luciférine, est ajoutée dans chaque puit (70 µL 2X, *Luciferase assay reagent*, Promega). La bioluminescence émise est mesurée avec un luminomètre (GloMax, Promega) avec 0,5 s d'intégration. Un contrôle sans lysat permet d'obtenir le niveau de base de détection.

4.1.4 Prélèvement de rétine pour la biologie moléculaire

Des souris WT et *Nrl*^{-/-} de 4 semaines ont été mises à mort par augmentation progressive de la pression de CO₂ jusqu'à l'asphyxie. Les rétines entières ont ensuite été prélevées et immédiatement congelées (-80°C). Certains gènes d'intérêt (*rhodopsine*, *opsine SW*, *opsine MW*, *mélanopsine*, *neuropsine* et *Per2*) ont été quantifiés par RT-qPCR. Les amorces utilisées sont présentées dans le **tableau 4.3**.

4.2 Approche *in vitro* : analyse de l'horloge rétinienne par bioluminescence

4.2.1 Culture des explants rétiniens

Les animaux sont mis à mort une heure avant l'extinction des lumières (soit à ZT11) par dislocation cervicale (**Figure 4.1**). Les yeux sont prélevés et disséqués dans du milieu HBSS (Invitrogen) à 4°C, sous loupe binoculaire. La sclère est trouée à l'aide d'une aiguille stérile puis la cornée est découpée en-dessous de la zone de contact entre la rétine et la sclère. La cornée, le cristallin et l'humeur vitrée sont retirés. La rétine est ensuite séparée de la sclère en coupant le nerf optique. La rétine ainsi isolée, nous effectuons quatre incisions radiales permettant d'aplatir la rétine en positionnant les photorécepteurs vers le bas (d'après Jaeger et al. 2015).

La rétine est ensuite déposée sur une membrane semi-perméable (Millicell, épaisseur 4 µm, diamètre 30 mm), placée dans une boîte de culture de 35 mm (Nunclon) contenant 1,2 mL de milieu Neurobasal-A. Le milieu Neurobasal-A est supplémenté en B27 (complément sans sérum favorisant la survie des neurones), en L-Glutamine (acide aminé essentiel) et en antibiotiques (Pénicilline/Streptomycine) évitant de possibles contaminations. Les concentrations finales des différents composés utilisés sont indiquées dans le **tableau 4.2**. Le milieu Neurobasal-A contient également du rouge de phénol permettant d'en contrôler visuellement le pH.

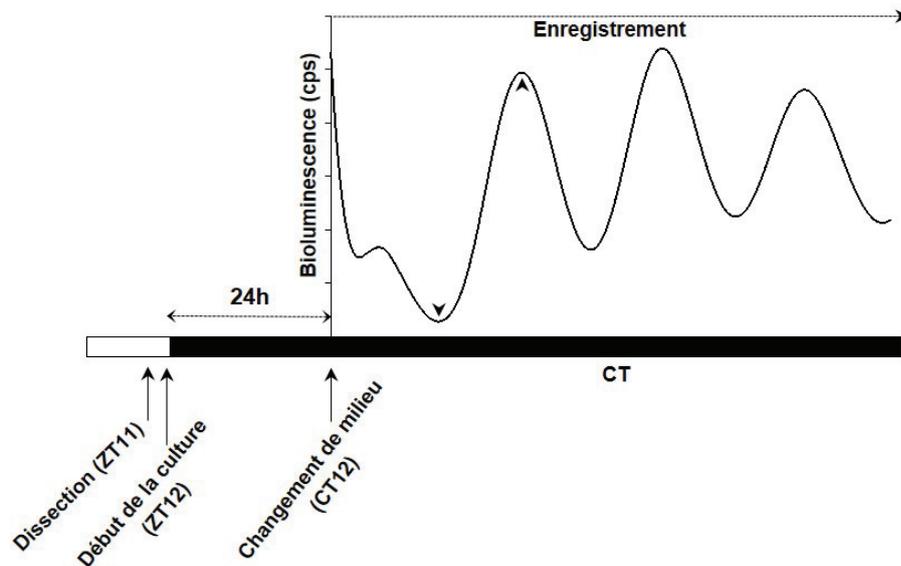


FIGURE 4.1 – **Protocole de culture des explants rétiniens pour les expériences de bioluminescence.** Les têtes de flèches indiquent le creux et le pic de la première oscillation complète utilisée dans le calcul du temps biologique de l'horloge. La bande blanche correspond à la phase lumineuse du cycle LD (ZT0 - ZT12) auquel est soumis la souris avant sa mise à mort. La bande noire correspond à l'obscurité constante à laquelle sont soumis les explants rétiniens.

La boîte de culture est ensuite placée dans un incubateur à 37°C, à une teneur fixe de 5% en CO₂, pendant 24 h. Une fois placées dans l'incubateur, les rétines ne sont plus exposées à la lumière et les changements de milieu sont réalisés sous lumière rouge. Après 24 h, le Neurobasal-A est remplacé par 1,2 mL de milieu 199, complété en B27, L-Glutamine et antibiotiques, D-Glucose, NaHCO₃ et en D-luciférine (**Figure 4.1** et **tableau 4.2**). Le milieu 199 est dépourvu de rouge de phénol car celui-ci peut absorber jusqu'à 25% de la bioluminescence émise (Welsh et Noguchi 2012). Les tubes photomultiplicateurs du Lumicycle (Actimetrics) étant très sensibles à l'humidité, les boîtes de culture sont scellées avec de la graisse silicone puis placées dans le Lumicycle pour enregistrer l'émission globale de bioluminescence.

4.2.2 Stimulations mécaniques et lumineuses des explants rétiniens

Une première étape fondamentale a été de vérifier si le seul déplacement des boîtes de culture des explants rétiniens lors des expériences de stimulation lumineuse modifie la phase d'expression de PER2::Luc. Pour cela, le signal de bioluminescence de chaque

Milieu (Références)	Neurobasal-A (Life technologie 10888-022)	199 (Sigma M3769)
Bicarbonate de sodium (Sigma S8761)	/	4 mM
D-Glucose (Sigma G7021)	/	20 mM
Pénicilline + Streptomycine (Sigma P4333)	25 U/mM	25 U/mL
B27 (Invitrogen 17504-044)	2 %	2 %
L-Glutamine (Invitrogen 21051-040)	2 mM	0,7 mM
D-Luciférine (Perkin elmer 122796)	/	0,1 mM

TABLEAU 4.2 – Concentrations des composés additionnés aux milieux de culture

échantillon est enregistré pendant 4 jours dans le Lumicycle afin d'établir l'activité oscillatoire basale et de calculer la période endogène de l'explant.

Stimulation mécanique : Les boîtes de culture sont ensuite déplacées précautionneusement vers un incubateur (37°C) proche du Lumicycle, à CT16. Les stimulations mécaniques sont réalisées à CT16 car c'est à ce CT que les stimulations lumineuses sont effectuées. Les rétines sont maintenues à l'obscurité constante pendant 30 min, la durée d'une stimulation lumineuse, puis replacées dans le Lumicycle pour poursuivre l'enregistrement. Chaque explant rétinien a été soumis à 3 mouvements successifs, chacun séparé par un renouvellement de milieu réalisé toujours à la même heure (ZT12 projeté), suivi de 3 jours d'enregistrement permettant de déterminer l'activité oscillatoire de base du signal.

Stimulation lumineuse : Nos résultats ont montré que la stimulation mécanique des explants rétiniens induit un décalage de la phase d'expression de PER2::Luc (**Voir Résultats**), ce qui constitue un biais majeur dans notre étude. Pour éviter tout déplacement des boîtes de culture lors des stimulations lumineuses, et leur effet sur la phase de l'horloge, nous avons donc développé un nouveau dispositif de stimulation lumineuse intégré dans le Lumicycle (**Figure 4.2**). Ce dispositif est composé d'une matrice opaque (épaisseur 2 mm) s'adaptant autour des 5 boîtes de culture accessibles de la plaque tournante, ainsi que d'un cylindre contenant les diodes électroluminescentes (LED, Superbrightleds) à son sommet. L'intérieur du cylindre est blanc pour maximiser la diffusion de la lumière lors des stimulations. Pour prévenir toute diffusion de lumière lors de la stimulation vers les PMT, le bas du cylindre est fixé à la matrice et une mousse opaque est placée

autour du dispositif. L'utilisation de ce dispositif n'induit pas d'augmentation de la température ($< 1^{\circ}\text{C}$) au niveau des boîtes de culture.

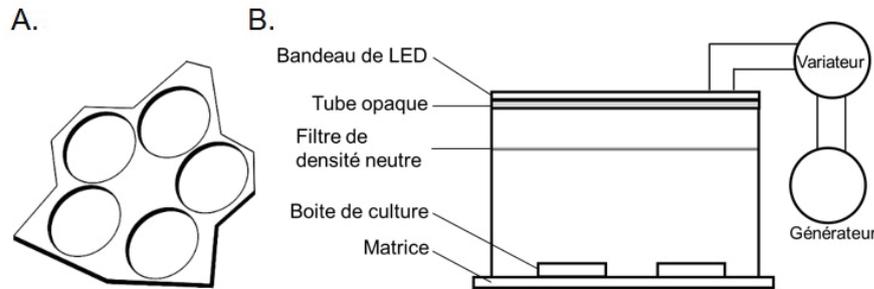


FIGURE 4.2 – **Dispositif de stimulation lumineuse des explants rétiniens.** A. Matrice placée dans le Lumicycle. Les orifices dans la matrice correspondent à la position des boîtes de culture contenant les explants rétiniens. B. Dispositif de stimulation placé sur la matrice dans le Lumicycle. La lumière est obtenue par des bandeaux de LED dont l'intensité est contrôlée par un variateur et des filtres de densité neutre.

Après 4 jours d'enregistrement, afin d'établir l'activité de base du signal de bioluminescence, les explants rétiniens sont exposés à CT16 à des stimulations lumineuses de différentes durées (0,25, 0,5, 1 ou 3 h) et de différentes irradiances (10^{13} , 10^{14} et 10^{15} photons/cm²/s) à 465 nm. Nous avons ensuite utilisé des paramètres constants de durée et d'irradiance (0,5 h, 10^{14} photons/cm²/s) pour analyser l'effet de différentes longueurs d'ondes (395, 465, 520 et 560 nm). Les rétines placées en position opposée au dispositif de stimulation lumineuse dans le Lumicycle sont utilisées comme contrôle au noir (*dark control* (DC)). Les irradiances et les spectres de chaque stimulation lumineuse sont contrôlés respectivement avec un photomètre (IL 700, International Light Technologies) et un spectrophotomètre (Specbos 1211, JETI).

Les explants rétiniens exposés à 0,5, 1 ou 3 h, et les explants DC sont congelés après dix jours en culture. Des rétines mise en culture pendant 24 h dans du Neurobasal-A ont également été congelées afin de servir de contrôle. La congélation de tous les échantillons est réalisée au même moment du cycle circadien (creux de l'oscillation). L'expression relative des opsines (opsines MW et SW, *rhodopsine*, *mélanopsine* et *neuropsine*) est quantifiée par RT-qPCR permettant d'évaluer un potentiel effet phototoxique de la stimulation lumineuse.

4.2.3 Analyses

4.2.3.1 Oscillations de PER2::Luc

Pour analyser les oscillations de PER2::Luc, nous utilisons le logiciel Lumicycle Analysis (Actimetrics, **Figure 4.3**). L'analyse débute à la 1^{re} oscillation complète. Une ligne de base de l'oscillation est obtenue par une équation de moyenne mobile (*running average*) d'une période de 25 h (proche de la période endogène des rétines de souris *Per2^{Luc}*) et lissée en moyennant 3 par 3 les points de la courbe, sur une fenêtre d'analyse de 3 jours. Cette ligne de base est soustraite aux données brutes. Un modèle mathématique (équation de type *sin fit*) est ensuite ajusté aux données soustraites permettant de déterminer la période, la phase, l'amplitude et l'amortissement de l'oscillation. Dans ce travail, nous sommes intéressés uniquement à la période et la phase des oscillations de PER2::Luc. La période est déterminée à partir de la fonction périodogramme du logiciel. La phase est déterminée manuellement en plaçant le curseur mobile sur l'acrophase de l'oscillation des données soustraites.

4.2.3.2 Détermination du temps biologique de l'horloge rétinienne *in vitro*

Tous les explants rétiniens sont disséqués et mis en culture entre ZT11 et l'extinction des lumières à ZT12 pour être dans la continuité du cycle 12L/12D auquel les animaux sont exposés (**Figure 4.1**). À partir de la mise en culture (ZT12), les rétines sont maintenues à l'obscurité constante et le ZT12 projeté est donc considéré comme le CT12. Il sera utilisé comme temps de référence pour prédire le temps circadien de l'horloge rétinienne *in vitro*. En prenant en compte ce CT12 et la période endogène de l'explant rétinien, nous avons calculé les CT correspondants au creux et au pic de la première oscillation complète de PER2::Luc. Le CT du pic permet par la suite de calculer le temps de stimulation, CT16.

4.2.3.3 Décalage de phase de l'oscillation de PER2::Luc

Les décalages de la phase d'expression de PER2::Luc sont calculés comme la différence entre la phase prédite, basée sur la phase avant stimulation et la période endogène, et la phase mesurée après la stimulation lumineuse/mécanique.

Notre système de stimulation peut stimuler 5 rétines simultanément. Or les explants rétiniens en culture peuvent avoir une période endogène différente. Cette différence de période d'un explant à l'autre induit une dérive différente des oscillations de PER2::Luc pendant les quatre premiers jours de culture. Les rétines ne sont donc pas toutes

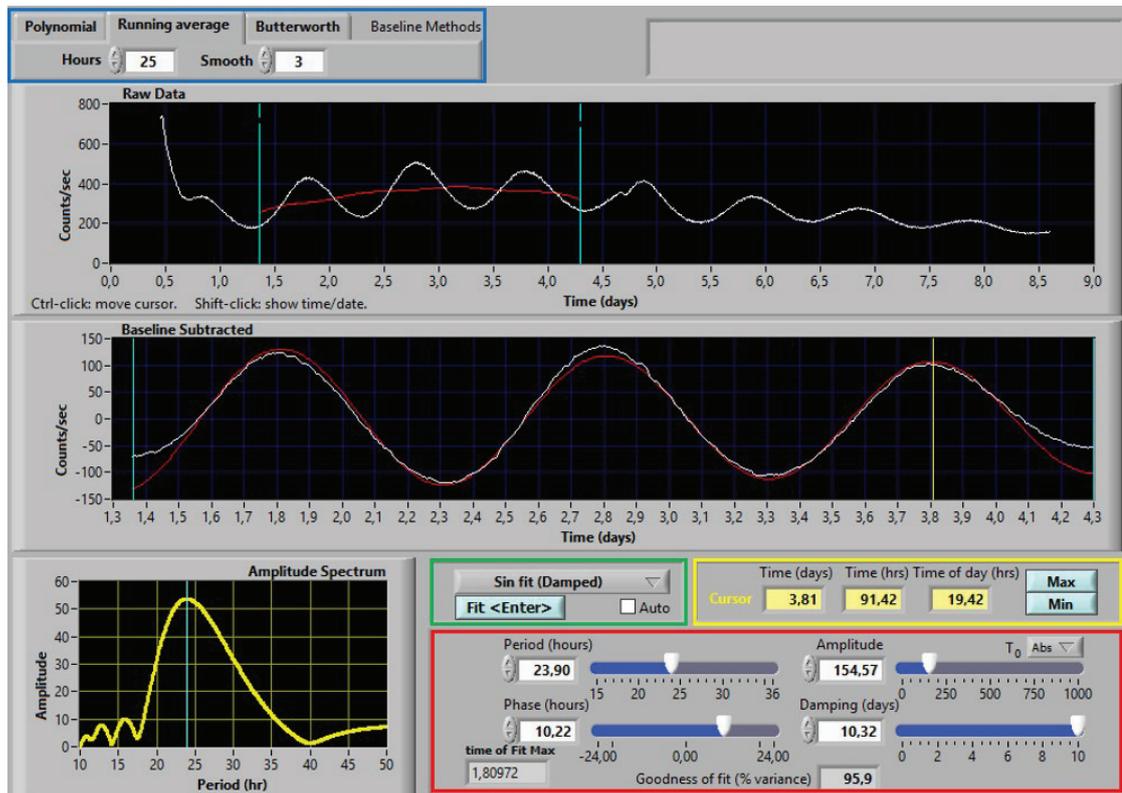


FIGURE 4.3 – Fenêtre d'analyse des oscillations de PER2::Luc (Lumicycle Analysis). Le cadre bleu indique les paramètres d'obtention de la ligne de base (ligne rouge, 1^{re} partie « Raw Data »), la ligne blanche représentant les données brutes. La 2^e partie (« Baseline Substrated ») présente les données soustraites (en blanc) et le modèle déduit (en rouge) après l'application de la méthode d'analyse (ici « Sin fit », cadre vert) dans notre fenêtre d'analyse délimitée par les curseurs cyan. Les résultats de l'analyse (période, amplitude, amortissement et phase) sont regroupés dans le cadre rouge. Le curseur jaune visible dans la 2^e partie de la fenêtre peut être déplacé manuellement et permet de déterminer la phase de l'oscillation, indiquée dans le cadre jaune.

précisément à CT16 lors de la stimulation lumineuse. Sachant que la réponse à lumière de l'horloge rétinienne suit une PRC (Buhr et Van Gelder 2014), les décalages de phase observés dans toutes les rétines n'ont pas pu être exploités. Nous avons donc décidé de ne conserver dans nos analyses que les rétines ayant été stimulées à $CT16 \pm 1,5$ CT. Nous avons écarté également les rétines dont la différence de période avant et après stimulation est supérieure à 3 fois la valeur de différence de période avant et après stimulation observée chez le DC ($-0,42 \pm 0,10$ h).

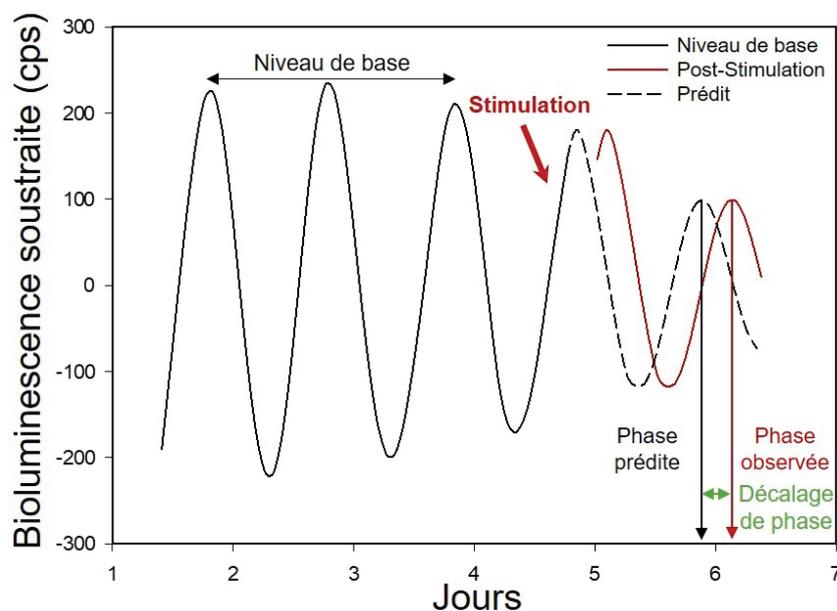


FIGURE 4.4 – Calcul du décalage de phase d'expression de PER2::Luc après une stimulation. Les trois premières oscillations de PER2::Luc permettent de calculer la période endogène (ligne noire). La stimulation mécanique ou lumineuse est effectuée à CT16 (partie ascendante de la 4^e oscillation). Le décalage de phase est la différence entre la phase du pic prédit (en pointillés) et la phase du pic observé (ligne rouge), mesuré sur la première oscillation complète post-stimulation.

4.2.3.4 Modélisation

Les données issues des courbes dose-réponse (irradiance, durée et nombre total de photons) sont modélisées avec une équation logistique à quatre paramètres, dérivée de l'équation de Naka-Rushton (Naka et Rushton 1966) comme décrit précédemment (Dkhissi-Benyahya et al. 2000).

$$R = \frac{R_{min} - R_{max}}{1 + (\frac{1}{\sigma})^p} + R_{max}$$

Avec R_{max} et R_{min} respectivement le maximum et le minimum de réponse, I la valeur de la stimulation (irradiance, durée ou nombre total de photons), ρ la pente de la courbe et σ correspond au stimulus nécessaire pour induire la moitié de la réponse maximale R_{max} .

4.3 Approche *in vivo* : analyse de la réponse à la lumière des horloges rétiniennes

4.3.1 Activité locomotrice

Dans un premier temps, les animaux sont placés individuellement dans des cages et sont exposés pendant deux semaines à un cycle 12L/12D permettant l'entraînement de leur rythme d'activité locomotrice. Ils sont ensuite placés en DD pendant 10 jours. L'activité locomotrice de chaque animal est enregistrée grâce à un capteur infrarouge, placé au-dessus de chaque cage. Les données sont enregistrées par le système CAMS (Circadian Activity Monitor System), mise en place à l'INSERM U1208 par le H.M. COOPER. L'analyse des données est réalisée à l'aide d'un logiciel d'actimétrie (Clocklab, Actimetrics) permettant de calculer différents paramètres du rythme de l'activité locomotrice dont la période endogène et le début d'activité locomotrice (CT12). Ces derniers paramètres nous ont permis de prédire l'heure de la stimulation lumineuse à CT16.

4.3.2 Stimulations lumineuses *in vivo*

L'appareil de stimulation est un dispositif qui permet d'appliquer des stimulations photiques monochromatiques de longueurs d'onde, d'irradiances et de durées variables. La source lumineuse est une ampoule halogène-tungstène, filtrée à l'aide de filtres monochromatiques (480 et 530 nm). La lumière est ensuite projetée dans la chambre de stimulation grâce à un diffuseur (Opaline, Edmund Scientific) qui assure une illumination homogène sur toute la surface de la chambre. Les stimulations à 370 nm sont réalisées à l'aide d'une lampe UV (lampe à vapeur de mercure additionnée d'un filtre UV Kodak). Des souris WT et déficientes en mélanopsine ou cônes MW ($Opn4^{-/-}$ et $TR\beta^{-/-}$) ont été exposées à une stimulation lumineuse de 15 min. Les souris WT ont été exposées aux 3 longueurs d'ondes, les $Opn4^{-/-}$ à 480 nm et les $TR\beta^{-/-}$ à 530 nm. Des DC ont été réalisés pour chaque génotype. Pour toutes ces conditions, les rétines reçoivent la même quantité de photons ($1,82 \times 10^{14}$ photons/cm²/s), quel que soit la longueur d'onde permettant donc de comparer les réponses obtenues avec différentes longueurs d'onde.

Après la stimulation lumineuse, les souris sont placées à l'obscurité totale puis mises à mort par dislocation cervicale 30 min après le début de la stimulation. Leurs yeux sont ensuite prélevés en condition *RNase-free*, enrobés dans de l'OCT permettant leur cryoprotection et congelés dans de la neige carbonique et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.3.3 Microdissection laser

Les yeux congelés sont coupés au cryostat à -20°C (Microtome HM 550) en condition *RNase-free* pour obtenir des coupes de $12\ \mu\text{m}$ d'épaisseur, déposées sur des lames spéciales (*membrane slides RNase-free, penn membrane* $2\ \mu\text{m}$, Leica) recouvertes d'un film plastique. Les coupes de rétine sont hydratées dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes (95, 75 et 50 %) pendant 30 s chacune, puis colorées pendant 15 s avec une solution de crésyl violet (1 %) permettant de distinguer les différentes couches de la rétine. Les coupes sont ensuite déshydratées dans des solutions d'éthanol de concentration croissante (50, 75, 95 et 100 %), puis séchées et maintenues dans une chambre sous vide en présence de dessiccateurs jusqu'à leur microdissection. Une lame est conservée au maximum 45 min après la fin de la coloration pour éviter toute dégradation des ARN.

La microdissection est effectuée grâce à un microdissecteur laser LMD700 (Leica). Les trois couches de la rétine, l'ONL, l'INL et la GCL, sont microdissequées et collectés séparément par gravité dans un tube, évitant tout contact et contamination. Différents tests ont été réalisés afin d'évaluer la surface de rétine microdisséquée nécessaire pour obtenir au moins 1 ng d'ARN après extraction soit $1,5 \times 10^6$, $0,6 \times 10^6$ et $1,2 \times 10^6\ \mu\text{m}^2$ respectivement pour l'ONL, l'INL et la GCL.

L'absence de contamination d'une couche par une autre a été contrôlée par RT-PCR en amplifiant des marqueurs spécifiques de chaque couche.

4.4 Biologie moléculaire

4.4.1 Extraction des ARN totaux

Echantillons microdissequés : L'extraction a été réalisé à l'aide du kit d'extraction « RNeasy Micro Kit » (Qiagen). Les ARN sont ensuite quantifiés et une double amplification (Nano kit ; AmpTec) des échantillons est effectuée à partir de 1 ng d'ARN. Toutes les quantifications, ainsi que la vérification de la qualité de l'ARN, ont été réalisées avec un Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies) par la plateforme Profil Expert (Lyon).

Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C .

Rétines entières : L'ARN est extrait en utilisant du Trizol (Invitrogen). Brièvement, le tissu est broyé par une sonde (ultrathurax) et lysé dans 1 mL de Trizol (Invitrogen). L'homogénat est incubé à température ambiante pendant 5 min pour assurer la dissociation des complexes nucléotidiques. 0,2 mL de chloroforme (100%) sont ensuite ajoutés et le tout est centrifugé (4°C , 15 min, 12000 g) pour séparer la phase aqueuse contenant l'ARN de la phase organique contenant l'ADN et les protéines. La phase aqueuse est récupérée, additionnée de 0,2 mL de chloroforme puis centrifugée à nouveau (4°C , 15 min, 12000 g). La phase aqueuse est récupérée et mélangée à 0,5 mL d'isopropanol (100%) afin de précipiter l'ARN pendant la centrifugation suivante (4°C , 10 min, 12000 g). Le culot d'ARN ainsi obtenu est lavé dans 1 mL d'éthanol 75% (-20°C) et centrifugé (4°C , 5 min, 10000 g) trois fois, puis séché et repris dans 30 μL d'eau RNase-free. Les concentrations d'ARN total sont quantifiées avec un Nanodrop 2000 (Labtech) et conservées à -80°C .

4.4.2 Transcription inverse des ARN totaux

L'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu par transcription inverse à partir de 500 ng d'ARN extrait des échantillons microdissequés ou des rétines entières (reverse transcriptase : M-MLV, Invitrogen). La réaction est réalisée avec 1 μL de *random primers* (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 4 μL de Buffer (5X), 1 μL de DTT (0,1 M), 1 μL de dNTP (25 mM), 1 μL de RNAsine et 1 μL de M-MLV, H_2O qsp 20 μL . Pour chaque réaction, un témoin négatif ne contenant pas l'enzyme est réalisé afin de tester l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

4.4.3 Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

Le principe de la RT-PCR en temps réel repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification, grâce à un intercalant non-spécifique de l'ADN double brin (SYBR GREEN) qui fluoresce lorsqu'il est lié à l'ADN. À chaque fin de cycle, l'intensité du rayonnement fluorescent est mesurée par le Light Cycler (Roche Diagnostics).

L'efficacité et la spécificité de l'amplification sont contrôlées d'une part en générant des courbes standard et d'autre part en effectuant des courbes de fusion. Les niveaux relatifs des transcrits sont calculés en utilisant la méthode des valeurs maximales de la dérivée seconde obtenue à partir de la régression linéaire du nombre de cycles versus le logarithme de la concentration du gène amplifié. Le gène Hypoxanthine-guanine

phosphoribosyl-transferase ou *Hprt* est utilisé comme gène référent car son expression n'est pas affectée par nos conditions expérimentales.

L'analyse est effectuée pour les gènes dont les séquences des amorces sont indiquées dans le **tableau 4.3**.

<u>Gène</u>	<u>Référence mRNA</u>	<u>5'→3'</u>	<u>Séquence des amorces</u>	<u>Taille de l'amplicon</u>
<i>Hprt</i>	NM_013556	Sens	ATCAGTCAACGGGGACATA	185 pb
		Anti-sens	AGAGGTCCTTTTCACCAGCA	
<i>Opsine SW</i>	NM_007538.3	Sens	CAGCCTTCATGGGATTTG	339 pb
		Anti-sens	GTGCATGCTTGGAGTTGA	
<i>Opsine MW</i>	NM_008106.2	Sens	GCTGCATCTTCCACTCAG	143 pb
		Anti-sens	GACCATCACCACCACCAT	
<i>Rhodopsine</i>	NM_145383	Sens	GCCACCACTCAGAAGGCAG	180 pb
		Anti-sens	GATGGAAGAGCTCTTAGCAAAG	
<i>Mélanopsine</i>	NM_013887.2	Sens	TGCGAGTTCTATGCCTTCTG	214 pb
		Anti-sens	GGCAGTAGGCACTCCAAC	
<i>Neuropsine</i>	NM_181753.4	Sens	ACTATGCACCTGAGCCCTTC	214 pb
		Anti-sens	TGGCTGCTATGGATTGACT	
<i>Per1</i>	NM_001159367.2	Sens	GCGTTGCAAACGGGATGTGT	131 pb
		Anti-sens	GAACCTGCAGAGGTGCCAG	
<i>Per2</i> (rétine microdisséquée)	NM_011066	Sens	TGAAGTCAAAACGCGTCAAG	187 pb
		Anti-sens	TGGAACACAGGTAGGGGGTA	
<i>Per2</i> (rétine entière)	NM_011066	Sens	CCACACCTTGCCTCCGAAAATA	120 pb
		Anti-sens	ACTGCCTCTGGACTGGAAGA	
<i>C-Fos</i>	NM_010234	Sens	AGCGCCCATCCTTACGGAC	289 pb
		Anti-sens	TCAGCAGATTGGCAATCTCA	
<i>mGluR6</i>	NM_173372.2	Sens	TCCATTGGTTGCTTGGTACTGG	342 pb
		Anti-sens	TGCAAACCTAACCAGCTCAGGTG	
<i>Th</i>	NM_009377.1	Sens	GAAGGGCCTCTATGCTACCC	235 pb
		Anti-sens	GGCATGACGGATGTAAGTGTG	
<i>Nrl</i>	NM_008736.3	Sens	GGCTCCACACCATACAGCTC	236 pb
		Anti-sens	GGGCTCCCTGAATAGTAGCC	

TABLEAU 4.3 – Séquences des couples d'amorces utilisés en RT-qPCR en temps réel.

4.5 Histologie

Des souris WT et *Nrl*^{-/-} de 4 semaines ont été mises à mort par augmentation progressive de la pression de CO₂ jusqu'à l'asphyxie. Les souris sont ensuite décapitées et les yeux

entiers sont fixés dans du PFA 4% une nuit à 4°C. Après une étape de rinçage dans une solution de tampon phosphate (0,1 M), les yeux sont enrobés dans un composé permettant leur cryoprotection, l'optimal cutting temperature (OCT). Ils sont ensuite congelés et des coupes de rétines de 20 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat. Les coupes obtenues sont déposées sur des lames de verres Superfrost Plus (Thermo Scientific) et colorées par la méthode du cresyl violet (décrite **paragraphe 4.3.3**).

Les photographies ont été effectuées avec la caméra du microscope Leica (LMD 7000).

4.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce à une ANOVA à un facteur, suivi en cas de significativité ($p \leq 0.05$) par un test de comparaison multiple de la plus petite différence significative (LSD) de Fisher. Les données sont exprimées, sauf mention contraire, sous la forme de moyenne \pm SEM.

Résultats

5.1 Développement d'un protocole standardisé de culture d'explants de rétines

Bien que l'expression d'un gène/protéine de l'horloge par bioluminescence a été utilisée auparavant pour l'étude de l'horloge de la rétine (Buhr et Van Gelder 2014 ; Buhr et al. 2015 ; Buonfiglio et al. 2014 ; Jaeger et al. 2015 ; Ruan et al. 2008), un protocole standardisé permettant la reproductibilité des résultats et la comparaison entre différentes études n'avait pas été établi. Le premier objectif de mon travail de thèse a été donc d'analyser les différents paramètres et conditions de culture notamment l'effet des changements de milieu sur la phase et la période de l'horloge rétinienne.

5.1.1 Effet du renouvellement de milieu de culture des explants sur la phase d'expression de PER2::Luc

Établir un marqueur du temps biologique de l'horloge rétinienne a été une étape cruciale du développement de notre protocole. En nous basant sur la littérature, nous avons émis l'hypothèse que le renouvellement de milieu de culture resynchronise l'horloge rétinienne (Balsalobre et al. 1998). Dans nos premières expériences, nous avons donc prévu qu'un même explant rétinien soit exposé à 2 conditions expérimentales randomisées : stimulation lumineuse monochromatique et contrôle au noir, chacune de ces conditions étant séparée par un renouvellement du milieu de culture. Les rétines ont été disséquées à ZT11 et mises en culture à ZT12 (**Figure 4.1**), heure correspondant à l'extinction du cycle 12L/12D auquel les animaux étaient exposés. À partir de cette étape, les rétines sont maintenues à l'obscurité constante, le temps ZT12 de mise en

culture est donc considéré comme le temps CT12. Les renouvellements de milieu ont été effectués après 4, 8, 9 ou 10 jours de culture au ZT12 projeté. Les CT du premier pic et premier creux après changement de milieu ont été déterminés en tenant compte de la période endogène de chaque explant et du temps de mise en culture (CT12, **Figure 5.1**). En comparant les CT des pics et creux avec ceux obtenus juste après la mise en culture (jour 0, pic en CT = $19,94 \pm 1,55$; creux en CT = $7,65 \pm 1,33$), nous avons constaté qu'un renouvellement du milieu effectué 4 jours après la mise en culture initiale ne modifie pas la phase d'expression de PER2::Luc (jour 4, pic en CT = $19,17 \pm 0,43$; creux en CT = $8,46 \pm 0,79$). Un renouvellement du milieu réalisé après 8, 9 ou 10 jours induit une avance significative ($p < 0,05$) de la phase du premier pic et du premier creux de PER2::Luc (jour 8, pic en CT = $15,71 \pm 1,00$; creux en CT = $4,30 \pm 1,21$; jour 9, pic en CT = $14,74 \pm 1,04$; creux en CT = $0,40 \pm 0,79$; jour 10, pic en CT = $13,45 \pm 0,49$; creux en CT = $3,19 \pm 0,50$; **Figure 5.1B**). Ces modifications de la phase sont associées à un raccourcissement de la période endogène des explants rétiniens après le renouvellement de milieu à 4 jours ($-0,57 \pm 0,26$ h), tandis qu'après 8, 9 et 10 jours, elle est significativement allongée (jour 8 = $0,40 \pm 0,34$ h; jour 9 = $0,88 \pm 0,31$ h; jour 10 = $0,61 \pm 0,18$ h, $p < 0,05$). Ces résultats suggèrent que le renouvellement de milieu n'induit pas une resynchronisation complète de l'horloge rétinienne. L'heure à laquelle le renouvellement de milieu est réalisé (ZT12 projeté) ne peut donc pas être utilisée comme un marqueur fiable de l'heure biologique de l'horloge rétinienne.

5.1.2 Effets des déplacements mécaniques des explants rétiniens sur la phase de l'horloge rétinienne

Les PMT du Lumicycle étant très sensibles à la lumière, le protocole classique de stimulation des rétines *in vitro* consiste à déplacer les boîtes de culture en enregistrement dans le Lumicycle vers un incubateur proche, contenant le système de stimulation, à la même température. Nous avons adapté un dispositif de stimulation sur un incubateur (**Figure 5.2**) permettant de stimuler jusqu'à 5 rétines simultanément.

La source lumineuse est une lampe à incandescence délivrant de la lumière blanche, additionnée de filtres monochromatiques (Edmund Optics) permettant d'obtenir une lumière de différentes longueurs d'onde. Après la stimulation, les boîtes de culture sont replacées dans le Lumicycle pour poursuivre l'enregistrement. Toute cette procédure est réalisée en obscurité complète ou sous faible lumière rouge. Des explants rétiniens ont été traités de façon identique (déplacés dans l'incubateur puis replacés dans le Lumicycle après 30 min) mais n'ont pas été exposés à la stimulation lumineuse (DC).

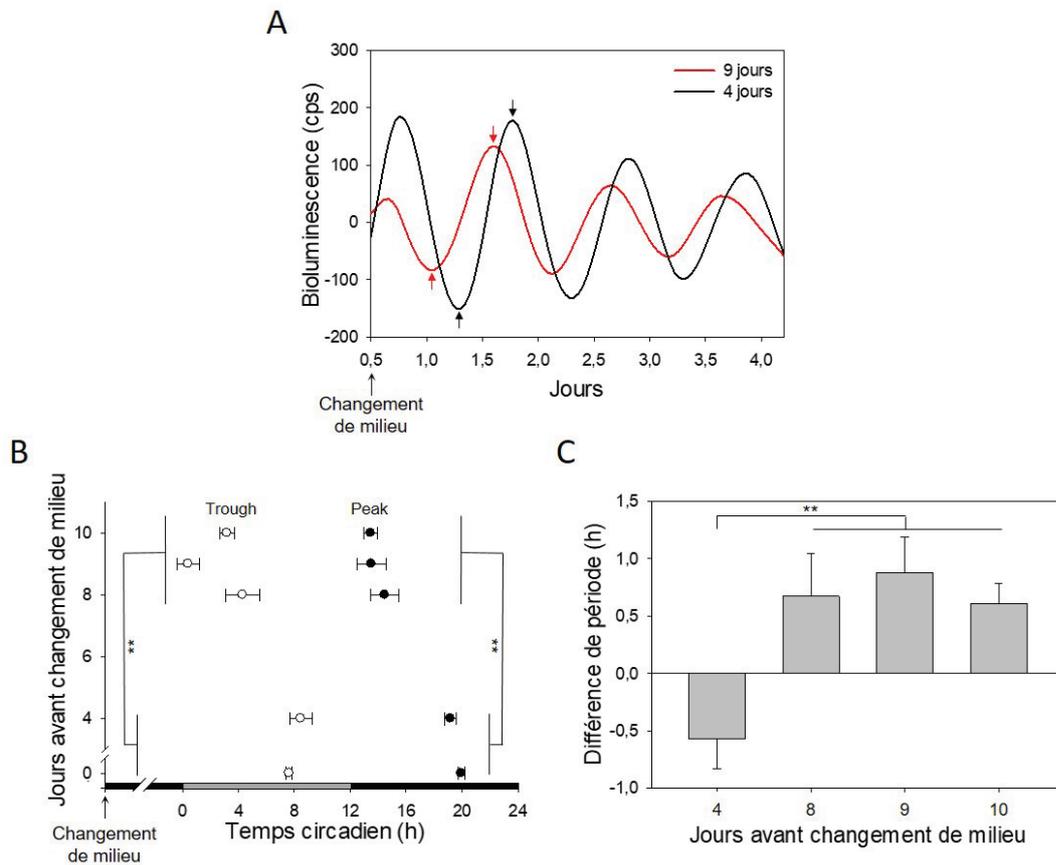


FIGURE 5.1 – Effet du renouvellement de milieu sur la phase et la période des oscillations de PER2::Luc après 4, 8, 9 et 10 jours de culture. A. Courbes représentatives d'enregistrement de PER2::Luc avec un changement de milieu effectué après 4 (tracé noir) ou 9 (tracé rouge) jours. Les flèches noires et rouges correspondent aux creux et pics de la 1ère oscillation complète de PER2::Luc pour chaque condition. B. Phases du premier creux (cercle blanc) et du premier pic (cercle noir) après renouvellement du milieu effectué après 4, 8, 9 ou 10 jours de culture. Le jour 0 correspond au début de l'enregistrement après le changement de milieu 24 h après la mise en culture. C. Différence de période des oscillations de PER2::Luc mesurée avant et après le renouvellement du milieu. Data \pm SD (0 jour : n = 42 ; 4-10 jours : n = 6-7).

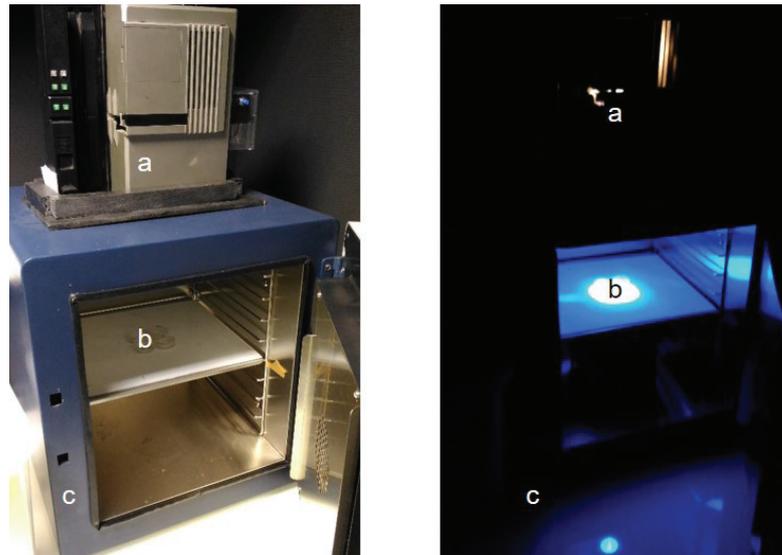


FIGURE 5.2 – **Système initial de stimulation, placé hors du Lumicycle.** L'appareil de stimulation est composé d'un incubateur à 37°C (c) dans lequel sont transférées les boîtes de pétri contenant les rétines en culture (b) puis stimulées à l'aide d'un système de stimulation (a). Dans cet exemple, les rétines ont été exposées à une stimulation monochromatique à 480 nm d'irradiance 1×10^{15} photons/cm²/s.

Dans un premier temps et en nous basant sur l'hypothèse d'un rôle des ipRGCs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne, nous avons cherché à optimiser les paramètres de stimulation (durée et irradiance) à 480 nm, pic de sensibilité de la mélanopsine, et à CT16.

Tous les explants rétiniens sont stimulés en même temps mais compte tenu de la différence de leur période endogène ($-0,42 \text{ mean} \pm 0,10$, $n = 17$), tous n'ont pas été stimulés au même CT (entre CT12 et CT22). La **Figure 5.3** représente le décalage de phase (avance ou retard) de PER2::Luc mesuré chez les explants stimulés et les DC en fonction du CT. Le décalage de phase mesuré présente une distribution aléatoire pour les rétines stimulées mais également pour les DC, suggérant que le décalage de phase n'est pas induit uniquement par la stimulation lumineuse.

Afin de déterminer le paramètre responsable du décalage de phase de PER2::Luc, nous avons testé l'effet du déplacement physique des boîtes de culture sur la phase de PER2::Luc ($n=6$). Trois déplacements successifs ont été effectués à CT16, chacun séparé par un renouvellement du milieu. Nous obtenons un décalage de phase robuste et aléatoire (**Figure 5.4**).

En effet, les trois déplacements n'ont pas le même effet sur les explants : le premier déplacement induit en moyenne un retard de phase de $-1,34 \text{ h} \pm 0,85 \text{ h}$ avec une

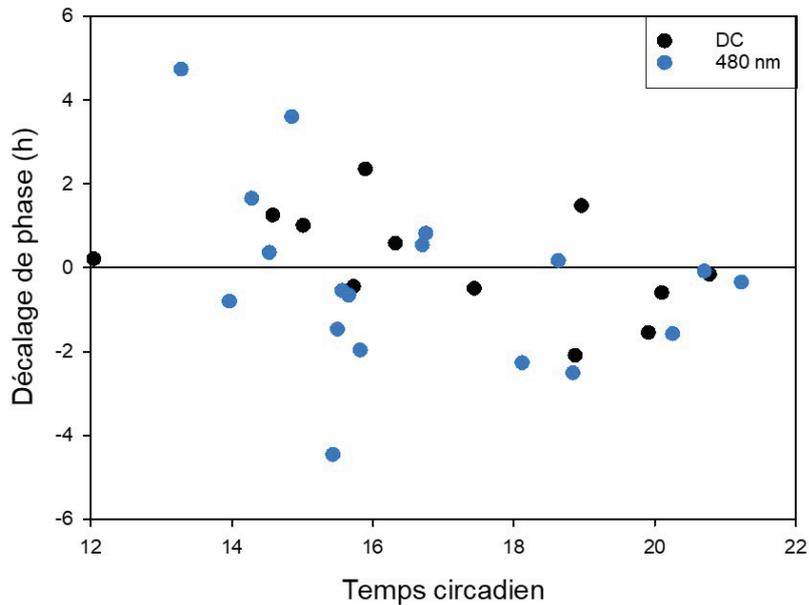


FIGURE 5.3 – Décalage de la phase de PER2::Luc en réponse à une stimulation lumineuse en fonction du CT. La stimulation lumineuse (480 nm, 30 min, 10^{15} photons/cm²/s) est effectuée avec le système présenté dans la figure 5.2. Chaque point correspond à un échantillon stimulé (rond bleu) ou un contrôle au noir (DC, rond noir). On peut souligner que les différents explants ne sont pas en phase (variation de CT12 à CT22), compte tenu de leur période endogène.

gamme allant d'un retard de $-4,4$ h à une avance de $1,24$ h ; le second et le troisième déplacement induisent une avance de phase (respectivement, $1,58 \text{ h} \pm 0,39 \text{ h}$ et $2,04 \text{ h} \pm 0,74 \text{ h}$), avec une gamme respectivement de $0,72$ h à $3,24$ h et $0,72$ h à $5,4$ h. Le seul déplacement physique des explants rétiniens est donc responsable d'un décalage de phase de l'horloge rétinienne induisant un biais majeur. Nous avons donc développé un système de stimulation intégré dans le Lumicycle (Figure 4.2) permettant de s'affranchir de ce problème. Ce dispositif nous a permis d'appliquer des stimulations lumineuses, d'irradiance, de durée et de longueurs d'onde variables sur des explants rétiniens sans les déplacer et sans endommager les PMT, sensibles à la lumière. Les résultats obtenus avec ce dispositif sont présentés en détail dans l'article 1 (Section 5.2).

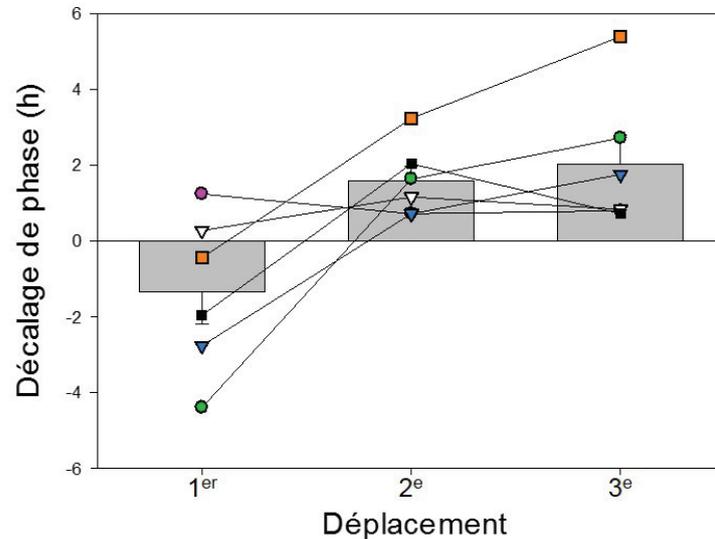


FIGURE 5.4 – Effet du déplacement des boîtes de culture sur la phase d'expression de **PER2::Luc**. Chaque symbole correspond à un explant rétinien et les histogrammes correspondent à la moyenne des échantillons pour un même mouvement. (Moyenne \pm SEM, $n=6$.)

5.2 Rôle des bâtonnets dans le décalage de phase par la lumière de l'horloge rétinienne

Après avoir standardisé les conditions de culture des explants rétiniens et développé un nouveau dispositif de stimulation, nous avons optimisé les paramètres de la stimulation (durée et irradiance lumineuse à 465 nm) afin d'établir les premières courbes doses-réponses de l'horloge rétinienne à la lumière, décrites dans l'article qui suit.

Nous avons ainsi montré qu'une stimulation de 30 min à 10^{14} photons/cm²/s à 465 nm est suffisante pour induire un décalage de phase significatif de l'horloge rétinienne chez des souris sauvages *Per2^{Luc}*, par comparaison à la durée longue (3h) et l'irradiance élevée (10^{15} photons/cm²/s) de lumière, utilisées précédemment dans la littérature (Buhr et Van Gelder 2014; Buhr et al. 2015). De plus, nous avons montré que des stimulations lumineuses dans le visible (465 nm et 520 nm) et dans l'UV (395 nm) induisent un décalage significatif et similaire de l'horloge rétinienne, suggérant que la neuropsine ne peut pas être le seul photorécepteur impliqué, contrairement à ce qui a pu être affirmé précédemment (Buhr et al. 2015). En effet, une stimulation à 520 nm exclut toute participation de la neuropsine et des cônes SW, compte tenu de leurs

5.2. Rôle des bâtonnets dans le décalage de phase par la lumière de l'horloge rétinienne⁷⁷

sensibilités spectrales. Cependant, à cette longueur d'onde, les ipRGCs, les cônes MW et les bâtonnets peuvent être responsables du décalage de phase de PER2::Luc. Pour disséquer le rôle et la contribution respective de chacun de ces 3 photorécepteurs, nous avons utilisé des souris photorécepteur-déficientes (*Opn4*^{-/-}::*Per2*^{Luc}, *TRβ*^{-/-}::*Per2*^{Luc} et *Nrl*^{-/-}::*Per2*^{Luc}). Nos résultats démontrent de façon inattendue, que l'absence des bâtonnets, et non pas de la mélanopsine ou des cônes MW, abolit tout décalage de phase à la lumière de l'horloge rétinienne suggérant un rôle clef des bâtonnets. Nous avons également montré une contribution additionnelle des cônes SW et/ou de la neuropsine lors de stimulations avec de la lumière UV.

En outre, l'absence de cônes MW ou de mélanopsine diminue significativement la période endogène des oscillations de PER2::Luc et donc la machinerie moléculaire de genèse des rythmes dans la rétine. Les mécanismes sous-tendant cette régulation restent à déterminer.

Ces résultats ont été présentés à plusieurs congrès internationaux (SRBR, EBRS, SFC). L'article suivant a été soumis à PNAS le 13 octobre 2017 et refusé le 12 janvier 2018. Il a été ensuite soumis courant mars à *PLoS Biology* et est en court de révision.

Rods are required for the light-induced phase shift of the retinal clock in mammals

Hugo Calligaro ^a, Christine Coutanson ^a, Raymond P. Najjar ^b, Nadia Mazzaro ^c, Howard M. Cooper ^a, Nasser Haddjeri ^a, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl ^c, and Ouria Dkhissi-Benyahya ^{a, 1}

^a Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, Stem Cell and Brain Research Institute U1208, 69500 Bron, France.

^b Visual Neurosciences Research Group, Singapore Eye Research Institute, Singapore.

^c CNRS UPR3212, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Short title: Role of rods in light-response of the retinal clock

¹ Correspondence:

Ouria Dkhissi-Benyahya

INSERM U1208, Stem Cell and Brain Research Institute

18 avenue du Doyen Lépine, 69500 Bron, France

ouria.benyahya@inserm.fr

Abstract

While rods, cones and intrinsically photosensitive melanopsin-containing ganglion cells play a central role in light entrainment of the master circadian pacemaker of the suprachiasmatic nuclei, recent studies have proposed that entrainment of the mouse retinal clock is exclusively mediated by the UV-sensitive photopigment neuropsin. Here, we report that the retinal circadian clock can be phase shifted by short duration, low irradiance monochromatic light in the visible part of the spectrum up to 520 nm. Using mouse models that specifically lack mid-wavelength (MW) cones, melanopsin or rods, we found that the absence of rods but not of melanopsin or MW cones totally prevented light-induced phase shifts of the retinal clock at 520 nm. At shorter UV wavelengths, our results also reveal an additional recruitment of short-wavelength (SW) cones and/or neuropsin. Interestingly, the absence of melanopsin or MW opsin alters the endogenous period of the clock. These findings unequivocally confirm a primary role of rod photoreceptors in the light response of the retinal clock in mammals.

Keywords: circadian rhythm, retina, rod, photic resetting, PER2::Luc

Significance

The mammalian retina contains a circadian clock that plays a crucial role in adapting retinal physiology and visual function to light/dark changes. In addition, the retina coordinates rhythmic behaviour by providing visual input to the master hypothalamic clock in the suprachiasmatic nuclei through a network of retinal photoreceptor cells involving rods, cones and intrinsically photosensitive melanopsin-containing ganglion cells. However, none of these photoreceptors appear to be involved in light responses of the retinal clock which is thought to be mediated exclusively by neuropsin, a UV-sensitive photopigment. Our study demonstrates that rods are required to phase shift the retinal clock, while ipRGCs and MW cones influence the intrinsic period of the clock.

Introduction

The mammalian retina contains an endogenous timekeeping system that ensures the fine-tuning of its physiology to daily changes in light intensity (1). The retinal clock controls the timing of a broad and essential range of physiological and metabolic functions (for review see 2) including melatonin release (1, 3), dopamine synthesis (4), photoreceptor disk shedding and phagocytosis (5–8), expression of immediate early genes and visual photopigments (9, 10), electrical coupling between photoreceptors (11–13), the electroretinogram b-wave amplitude (14), circadian clock gene expression (15, 16) and visual processing (14, 17). The retina also plays a key role in photic entrainment of the central clock located in the suprachiasmatic nucleus (SCN). This response is mediated through intrinsically photosensitive melanopsin-containing retinal ganglion cells (ipRGCs) that also receive inputs from rods and cones (18–23).

Mammalian retinas retain *in vitro* their ability to be entrained or phase-shifted by light (1, 3, 24–26). However, the response properties of the retinal clock to light and the involvement of different photoreceptors is still subject to debate. The landmark study by Ruan and colleagues clearly demonstrated that light is able to phase shift the retinal clock *in vitro*, but the use of broadband white light did not allow distinction of the putative roles of different photoreceptors (24). ipRGCs are considered to occupy a central role in the retinal network, in particular through synaptic contacts that convey excitatory sustained light responses to dopaminergic amacrine cells (17, 27–32). This unique retrograde circuit provides a potential mechanism for transmitting irradiance information to the outer retina and was considered a candidate for regulating light responses of the retinal clock.

However, it was recently proposed that light entrainment of the retinal clock is mediated uniquely through neuropsin (OPN5), a UV-sensitive opsin (26). Neuropsin is expressed in the eye (33, 34) and, more specifically, in cells located in the inner and ganglion cell layers of several species (26, 34–36). Retina of mice lacking rods, cones and melanopsin (*rd1/rd1;Opn4^{-/-}*) were reported to exhibit PER2::Luc retinal rhythms that could be entrained by a light/dark cycle (37) whereas neuropsin knockout mice (*Opn5^{-/-}*) failed to entrain (26). However, the relatively long duration and high irradiance light exposures required to obtain a response at 417 nm do not rule out light activation of rods, middle-wavelength (MW) cones and/or ipRGCs based on their spectral sensitivities (38). Furthermore, in mice lacking the essential components of phototransduction signalling pathways present in rods, cones and ipRGCs, UV light stimulation fails to drive any electrophysiological responses or FOS induction (39).

To further characterize the responses of the retinal clock to light, we first established the dose response properties for light-induced phase shifts of PER2::Luc retinal explants and found that the retinal clock can be phase shifted by short duration, low irradiance light at 465 nm. We

also show that PER2::Luc rhythm can be phase-shifted by monochromatic light pulses in the visible part of the spectrum up to 520 nm. To determine the involvement of different photoreceptors, we then assayed the phase shift responses in retinal explants from mice lacking either melanopsin, MW cones or rods (respectively *Opn4^{-/-}::Per2^{Luc}*; *TRβ^{-/-}::Per2^{Luc}* or *Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}*) exposed to 520 nm or 395 nm. Our findings reveal that the absence of rods but not of melanopsin or MW cones totally prevented a light-induced phase shift at 520 nm and further suggest a minor contribution of SW cones and/or neuropsin at shorter UV wavelengths.

Results

Temporal and irradiance responses for light-induced phase shifts of the retinal clock

Although bioluminescence monitoring of PER2::Luc retinal explants has been used in several studies (24–26, 40, 41), a standardized procedure to determine the circadian phase of the retinal clock *in vitro* is still lacking. In photobiology, this is an essential prerequisite to enable meaningful comparisons between findings from different studies and to replicate experimental conditions. We found that the trough and the peak of the first PER2::Luc oscillation occurred in a consistent manner around CT8 and CT20 of the circadian cycle (respectively CT 7.65 ± 1.33 and CT 19.94 ± 1.55 ; mean \pm SD; n=42; supplementary Fig. 1). However, when explants were removed from the incubator for exposure to light, (the generally employed method for light exposures) we observed robust and random advances or delays of the phase for each individual retinal explant (supplementary Fig. 2). To avoid biases due to these artifactually induced phase shifts resulting from a physical displacement, we developed a new LED-based light delivery apparatus embedded within the Lumicycle (see material and methods). This setup allowed for an accurate, artifact-free standard protocol to assess the photic dose-response properties (duration, irradiance) of the retinal clock.

Phase shift properties of PER2::Luc wild-type retinas were analyzed using 465 nm monochromatic light of different durations (0.5, 1 or 3 h) at a constant irradiance (1×10^{15} photons/cm²/s) and at different irradiances for a fixed duration (0.5 h) at CT16. We observed that 30 min of monochromatic light are sufficient to induce a significant phase delay of -2.05 ± 0.29 h (Figs. 1A, top panel and 1B) in comparison to dark control retinas (DC; -0.13 ± 0.13 ; $p \leq 0.001$). The light-induced phase delays of PER2::Luc are similar for both 1h and 3h of light stimulation with respectively -2.17 ± 0.28 h and -2.67 ± 0.17 h ($p \leq 0.001$). The slope of the stimulus 4-parameters curve (Naka-Rushton fit, Fig. 1B) is steep, resulting in a narrow stimulus-duration range with a half maximum response at 0.52 h. At the end of this experiment, the levels of opsin mRNAs (MW and SW opsins, rhodopsin, melanopsin and neuropsin) were verified in the retinal explants and compared to retinas cultured during 24 h (supplementary Fig. 3). We observed no differences in the relative expressions of the opsins between stimulated and DC

retinas, and a slight decrease in rhodopsin compared to 24 h cultured controls. This indicates that duration of the culture and of light exposure did not extensively affect the amounts of photopigments.

We then used a 30 min duration of 465 nm light exposures to establish an irradiance response curve and found that 1×10^{13} photons/cm²/s was not sufficient to induce a significant delay (-0.55 ± 0.45 h; $p=0.22$; Figs. 1A, bottom panel and 1C) while higher irradiances (1×10^{14} - 1×10^{15} photons/cm²/s) lead to significantly greater phase delays (respectively, -1.73 ± 0.22 h and -2.05 ± 0.29 h; $p<0.01$; Fig. 1C). The slope of the irradiance response curve was very steep, with an irradiance of 2.38×10^{13} photons/cm²/s necessary to induce a half maximum phase shift. Plotting the responses as a function of the total number of photons yields a coherent dose response function with a half maximum response at 6.39×10^{16} photons/cm², and saturation of the response above 3.3×10^{19} photons/cm² (Fig. 1D).

Different wavelengths across the light spectrum induce similar phase shifts of PER2::Luc in the wild-type retinal clock

Based on the optimal parameters of duration and irradiance, PER2::Luc retinal explants were exposed to equal quanta of monochromatic light (30 min, 1×10^{14} photons/cm²/s) of different wavelengths (395, 465 and 520 nm) at CT16. The choice of these wavelengths was based on the peak sensitivities of the photoreceptors in the wild-type mouse (UV-cone opsin, $\lambda_{\max}=360$ nm; neuropsin, $\lambda_{\max}=370$ nm, melanopsin, $\lambda_{\max}=479$ nm; rhodopsin, $\lambda_{\max}=498$ nm and MW-cone opsin, $\lambda_{\max}=508$ nm; supplementary Fig. 4A (34, 38, 42)). All the wavelengths tested induced significant phase delays of PER2::Luc of -2.13 ± 0.62 h at 395 nm, -1.73 ± 0.22 h at 465 nm and -1.46 ± 0.30 h at 520 nm compared to the DC (-0.13 ± 0.13 h, $p<0.001$; Fig. 2). The phase delays at all wavelengths were not significantly different, suggesting that the irradiances used were at saturating levels. However, since the stimulation at 520 nm corresponds to a more than 5 log-unit decrease in SW opsin and neuropsin sensitivities (supplementary Fig. 4B), it appears unlikely that neuropsin alone can account for the light-induced phase shifts of the retinal clock in the visible range of the spectrum, suggesting a putative role of rods, MW cones and/or ipRGCs.

Rods are required for the light response of the retinal clock in mammals

To determine which photoreceptor is involved in the phase shift response of the retinal clock, we used 520 nm stimulations to rule out the possible contributions of SW cones and neuropsin. However, MW cones, rods and ipRGCs have relatively similar spectral sensitivities and their contributions are thus difficult to completely isolate in the wild-type mouse at this wavelength. We thus backcrossed mouse models that are deficient for each of these photoreceptors with the *Per2^{Luc}* mice, to obtain MW coneless (*TRβ^{-/-}::Per2^{Luc}*), rodless (*Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}*), and melanopsin

knockout (*Opn4^{-/-}::Per2^{Luc}*) models. Both *Opn4^{-/-}::Per2^{Luc}* and *TRβ^{-/-}::Per2^{Luc}* mice show a similar phase shift (respectively -1.33 ± 0.47 h and -1.63 ± 0.23 h; Figs. 3A-B) for 30 min exposure of 1×10^{14} photons/cm²/s at 520 nm compared to wild-type *Per2^{Luc}* mice (-1.46 ± 0.30 h; $p=0.38$ and $p=0.51$). In contrast, the absence of rods in the *Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}* model totally abolished the light-induced phase shift at 520 nm (-0.18 ± 0.21 h, $p<0.01$). To eliminate the possibility that the differences in the phase shift could be related to a light-induced change in period, we analyzed the period lengths of the different genotypes and the DC and found no differences (Fig. 3C). Taken together, these results suggest that only input from rods shifts the retinal clock in the visible part of the spectrum. We then assessed whether a phase shift of *Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}* retinal explants could be obtained in the UV part of the spectrum. Using an equal quanta stimulation at 395 nm (30 min, 1×10^{14} photons/cm²/s), we found a significant phase shift (-0.98 ± 0.24 h) compared to DC ($p<0.001$; Fig. 3D). However, this response was significantly reduced compared to that of wild-type *Per2^{Luc}* retinal explants (-2.13 ± 0.62 h; $p<0.05$). This suggests that in addition to rods, a possible involvement of neuropsin and/or SW cones in response to UV light pulse.

Finally, melanopsin and/or MW cones are involved in the regulation of the retinal clock since a significant shortening of the endogenous period was observed in both *Opn4^{-/-}::Per2^{Luc}* (23.93 ± 0.15 h; $p<0.001$) and *TRβ^{-/-}::Per2^{Luc}* (23.71 ± 0.09 h; $p<0.001$) mice compared to wild-type *Per2^{Luc}* (24.69 ± 0.08 h; Fig. 4).

Discussion

In this *in vitro* study, we provide the first depth analysis of irradiance and duration-responses for the retinal clock and confirm that, similar to the circadian system, the dose-response curve exhibits a typical reciprocity function in terms of the total number of photons required to produce a phase shift. Importantly, we further demonstrate that rods are required for light-induced phase shifts of the murine retinal clock in the visible region of the light spectrum and reveal a putative additional recruitment of SW cones and/or neuropsin at shorter UV wavelengths. We also provide evidence for a role of melanopsin and MW cones in the regulation of the endogenous period of the retinal clock.

Light-response properties of the retinal clock: duration, irradiance and photon integration

Comparison of photoreceptor spectral absorptions with the relative sensitivity of evoked responses is a critical strategy for identification of the photopigments mediating non image forming (NIF) responses to light in rodents (43). Light entrainment of the retinal clock is gated in a phase-specific manner as in the SCN, with maximum phase delays occurring at CT16 and phase advances during the late subjective night (24–26).

The dose response function for eliciting a phase shift and reciprocity, core properties of the circadian system have not been evaluated for the retinal clock. These properties translate the ability to integrate photic input over a relatively long period of time, ranging from a few seconds to >1 h duration and to respond proportionally to the total energy of the stimulus (44–47). Fig. 5A compares different responses of the retinal and the SCN clocks to light between 465-520 nm (18, 46, 48–51). Compared to previous studies in the retina (24–26), we find that relatively shorter duration exposures (30 min) at lower irradiance levels (1×10^{14} photons/cm²/s) are sufficient to induce a phase delay of PER2::Luc signal. The stimulus irradiance threshold for eliciting a retinal phase shift is relatively high ($> 10^{13}$ photons/cm²/s; present study) compared to the energy required for a behavioural phase shift ($\sim 10^{10}$ - 10^{11} photons/cm²/s; Fig. 5A; (18, 48–50). Furthermore, the retinal clock appears unable to integrate light energy for durations longer than 30 min. This response resembles the pattern of light-induced FOS expression in the retina that increases sharply at a relatively high level of irradiance and long duration (Fig. 5A; (46). The difference in light sensitivity between retinal and SCN clocks suggests clock-specific tuning of light responses in each system that may be related to different integration and/or feedback mechanisms in these 2 clocks, downstream from the photoreceptor level.

Rods are required for *in vitro* light-induced phase shift of the retinal clock

A potential role of rods, cones, and ipRGCs in the light response of the retinal clock has recently been challenged by 2 studies by Buhr and colleagues claiming that none of these photoreceptors are involved in entrainment of the retinal clock and that neuropsin, a UV-sensitive retinal opsin, is the sole photopigment involved (25, 26). Our findings show similar phase delays of PER2::Luc oscillation using 395, 465 or 520 nm light, demonstrating that the retinal clock is capable to respond across a broad range of visible wavelengths. Since the spectral sensitivity of neuropsin is attenuated by more than 5 log units at 520 nm (supplementary Fig. 4B), a robust response at this wavelength strongly argues against an exclusive mediation of light-induced phase shifts by neuropsin. Furthermore, even at the short wavelength (417 nm) employed by Buhr and colleagues (26), neuropsin is only barely more sensitive than rhodopsin or MW opsins (respectively 1.3 and 1.5 times) and 0.8 times less sensitive than melanopsin (supplementary Fig. 4B). It is thus difficult to rule out the possibility that the long duration and high irradiances used at this wavelength (26) could also activate rods, MW cones and/or ipRGCs.

Since MW cones, rods, and ipRGCs have similar relative peak spectral sensitivities and are thus difficult to completely isolate in the wild-type mice using spectral stimulation strategies, we used *Per2^{Luc}* mouse models deficient in each of these photoreceptor classes (*Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}*; *TRβ^{-/-}::Per2^{Luc}* and *Opn4^{-/-}::Per2^{Luc}*). The *Nrl* and *TRβ* genes are essential for photoreceptor

development. *Nrl* encodes a transcription factor that is essential for rod development (52–54). When *Nrl* gene is knocked out, complete absence of rods is observed, as revealed by histology, immunocytochemistry, electrophysiology, and gene expression analysis and rod progenitor cells differentiate into SW cones (53, 55, 56). In this mouse, commonly used as a cone-only model in vision (57), we found no change in the relative expression of neuropsin and a slight increase in melanopsin and MW opsin mRNAs (supplementary Fig. 5). In *TRβ*^{-/-} knockout mouse, MW opsin is not expressed and all cones express SW opsin (58, 59). The use of these models confirms that rods but neither MW cones or melanopsin are required for *in vitro* light-induced phase shift of the mouse retinal clock. This result contrasts with NIF responses that can be driven by cones and ipRGCs at the irradiance levels used here (60). Moreover, rods can mediate pupillary response, behavioral entrainment and phase shift not only under dim light levels but also at higher light levels within the sensitivity range of cones (61, 62), possibly through the rod-cone pathways (62) suggesting that rods play a role in the phase shifting response to light of both retinal and SCN clocks (Fig. 5B). The discrepancy between the current study and those of Buhr and colleagues may in part be related to the type of response studied (26). Wild-type retinal explants did not entrain to a L/D cycle at 530 nm (26) whereas significant phase shifts were observed in our study at this wavelength and by Ruan and colleagues using visible broadband white light (24). This result is surprising since entrainment of locomotor activity is generally observed at dim light levels that do not elicit significant behavioral phase shifts (Fig. 5A; (50).

Our data also suggest that neuropsin and/or SW cones may contribute to the phase shift observed in the *Nrl*^{-/-}::*Per2*^{Luc} mouse at 395 nm (Fig. 5B). Although Buhr and colleagues observed a significant phase shift of the retinal clock in SW knockout mice (26) at 417 nm, the use of long duration and high irradiance light does not exclude a rod contribution since the spectral sensitivity of rods is only slightly reduced compared to that of neuropsin at this wavelength. However, this light condition in *in vitro* explant cultures that lack photoprotective retinal pigment epithelium and light absorption by the lens can also provoke phototoxic cell damage and other deleterious effects (63, 64). Furthermore, although the mouse lens effectively transmits UV wavelengths, a putative role of neuropsin in humans appears to be doubtful in the absence of UV transmittance by the human lens (63, 65, 66) and with no detectable levels of neuropsin in human (34) or in non-human primate retinas (data not shown).

The regional expression of clock genes-clock proteins in the inner nuclear/ganglion cell layers or in photoreceptors provides compelling evidence that regulation of rhythmicity in the retina emerges from a network of coupled circadian oscillators located within distinct cellular layers (31, 41, 67). However, in the intact retinal explant, the overall PER2::Luc signal results from the combined contributions of both outer and inner layers (24, 41). It cannot be ruled out that different photoreceptors encoding distinct light parameters (23, 59–62) are involved in the

phase shifting response of inner or outer layers. For example, we previously reported that light-induction and circadian rhythms of clock gene expression are abolished in the photoreceptor layer of *Opn4*^{-/-} mice while, at the same time, these responses are maintained in the inner nuclear layer and ganglion cell layer (31).

In conclusion, our findings reveal that the absence of rods but not of melanopsin or MW cones totally prevented a light-induced phase shift in the visible spectrum and suggest an additional recruitment of SW cones and/or neuropsin at shorter UV wavelengths. This highlights the need for a comprehensive understanding of the neural circuits involved in the light response of the retinal clock.

Materials and Methods

Determination of the biological time of the retinal clock *in vitro*: All retinal explants were dissected at ZT11 and cultured just before light offset (ZT12). The projected ZT12, at which medium was changed and recording started was then considered as CT12 and used as a time reference (supplementary Fig. 1A). The time of occurrence of the trough and the peak of the first complete PER2::Luc oscillation were determined by using this CT12 reference and by correcting time for the endogenous period (supplementary Fig. 1B). The phase of the peak was then used to calculate the timing of the following CT16 to apply light stimulation or physical displacement.

Physical displacement effects on the retinal clock phase: The classical procedure commonly employed to assess light-induced phase shifts involves transfer of the cultured tissue from the Lumicycle into a light stimulation chamber. To evaluate the effects of displacement of retinal culture dishes on the phase of PER2::Luc, we first established a 4 day baseline bioluminescence signal for each sample in the Lumicycle (Actimetrics) and retinal explants were then cautiously transferred to a nearby incubator in a light-proof, insulated chamber at CT16. Subsequently, the tissue was returned to the Lumicycle and the phase shift was measured. Each retinal explant was submitted to 3 successive movements, each separated by a medium change.

Light delivery apparatus: To avoid effects of displacement, we developed a new light delivery apparatus embedded within the Lumicycle. This device is composed of an opaque matrix that fits to the shape of the 5 exposed dishes on the turntable and by a black cylinder reflective white inside containing the light emitting diodes (LEDs, Super Bright LEDs). To avoid any light diffusion to the photomultiplier tubes during the light stimulation, the bottom edge of the cylinder was sealed to the contours of the matrix with light impermeable seals inside the

Lumicycle. Retinas placed on the opposite side of the Lumicycle during the light stimulations were used as dark controls (DC).

For detailed methods for retinal explant culture, quantitative RT-PCR, retinal histology and phase-shifting measurement, see SI Materials and Methods.

Acknowledgement. This research was supported by Rhône-Alpes CMIRA, USIAS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors do not have any potential conflict of interest.

Author contributions: H.C. and O.D-B. designed research; H.C. and C.C. performed research; RP.N. contributed to the light delivery apparatus; N.M. provided cDNAs from *Nrl*^{-/-} mouse; H.C., MP.F-S and O.D-B. analysed data; H.C., HM.C., N.H., MP.F-S. and O.D-B. wrote the paper.

References

1. Tosini G, Menaker M (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272(5260):419–21.
2. Felder-Schmittbuhl M-P, Calligaro H, Dkhissi-Benyahya O (2017) The retinal clock in mammals: role in health and disease. *ChronoPhysiology Ther* Volume 7:33–45.
3. Tosini G, Menaker M (1998) The clock in the mouse retina: Melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res* 789(2):221–228.
4. Doyle SE, McIvor WE, Menaker M (2002) Circadian rhythmicity in dopamine content of mammalian retina: Role of the photoreceptors. *J Neurochem* 83(1):211–219.
5. LaVail M (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194(4269).
6. Besharse JC, Hollyfield JG, Rayborn ME (1977) Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light. *Science* 196(4289):536–8.
7. Grace MS, Wang LM, Pickard GE, Besharse JC, Menaker M (1996) The tau mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. *Brain Res* 735(1):93–100.
8. Bobu C, Hicks D (2009) Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(7):3495–502.
9. Pierce ME, et al. (1993) Circadian regulation of iodopsin gene expression in embryonic photoreceptors in retinal cell culture. *Neuron* 10(4):579–584.
10. von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG (1999) Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res* 72(1):108–114.
11. Ribelayga CP, Cao Y, Mangel SC (2008) The Circadian Clock in the Retina Controls Rod-Cone Coupling. *Neuron* 59(5):790–801.
12. Jin NG, Ribelayga CP (2016) Direct Evidence for Daily Plasticity of Electrical Coupling between Rod Photoreceptors in the Mammalian Retina. *J Neurosci* 36(1):178–184.
13. Jin NG, Chuang AZ, Masson PJ, Ribelayga CP (2015) Rod electrical coupling is controlled by a circadian clock and dopamine in mouse retina. *J Physiol* 593(7):1597–631.
14. Storch K-F, et al. (2007) Intrinsic Circadian Clock of the Mammalian Retina: Importance for Retinal Processing of Visual Information. *Cell* 130(4):730–741.
15. Ruan G-X, Zhang D-Q, Zhou T-R, Yamazaki S, McMahon DG (2006) Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(25):9703–8.
16. Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O (2007) Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J* 21(14):3866–71.
17. Zhang D-Q, Belenky MA, Sollars PJ, Pickard GE, McMahon DG (2012) Melanopsin mediates retrograde visual signaling in the retina. *PLoS One* 7(8):e42647.
18. Hattar S, et al. (2003) Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major

- accessory visual functions in mice. *Nature* 424(6944):76–81.
19. Lucas RJ, et al. (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299(5604):245–7.
 20. Panda S, et al. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science* 301(5632):525–527.
 21. Güler AD, et al. (2008) Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453(7191):102–105.
 22. Hatori M, et al. (2008) Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses. *PLoS One* 3(6):e2451.
 23. Dollet A, Albrecht U, Cooper HM, Dkhissi-Benyahya O (2010) Cones are required for normal temporal responses to light of phase shifts and clock gene expression. *Chronobiol Int* 27(4):768–81.
 24. Ruan G-X, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG (2008) An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol* 6(10):e249.
 25. Buhr ED, Van Gelder RN (2014) Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(23):8625–30.
 26. Buhr ED, et al. (2015) Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(42):2–7.
 27. Wong KY, Dunn F a, Graham DM, Berson DM (2007) Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol* 582(Pt 1):279–96.
 28. Joo HR, Peterson BB, Dacey DM, Hattar S, Chen S-K (2013) Recurrent axon collaterals of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 30(4):175–82.
 29. Reifler AN, et al. (2015) All Spiking, Sustained ON Displaced Amacrine Cells Receive Gap-Junction Input from Melanopsin Ganglion Cells. *Curr Biol* 25(21):2763–2773.
 30. Prigge CL, et al. (2016) M1 ipRGCs Influence Visual Function through Retrograde Signaling in the Retina. *J Neurosci* 36(27):7184–97.
 31. Dkhissi-Benyahya O, et al. (2013) The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell Mol Life Sci* 70(18):3435–47.
 32. Zhang D-Q, et al. (2008) Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37):14181–14186.
 33. Tarttelin EE, Bellingham J, Hankins MW, Foster RG, Lucas RJ (2003) Neuropsin (Opn5): A novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS Lett* 554(3):410–416.
 34. Kojima D, et al. (2011) UV-Sensitive Photoreceptor Protein OPN5 in Humans and Mice. *PLoS One* 6(10):e26388.
 35. Yamashita T, et al. (2010) Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(51):22084–22089.
 36. Yamashita T, et al. (2014) Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing

- pigment by a single amino acid mutation. *J Biol Chem* 289(7):3991–4000.
37. Buhr ED, Van Gelder RN (2014) Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(23):8625–30.
 38. Govardovskii VI, Fyhrquist N, Reuter T, Kuzmin DG, Donner K (2000) In search of the visual pigment template. *Vis Neurosci* 17(4):509–528.
 39. Hughes S, et al. (2016) Characterisation of light responses in the retina of mice lacking principle components of rod, cone and melanopsin phototransduction signalling pathways. *Sci Rep* 6(May):28086.
 40. Buonfiglio DC, et al. (2014) Rat retina shows robust circadian expression of clock and clock output genes in explant culture. *Mol Vis* 20:742–52.
 41. Jaeger C, et al. (2015) Circadian organization of the rodent retina involves strongly coupled, layer-specific oscillators. *FASEB J* 29(4):1493–1504.
 42. Lucas RJ, Douglas RH, Foster RG (2001) Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice. *Nat Neurosci* 4(6):621–6.
 43. Peirson SN, Thompson S, Hankins MW, Foster RG (2005) Mammalian photoentrainment: Results, methods, and approaches. *Methods Enzymol* 393:697–726.
 44. Takahashi JS, DeCoursey PJ, Bauman L, Menaker M (1984) Spectral sensitivity of a novel photoreceptive system mediating entrainment of mammalian circadian rhythms. *Nature* 308(5955):186–188.
 45. Nelson DE, Takahashi JS, Zucker I (1991) Sensitivity in a visual pathway for circadian entrainment in the hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Physiol* 439(1):115–145.
 46. Dkhissi-Benyahya O, Sicard B, Cooper HM (2000) Effects of irradiance and stimulus duration on early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus: temporal summation and reciprocity. *J Neurosci* 20(20):7790–7.
 47. Muscat L, Morin LP (2005) Binocular Contributions to the Responsiveness and Integrative Capacity of the Circadian Rhythm System to Light. *J Biol Rhythms* 20(6):513–525.
 48. Panda S, et al. (2002) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298(5601):2213–6.
 49. Freedman MS, et al. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284(5413):502–504.
 50. Butler MP, Silver R (2011) Divergent photic thresholds in the non-image-forming visual system: entrainment, masking and pupillary light reflex. *Proc R Soc B Biol Sci* 278(1706):745–750.
 51. Hut RA, Oklejewicz M, Rieux C, Cooper HM (2008) Photic sensitivity ranges of hamster pupillary and circadian phase responses do not overlap. *J Biol Rhythms* 23(1):37–48.
 52. Swaroop A, et al. (1992) A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(1):266–70.

53. Mears AJ, et al. (2001) Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 29(4):447–52.
54. Rehemtulla A, et al. (1996) The basic motif-leucine zipper transcription factor Nrl can positively regulate rhodopsin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):191–5.
55. Strettoi E, Mears AJ, Swaroop A (2004) Recruitment of the rod pathway by cones in the absence of rods. *J Neurosci* 24(34):7576–82.
56. Daniele LL, et al. (2005) Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6):2156–67.
57. Nikonov SS, et al. (2005) Photoreceptors of Nrl *-/-* mice coexpress functional S- and M-cone opsins having distinct inactivation mechanisms. *J Gen Physiol* 125(3):287–304.
58. Ng L, et al. (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27(1):94–8.
59. Dkhissi-Benyahya O, Gronfier C, De Vanssay W, Flamant F, Cooper HM (2007) Modeling the Role of Mid-Wavelength Cones in Circadian Responses to Light. *Neuron* 53(5):677–687.
60. Lucas RJ, Lall GS, Allen AE, Brown TM (2012) How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog Brain Res* 199:1–18.
61. Lall GS, et al. (2010) Distinct contributions of rod, cone, and melanopsin photoreceptors to encoding irradiance. *Neuron* 66(3):417–428.
62. Altimus CM, et al. (2010) Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. *Nat Neurosci* 13(9):1107–12.
63. Pitts DG (1993) Ocular Effects of Radiant Energy. *Environmental Vision* (Elsevier), pp 151–220.
64. Hunter JJ, et al. (2012) The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Prog Retin Eye Res* 31(1):28–42.
65. Boettner EA, Wolter JR (1962) Transmission of the Ocular Media. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1(6):776–783.
66. Najjar RP, et al. (2016) Heterochromatic Flicker Photometry for Objective Lens Density Quantification. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(3):1063–71.
67. Sandu C, Hicks D, Felder-Schmittbuhl M-P (2011) Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur J Neurosci* 34(3):507–516.
68. Yoo S-H, 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(15):5339–46.
69. Gauthier K, et al. (1999) Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *Embo J*

18(3):623–631.

70. Roger JE, et al. (2012) Preservation of cone photoreceptors after a rapid yet transient degeneration and remodeling in cone-only *Nrl*^{-/-} mouse retina. *J Neurosci* 32(2):528–41.
71. Naka KI, Rushton WA (1966) S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). *J Physiol* 185(3):587–99.

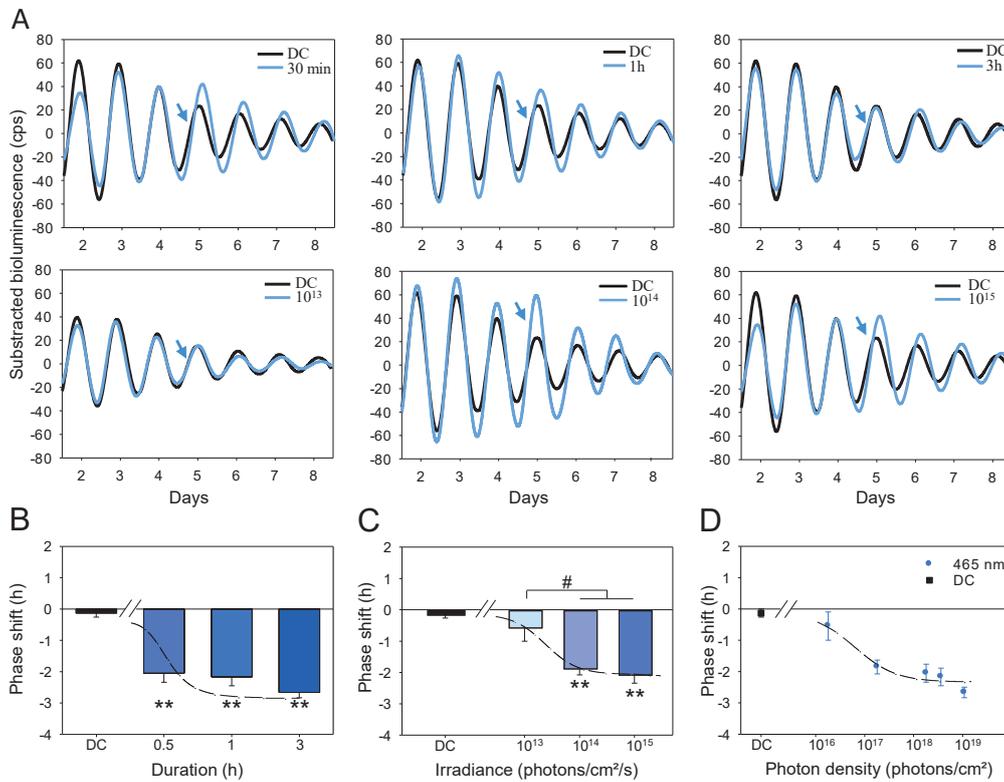


Fig. 1. Temporal and irradiance responses for light-induced phase shifts of the retinal clock at 465 nm in the wild-type *Per2^{Luc}* mice. **A.** Representative PER2::Luc bioluminescence traces of retinal explants exposed to different durations (0.5h, 1h, 3h; blue lines, top panel) and irradiances (10^{13} , 10^{14} , 10^{15} photons/cm²/s; blue lines, low panel) compared to retinas not exposed to light (dark control or DC; black lines). The blue arrow indicates the time of the stimulation (CT16). **B, C, D.** Mean light-induced phase shift after a 465 nm light stimulation at CT16 of different durations with a constant irradiance (10^{15} photons/cm²/s) (**B**), at different irradiances with a constant duration (0.5h) (**C**), and as a function of total photons density (**D**). Bars represent mean \pm SEM (DC: n=17; 0.5h-3h: n=6-7; 10^{13} - 10^{15} photons/cm²/s: n=5-7). * represent statistical differences with the DC and # statistical differences between different light conditions. **: p<0.001, #: p<0.01.

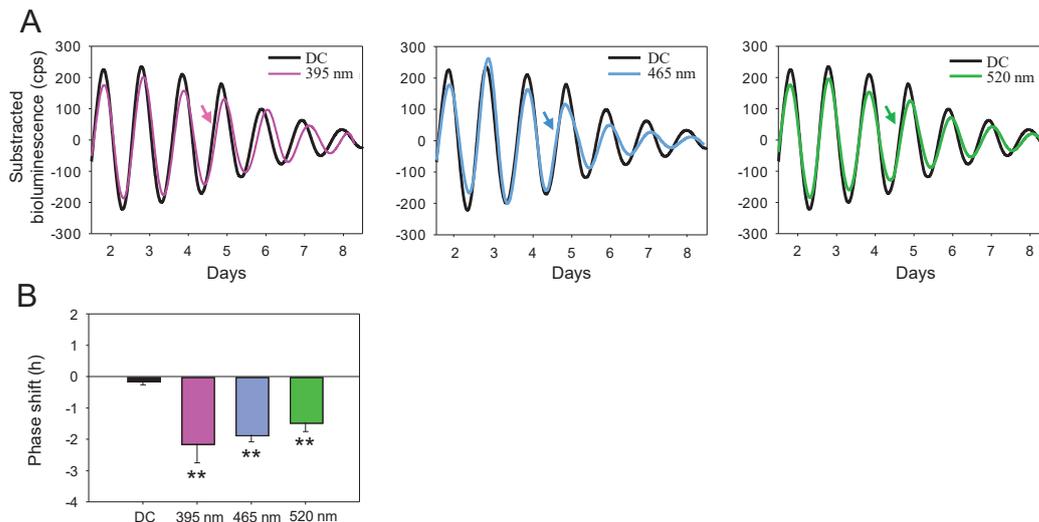


Fig. 2. Different wavelengths of light induce a similar phase shift of the retinal clock in the wild-type *Per2^{Luc}* mice. **A.** Representative PER2::Luc bioluminescence traces of retinal explants exposed to 395 nm (purple line), 465 nm (blue line) or 520 nm (green line) compared to DC (black lines). Arrows indicate CT16, the time of the stimulation. **B.** Mean light-induced phase shift after a light stimulation (30 min, 10^{14} photons/cm²/s) at these 3 wavelengths. Bars represent mean \pm SEM (DC: n=17; 395-520 nm: n=5-8). Statistical differences with the DC are indicated by **: p<0.001.

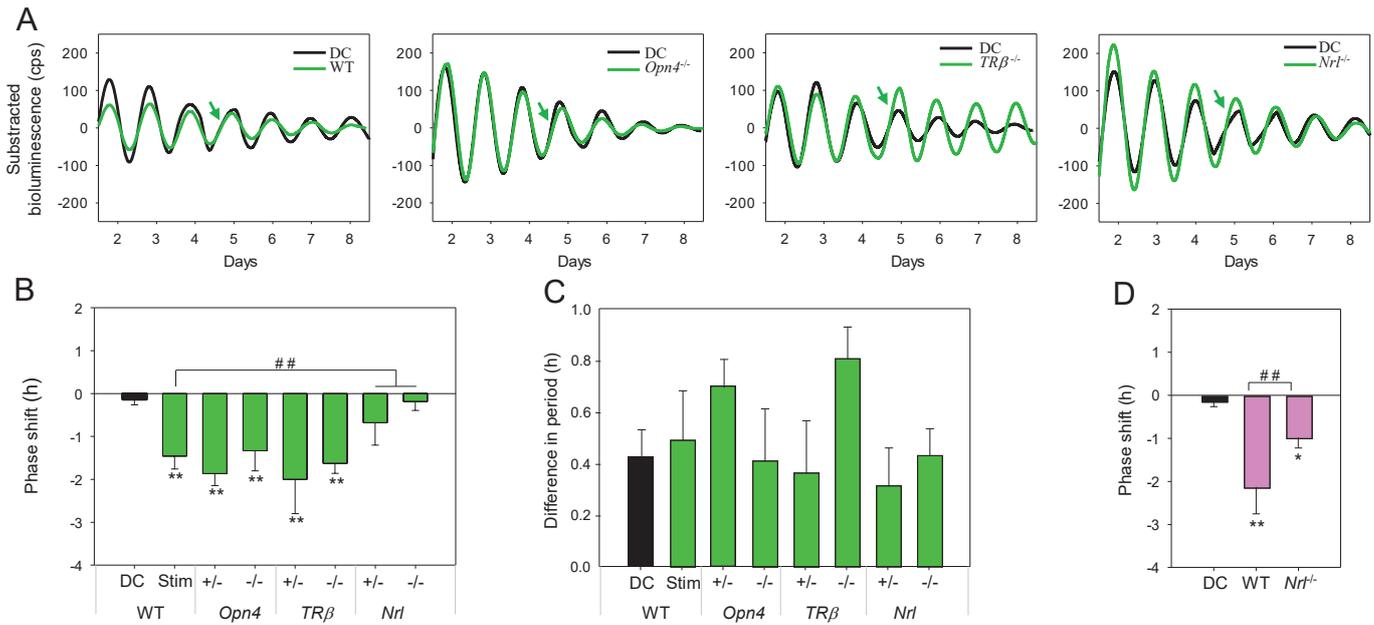


Fig. 3. Light response of the retinal clock in wild-type *Per2^{Luc}* and photoreceptor-deficient (*Opn4*^{-/-}::*Per2^{Luc}*, *TRβ*^{-/-}::*Per2^{Luc}* and *Nrl*^{-/-}::*Per2^{Luc}*) mice. A. Representative PER2::Luc bioluminescence traces of retinal explants from *Per2^{Luc}* and photoreceptor-deficient mice exposed to 520 nm (30 min, 10¹⁴ photons/cm²/s; green line), compared to DC (black line). Green arrows indicate CT16, the time of the stimulation. **B.** Mean light-induced phase shift in the heterozygous and homozygous genotypes. **C.** Difference in the endogenous period before and after the light stimulation. A positive value corresponds to a lengthening of the period. Bars represent mean ± SEM (DC: n=17; WT: n=8; for homozygous photoreceptor deficient mice: n=5-6; for heterozygous photoreceptor deficient mice: n=2-8). **D.** Mean light-induced phase shift in the wild-type and *Nrl*^{-/-}::*Per2^{Luc}* following a 395 nm light stimulation (30 min, 10¹⁴ photons/cm²/s; DC: n=17; WT: n=8; *Nrl*^{-/-}::*Per2^{Luc}*: n=10). * represent statistical differences with the DC and # statistical differences between different genotypes. *: p<0.01, ** or ##: p<0.001.

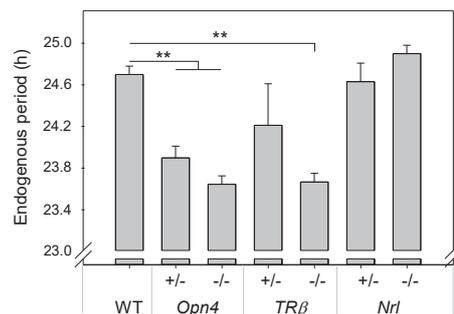


Fig. 4. Effect of the absence of one type of photoreceptor on the endogenous period of the retinal clock. The endogenous period is calculated on a 3-day baseline before light stimulation in retinal explants from *Per2^{Luc}* mice and photoreceptor deficient mice. Bars represent mean ± SEM (WT: n=8; for homozygous photoreceptor deficient mice: n=5-6; for heterozygous photoreceptor deficient mice: n=3-11). Statistical differences with the WT are indicated by **: p<0.001.

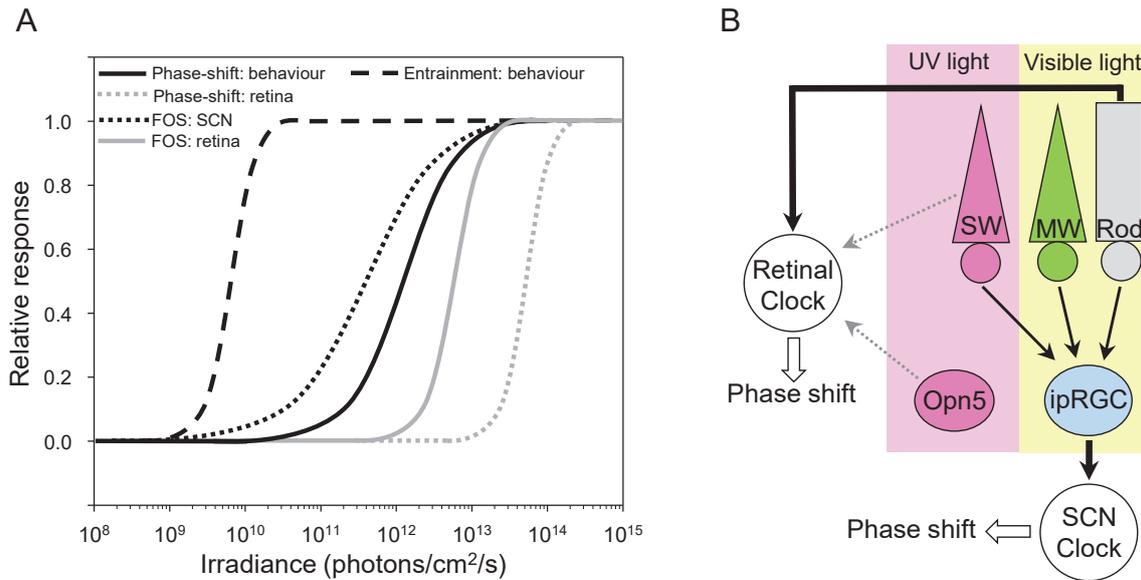


Fig. 5A. Irradiance response curves of different light responses in SCN and retinal clocks. This figure summarizes results of the present and previous studies of behavioural entrainment, phase shift of locomotor activity and PER2::Luc rhythms in the retina, and FOS expression in the SCN and retina. Only studies using monochromatic light (465-520 nm) are presented to provide valid comparisons in terms of irradiance. The irradiance threshold of FOS induction in the retina (45) is lower than the threshold of the retinal clock (present study). Light responses of the SCN including behavioural entrainment (49) and phase shift (18, 47–50) show even lower thresholds compared to the retinal clock (present study). **5B. The phase shifting responses of retinal and SCN clocks rely upon distinct photoreceptors.** ipRGC that receive inputs from both rods and cones (MW and SW), acts as the primary sensory conduit mediating NIF responses to light (thick black arrows), including entrainment and light-induced phase shift of the SCN. The phase shifting response to light of the retinal clock is dependent on rod input in the visible spectrum and may involve an additional recruitment of SW cones and/or neuropsin (Opn5) expressing cells at shorter wavelengths (grey arrows).

Supplementary Materials and methods

Animals: Mice were housed in temperature-controlled room ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), under 12 h light/12 h dark cycle (12L/12D, light intensity around 200 lux) with food and water *ad libitum*. All animal procedures were in strict accordance with current national and international regulations on animal care, housing, breeding and experimentation and approved by the regional ethics committee CELYNE (C2EA42-13-02-0402-005). All efforts were made to minimize suffering. *Per2^{Luc}* mice (68) and several photoreceptor deficient mice were used: *TRβ^{-/-}* lacking MW opsin (59, 69), *Opn4^{-/-}* knockout for melanopsin (18) and *Nrl^{-/-}* characterized by the complete loss of rods and an increased number of SW cones (53). All photoreceptor-deficient mice were bred with the *Per2^{Luc}* mice to obtain *TRβ^{-/-}::Per2^{Luc}*, *Opn4^{-/-}::Per2^{Luc}* and *Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}*. All lines were maintained on a C57BL/6J background. We used female and male mice in all experiments. All mice were used between 2-4 month-old, excepting the *Nrl^{-/-}::Per2^{Luc}* model which were used at 4 weeks before the onset of apoptotic degeneration (70).

Retinal explant culture and bioluminescence recording: Mice were killed by cervical dislocation 1 h before light offset (Zeitgeber Time 11 or ZT11). Eyes were enucleated and placed in Hank's balanced salt solution (HBSS; Invitrogen) on ice. Retinas were gently isolated from the rest of the eye cup and flattened ganglion cell layer up on a semi-permeable (Millicell) membrane in a 35 mm culture dishes (Nunc) containing 1.2 mL Neurobasal-A (Life Technologies) with 2% B27 (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Life Technologies) and 25 U/mL antibiotics (Penicilin/Streptomycin, Sigma), incubated at 37°C in 5% CO_2 for 24 h. From this step on, all manipulations of explants were performed under dim red light. After 24h, at the projected ZT12, retinas were transferred to 1.2 ml of 199 medium (Sigma), supplemented by 4 mM sodium bicarbonate (Sigma), 20 mM D-glucose (Sigma), 2% B27, 0.7 mM L-Glutamin, 25 U/mL antibiotics (Penicilin / Streptomycin, Sigma) and 0.1 mM Luciferin (Perkin). Culture dishes were sealed and then placed in a Lumicycle (Actimetrics, Wilmette, IL, USA) to record the global emitted bioluminescence. *PER2::Luc* bioluminescence was analysed using Lumicycle Analysis software (Actimetrics, Wilmette, IL, USA). Bioluminescence data were detrended using a 25 h running average and the phase and the period were determined by using best-fit sine wave function of the Lumicycle Analysis software.

Phase shifting response and data analysis: According to the experiment, retinal explants are exposed to different durations (0.5, 1 and 3 h) and irradiances (10^{13} , 10^{14} and 10^{15} photons/cm²/s) of 465 nm monochromatic light. Light stimulation were done at CT16 since previous data has shown that light maximally phase delays the retinal clock at this CT time (26). Thereafter, we

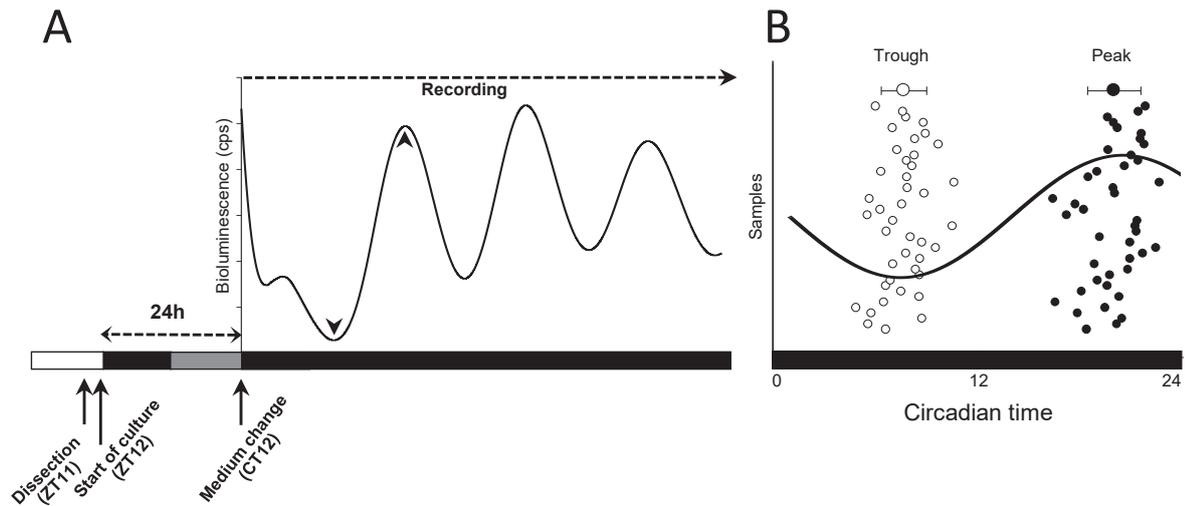
used constant irradiance and duration (10^{14} photons/cm²/s, 30 min) to study the effect of different wavelengths (395, 465 and 520 nm) using bright LED light sources (Superbrightleds; supplementary Fig. 4C). Phase shifts are calculated as the difference of the predicted phase and the measured peak of PER2::Luc based on the 3 days respectively before and after light/movement stimulation. Data from the irradiance, duration and total number of photons were fit with a four-parameter logistic equation using a modified form of the Naka–Rushton equation previously described (46, 71). Radiometric measurements were made by using an International Light model IL1700 photometer (International Light Technologies) and a spectrophotometer (Specbos 1211, JETI).

Quantitative RT-PCR: The relative expression of the different opsins was quantified in cultured wild-type *Per2^{Luc}* retinas (light stimulated and dark control) collected at the end of the duration experiment and in retinas from 4-weeks-old wild-type and *Nrl^{-/-}* mice. Cultured retinas were snap frozen at the trough after 10 days in culture during which they had been exposed to 0.5, 1 or 3 h of light or no light (DC). To compare, we also sampled retinas that were cultured for only 24h. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen) and reverse transcribed using random primers and MMLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real time RT-PCR was then performed on a LightCycler™ system (Roche Diagnostics) using the light Cycler-DNA Master SYBR Green I mix. *Hprt* was used for internal standardization of target gene expression. The efficiency and the specificity of the amplification were controlled by generating standard curves and carrying out melting curves. Relative transcript levels of each gene were calculated using the second derivative maximum values from the linear regression of cycle number versus log concentration of the amplified gene. Primer sequences were: *Hprt* sens ATCAGTCAACGGGGGACATA and reverse AGAGGTCCTTTTCACCAGCA; *SW opsin* sens CAGCCTTCATGGGATTTG and reverse GTGCATGCTTGGAGTTGA; *MW opsin* sens GCTGCATCTTCCCACTCAG and reverse GACCATCACCACCACCAT; *Rhodopsin* GCCACCACTCAGAAGGCAG sens and reverse GATGGAAGAGCTCTTAGCAAAG; *Melanopsin* sens TCGAGTTCTATGCCTTCTG and reverse GGCACGTAGGCACTCCAAC; *Neuroopsin* sens ACTATGCACCTGAGCCCTTC and reverse TGGCTGCTATGGATTCGACT; *Per2* sens CCACACCTTGCTCCGAAAATA and reverse ACTGCCTCTGGACTGGAAGA.

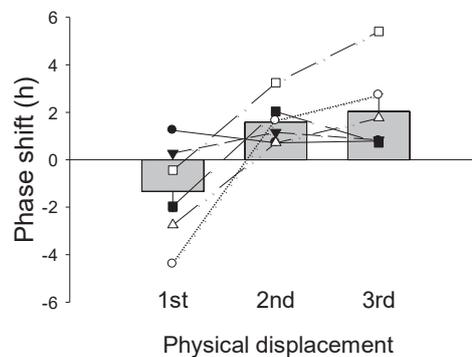
Retinal histology: Four-week-old wild-type and *Nrl^{-/-}* mice were killed by CO₂ inhalation and decapitation. Whole eyes were dissected and immersion-fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4 °C. Eyes were frozen, cut at 20 μm thickness and mounted on glass slides. Retinal sections were hydrated in graded ethanol solutions (95, 75,

50 %) of 30 s each. The retinal sections were then stained with 1% cresyl violet and dehydrated in graded ethanol solutions (50, 75, 95, 100%).

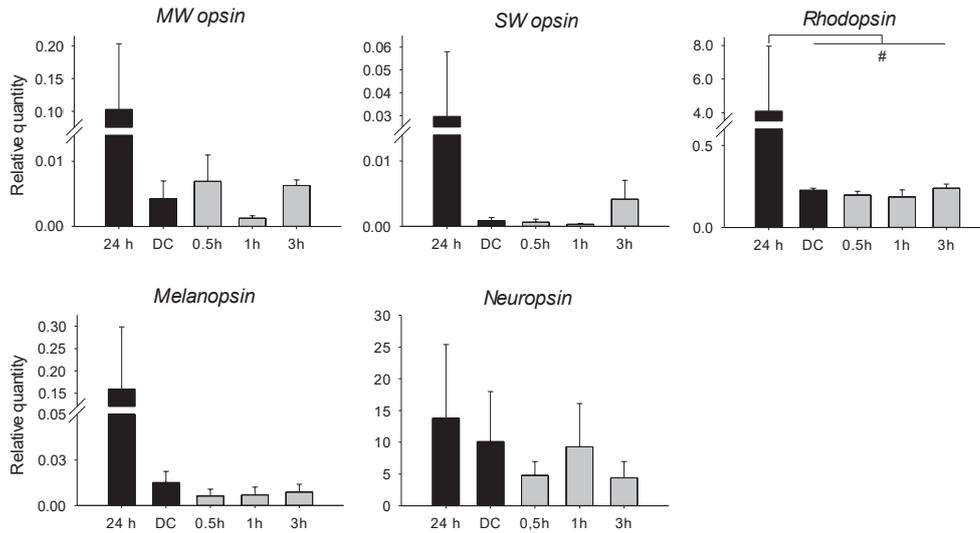
Statistical analysis: Statistical analysis were performed using one-way ANOVA followed, when significant ($p \leq 0.05$) by Fisher -LSD *post-hoc* test. Results are expressed as mean \pm SEM.



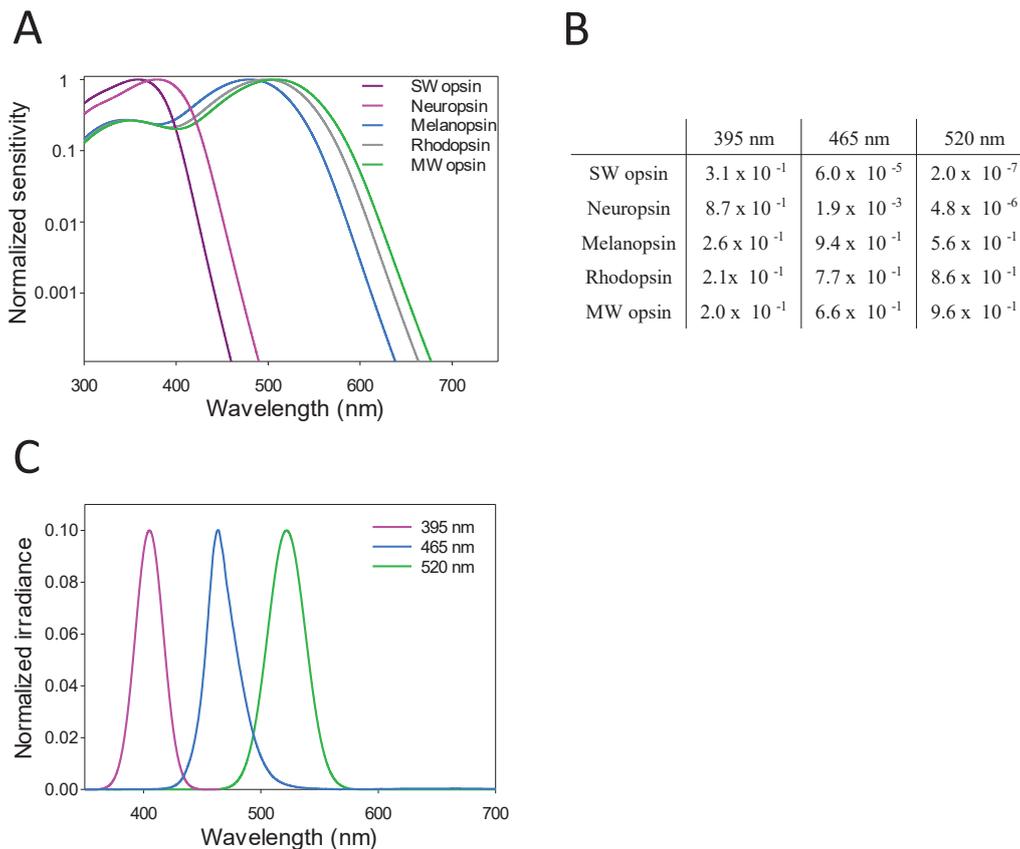
Supplementary Fig. 1. Determination of a marker of PER2::Luc oscillation. A. Schematic representation of the protocol used for the retinal explant culture and calculation of the circadian time of the oscillation. Retinal explants were dissected at ZT11 and cultured just before light offset (ZT12). The projected ZT12 is then considered as CT12 and used to predict the circadian time of the retinal clock *in vitro*. Arrow heads correspond to the trough and the peak of the first complete oscillation. **B.** The first trough (white circles) and peak (black circles) of PER2::Luc oscillation occur respectively at CT 7.65 ± 1.33 and CT 19.94 ± 1.55 (mean ± SD). Each circle on the same line represents the trough and the peak of the same retinal explant (n=42).



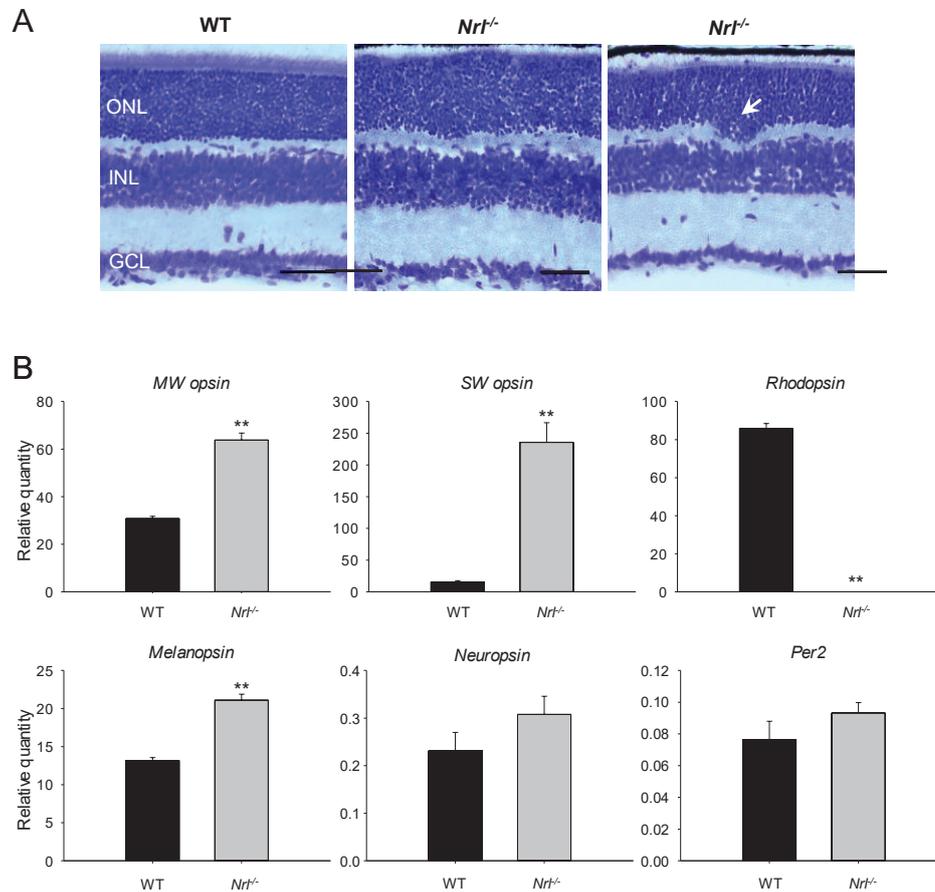
Supplementary Fig. 2. Physical displacement of dishes induces robust and random phase shifts of the retinal clock. For light-induced phase shift experiments of the retinal clock, the classical procedure involves the transfer of the cultured tissue into a light stimulator outside the Lumicycle. The effect of physical displacement on the phase of PER2::Luc expression was analysed following three successive displacements of the culture dishes. We show that for the same retinal explant, a robust and random effect of displacement on the phase of PER2::Luc (advance or delay) that may simply result from a medium homogenization. Each symbol correspond to an individual explant (n=6). Bars represent the mean ± SEM.



Supplementary Fig. 3. Effect of the duration of the light stimulation on the relative expression of mRNA opsins in retinal explants from *Per2^{Luc}* mice. Relative expression of opsins (MW opsin, SW opsin, rhodopsin, melanopsin and neuropsin) of 10 days-cultured retinas stimulated by different durations (0.5 h, 1h and 3h; grey bars) at 465 nm was compared to DC and 24h cultured retinas (black bars). Bars represent mean \pm SEM (24h: n=2; DC: n=3; 0.5h-3h: n=3-5). #: p<0.05.



Supplementary Fig. 4. Spectral sensitivity of mouse retinal photoreceptors and spectrum of L.E.D light. **A.** Normalized sensitivity of photoreceptors based on Govardovkii's nomograms (37) and adapted to melanopsin and neuropsin (based on (34, 41)). **B.** Summary of the normalized sensitivity of the photopigments at each wavelength used in the present study. **C.** Peaks and half-bandwidth of the LEDs used in this study. All values are normalized (purple LED, I_{\max} =395 nm, half-bandwidth=8 nm; blue LED, I_{\max} =465 nm, half-bandwidth=15 nm; I_{\max} =520 nm, half-bandwidth=16 nm).



Supplementary Fig. 5. Relative cone opsins, melanopsin, neurospine and *Per2* expression in the retina of wild-type (WT) and rodless (*Nrt*^{-/-}) mice. **A. Photomicrographs of retinal sections from 4 week-old wild-type and *Nrt*^{-/-} mice counterstained with cresyl violet. *Nrt*^{-/-} retina appears grossly normal at this age with sparse rosette-like structures indicating abnormal organization of photoreceptors (white arrow). ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer. Scale = 50 μ m. **B.** Relative opsins (SW, MW, rhodopsin), melanopsin and neurospine mRNA levels in the retina of WT (black bars) and *Nrt*^{-/-} (grey bars) mice determined by using real time RT-PCR. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 6 for each genotype). The *Nrt*^{-/-} knockout mouse is characterized by a total absence of rhodopsin and over-expression of SW and MW opsins. The relative quantity of melanopsin is also up-regulated whereas neurospine levels are equivalent in both genotypes. The level of *Per2* is not altered in the *Nrt*^{-/-} mice. **: p<0.01.**

5.3 Induction par la lumière des gènes de l'horloge dans les oscillateurs rétiniens

Afin d'évaluer l'existence d'une horloge « maître », principale cible de la lumière et assurant la synchronisation des oscillateurs rétiniens secondaires, nous avons initialement exposé des souris sauvages et déficientes en photorécepteurs (*Opn4*^{-/-} et *TRβ*^{-/-}) à des stimulations monochromatiques de 15 min, à des longueurs d'onde ciblant préférentiellement un type de photorécepteur (480 nm pour *Opn4*^{-/-} et 530 nm pour *TRβ*^{-/-}). Les différentes couches ont été ensuite isolées par microdissection au laser et les gènes de l'horloge *Per1* et *Per2*, et le marqueur d'activité neuronale *C-Fos* ont été quantifiés par RT-qPCR dans les trois couches de la rétine (ONL, INL et GCL). Les données présentées sont préliminaires : certains échantillons restent à compléter.

Compte tenu des résultats que nous avons obtenus par l'approche *in vitro* mettant en avant le rôle des bâtonnets, nous avons décidé de stimuler des souris *Nrl*^{-/-} à 370 et 530 nm. Cette expérience a été réalisée tardivement au cours de ma thèse et n'est pas achevée. Les souris ont été stimulés et leurs yeux prélevés. L'extraction des ARNm et la quantification de l'expression des gènes reste à faire.

5.3.1 Induction de *Per1*, *Per2* et *C-Fos* par la lumière visible chez les souris WT et photorécepteurs-déficientes

Pour vérifier la présence d'une éventuelle contamination dans nos échantillons microdisséqués par les couches voisines, nous avons effectué une RT-PCR sur des échantillons obtenus chez les souris WT, *Opn4*^{-/-} et *TRβ*^{-/-} permettant d'évaluer l'expression de différents marqueurs spécifiques à chaque couche (**Figure 5.5**). Le gène *mGluR6* est un marqueur des cellules bipolaires de l'INL, *Th* est un marqueur des cellules amacrines dopaminergiques et *Nrl* est présent uniquement dans la couche des photorécepteurs. Ces marqueurs ont été détectés uniquement dans les couches rétiniennes où leur présence était prévisible, ce qui indique une absence de contamination de nos échantillons.

Quelle que soit la longueur d'onde utilisée, la stimulation lumineuse entraîne chez la souris WT une augmentation de l'expression de *C-Fos* dans la GCL ($p < 0,05$) et dans l'INL ($p < 0,01$), mais pas dans l'ONL ($p > 0,05$), par rapport au DC (**Figure 5.6A**). Le niveau d'expression du gène de l'horloge *Per1* est augmenté dans l'ONL après une stimulation lumineuse à 530 nm ($p < 0,05$) alors qu'après une stimulation à 480 nm, le niveau de *Per1* est augmenté dans l'ONL mais sans dépasser le seuil de significativité ($p = 0,057$). L'expression de *Per2* est augmentée dans l'INL et l'ONL uniquement après une stimulation



FIGURE 5.5 – Evaluation par RT-PCR de la contamination des différentes couches nucléaires microdissequées chez les souris WT et déficientes en photorécepteurs. Pour chaque gel, les deux premiers échantillons sont les contrôles positifs, le puit H₂O est le contrôle négatif, les autres représentent différents échantillons testés pour chaque couche (ONL, INL et GCL).

à 480 nm ($p < 0,05$) par comparaison aux DC correspondants. Pour déterminer le rôle de la mélanopsine et des cônes MW, les mêmes stimulations lumineuses ont été réalisées chez des souris *Opn4*^{-/-} et *TRβ*^{-/-} (**Figure 5.6B et C**). Chez les souris *Opn4*^{-/-}, l'induction de *C-Fos* est conservée dans l'INL ($p < 0,05$) et la GCL ($p < 0,05$) suite à une stimulation à 480 nm. L'induction de *Per2* à 480 nm est abolie dans l'ONL et l'INL chez les souris *Opn4*^{-/-} par comparaison aux WT. Chez les souris *TRβ*^{-/-}, l'induction de *C-Fos* n'est conservée que dans l'INL ($p < 0,05$) suite à une stimulation à 530 nm. Dans la GCL, le niveau de *C-Fos* tend à être plus important que le DC sans toutefois dépasser le seuil de significativité ($p = 0,062$). L'induction de *Per1* est également abolie dans l'ONL par comparaison aux WT.

5.3.2 Induction de *Per1-Per2* et *C-Fos* par la lumière UV chez les souris WT

Pour évaluer la contribution des opsines sensibles aux UV, l'opsine des cônes SW et la neuropsine, nous avons également stimulées des souris WT avec de la lumière UV (370 nm). Comme pour les autres longueurs d'onde, une stimulation à 370 nm induit l'expression de *C-Fos* dans l'INL et la GCL ($p < 0,05$) mais pas dans l'ONL. Concernant les gènes de l'horloge, une induction de *Per1* est observée uniquement dans l'INL ($p < 0,05$) et *Per2* uniquement dans l'ONL ($p < 0,05$).

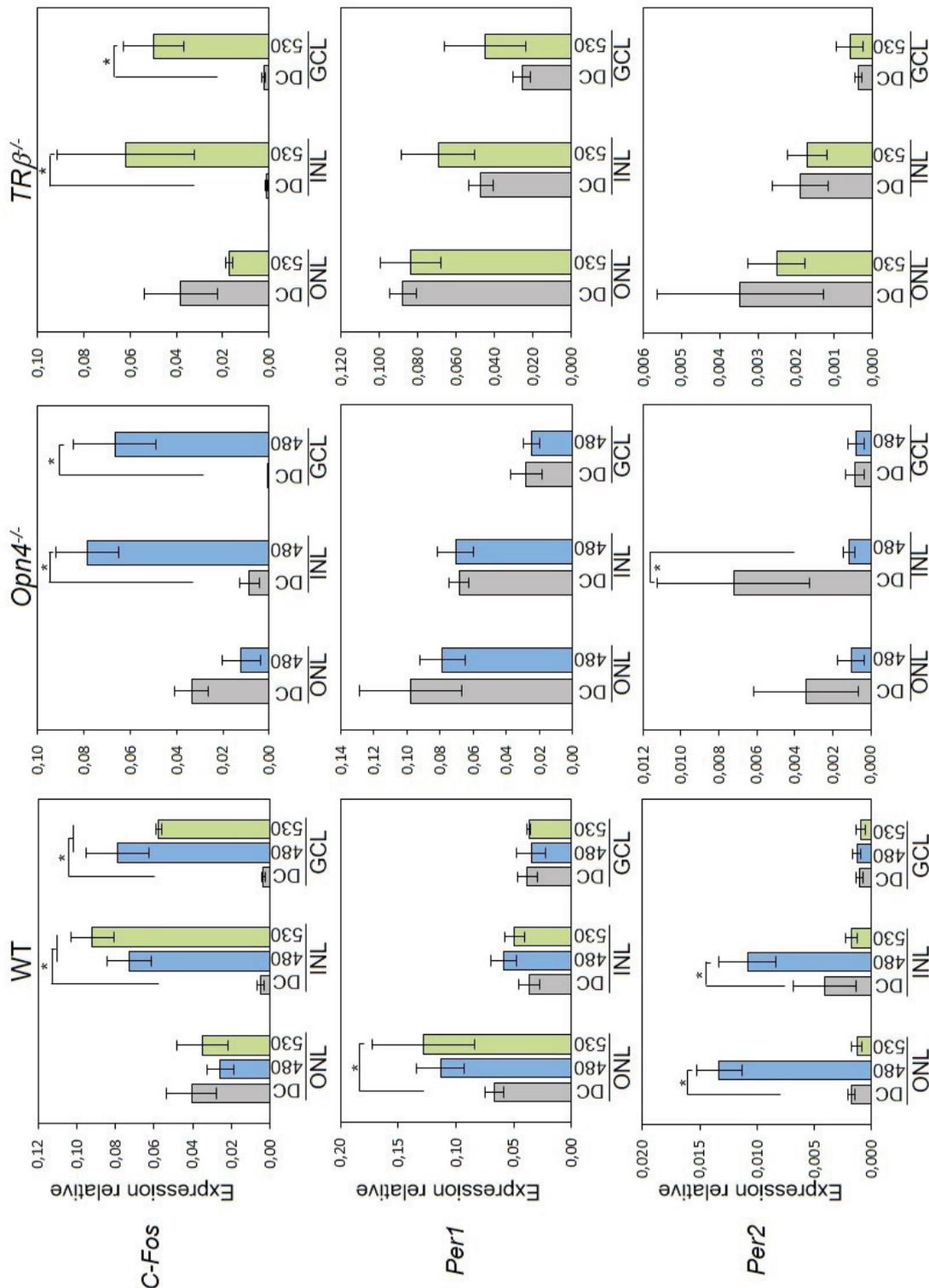


FIGURE 5.6 – Induction par la lumière des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2*, et de *C-Fos* dans les différentes couches de la rétine (ONL, INL et GCL) isolées par microdissection au laser. Les souris ont été exposées à une stimulation de 15 min à $1,98 \times 10^{14}$ photons/cm²/s à deux longueurs d'onde : 480 nm (barres bleues) ou 530 nm (barres vertes). Les contrôles au noir sont représentés par les barres grises. A. Souris WT (DC : n = 3 – 5 (sauf GCL *C-Fos* : n = 2); 480 : n = 3-5 (sauf ONL *Per2* : n = 2); 530 : n = 3-5). B. Souris *Opn4*^{-/-} (DC : n = 3 – 4 (sauf GCL *C-Fos* : n = 1); 480 : n = 3 – 5). C. Souris *TRβ*^{-/-} (DC : n = 3 – 5; 530 : n = 4 – 5). Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm SEM. * = p<0,05.

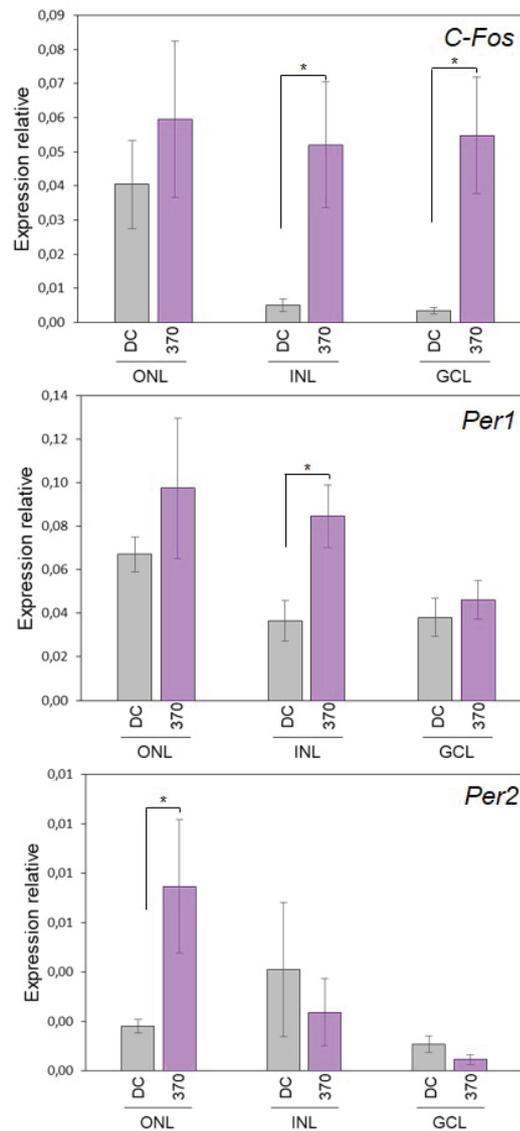


FIGURE 5.7 – Induction de *Per1*, *Per2* et *C-Fos* après une stimulation par la lumière UV. Les souris ont été exposées à une stimulation de 15 min à $1,98 \times 10^{14}$ photons/cm²/s à 370 nm (barres violettes). Les gènes ont été quantifiés dans les différentes couches de la rétine (ONL, INL et GCL) isolées par microdissection au laser. DC : n = 3 – 5 (sauf GCL *C-Fos* : n = 2); 480 : n = 4-5. Les données sont représentées sous la forme moyenne \pm SEM. * = p < 0,05

Discussion

6.1 Développement d'un protocole standardisé de culture d'ex-plants rétiniens

Ces dernières années, le développement de l'imagerie par bioluminescence pour étudier l'expression de gènes/protéines a très largement contribué à une meilleure compréhension du fonctionnement endogène et autonome des horloges circadiennes, centrale et périphériques (Nishide et al. 2006 ; Welsh et al. 2004 ; Yamazaki et al. 2000 ; Yoo et al. 2004). Pour l'horloge rétinienne de mammifères, cette technique permet d'accéder aux propriétés intrinsèques de l'horloge et plus particulièrement les effets de la lumière, administrée de façon aiguë ou sous la forme d'un cycle L/D. Deux lignées murines porteuses d'un rapporteur bioluminescent couplé à un gène de l'horloge ont été utilisées : la lignée de souris *Per2^{Luc}* (Buhr et Van Gelder 2014 ; Buhr et al. 2015 ; Buonfiglio et al. 2014 ; Jaeger et al. 2015 ; Ruan et al. 2008) et la lignée de rat *Per1^{Luc}* (Buonfiglio et al. 2014). Cependant, aucun protocole de culture standardisé assurant la reproductibilité et la comparaison des résultats obtenus dans différentes études n'avait été publié au début de mon projet de thèse.

Au début de ma thèse, nous avons prévu qu'un même explant rétinien soit exposé à 2 conditions expérimentales randomisées : stimulation lumineuse monochromatique et contrôle au noir, chacune de ces conditions étant séparée par un renouvellement du milieu de culture. Ainsi, chaque explant ne serait exposé qu'une fois à la lumière afin d'éviter l'épuisement des photopigments par la lumière. En effet, une critique à l'utilisation de l'approche *in vitro* pour l'étude de l'effet de la lumière est l'absence du RPE dans les préparations d'explant car celui-ci participe au recyclage des photopigments

des cônes et des bâtonnets. Deux éléments importants sont à mettre en avant pour la culture d'explants de rétines seules. Premièrement, le RPE exprime également les gènes de l'horloge dont *Per2* (Baba et al. 2010). L'utilisation d'une préparation rétine-RPE générerait un signal de bioluminescence issu des 2 tissus et interférerait donc avec nos mesures. Deuxièmement, comme nous l'avons vu dans l'introduction, le recyclage des photopigments, notamment des cônes peut être réalisé via les cellules de Müller (Arshavsky 2002 ; Mata et al. 2002 ; Wang et al. 2009 ; Wang et Kefalov 2011). De plus, une étude récente a montré qu'un processus de recyclage dépendant de la lumière a lieu au sein même des segments externes des cônes et des bâtonnets (Kaylor et al. 2017). Ce mécanisme permettrait une réponse des photorécepteurs à des stimulations lumineuses prolongées, sans épuisement, même en l'absence de RPE. Dans nos expérimentations, les explants rétinien sont maintenus à l'obscurité constante dès la fin de la dissection et ont été stimulés par la lumière une seule fois, permettant de nous affranchir de tout biais lié à l'absence de RPE.

Initialement, nous étions partis de l'hypothèse que le renouvellement de milieu entre deux conditions expérimentales resynchronise les horloges rétiniennes. En effet, il est connu que le renouvellement du milieu de culture, l'application de divers composés (forskoline, D-Glucose) ou un choc sérique, permettent une remise à l'heure des rythmes d'expression des gènes de l'horloge dans les cellules et les tissus (Abe et al. 2002 ; Balsalobre et al. 2000, 1998 ; Hirota et al. 2002 ; Izumo et al. 2003 ; Maronde et Motzkus 2003 ; pour revue, voir Kaeffer et Pardini 2005). Cependant, nous avons observé que le renouvellement du milieu de culture modifie la phase des oscillations de *PER2::Luc*. Cet effet est dépendant du temps pendant lequel les explants rétiniens ont été maintenus en culture avant le renouvellement du milieu, suggérant que ce changement ne resynchronise pas ou que partiellement l'horloge rétinienne (ou les horloges rétiniennes). Un effet similaire a été reporté par Nishide et al. (2008). Les auteurs ont observé que la phase d'expression de *Bmal1-Luc* est modifiée, chez des explants de SCN de souris, après le renouvellement de milieu de culture (Nishide et al. 2008). Les auteurs ont corrélé cet effet, absent chez l'adulte, à l'immaturité des connexions synaptiques dans le SCN de souris et à la faible expression de VIP (Nishide et al. 2008). Le SCN immature serait donc comparable à une horloge dont les oscillateurs qui la composent sont faiblement couplés. Or, la rétine est également composée de plusieurs horloges couplées au sein des trois couches nucléaires (Jaeger et al. 2015) et caractérisées par une période endogène qui leur est propre. Nous pouvons émettre l'hypothèse que chaque horloge rétinienne présente une cinétique de resynchronisation différente après le renouvellement de milieu. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'isoler les

3 couches rétiniennes (ONL, INL et GCL), mécaniquement par exemple (Jaeger et al. 2015 ; Sandu et al. 2011) et de déterminer l'effet du renouvellement de milieu sur la phase de chacun de ces oscillateurs.

Compte-tenu de ce biais, nous avons décidé que chaque explant rétinien serait utilisé soit comme DC, soit serait exposé à une stimulation lumineuse, évitant ainsi tout renouvellement du milieu. Pour cela, nous avons établi un protocole présentant plusieurs avantages permettant la reproductibilité des résultats. D'une part, la mise en culture des explants rétiniens est toujours réalisée au même moment du cycle 12L/12D, à ZT12, et coïncide avec la transition lumière/obscurité du cycle lumineux, imposé aux animaux. Ceci permet de ne pas interrompre la phase lumineuse à laquelle les rétines sont exposées avant la mise en culture. D'autre part, le changement de milieu effectué précisément 24 h après la mise en culture permet de conserver un marqueur temporel (CT12) que nous avons utilisé pour calculer l'heure biologique de l'horloge rétinienne *in vitro*, plus précisément les temps circadiens de l'acrophase et la bathyphase de la première oscillation complète de PER2::Luc. Déterminer l'heure biologique de l'horloge rétinienne *in vitro* est indispensable afin d'étudier les effets de la lumière sur celle-ci, effets qui sont dépendants de l'heure d'exposition selon une PRC (Buhr et Van Gelder 2014). Dans les études précédentes, l'acrophase de l'horloge rétinienne a été déterminé de manière arbitraire, soit en utilisant le temps ZT projeté auquel l'animal était soumis (Ruan et al. 2008), soit l'acrophase de l'ARNm de *Per2*, quantifié sur des prélèvements rétiniens réalisés sur un cycle circadien de 24 h (Buhr et Van Gelder 2014). Nous avons pu ainsi déterminer objectivement, pour chaque explant rétinien, et en prenant en compte sa période endogène, le temps circadien CT16 qui génère un retard maximal de la phase de l'horloge rétinienne.

6.1.1 Effet du déplacement des boîtes de culture sur la phase de PER2::Luc

Nous avons observé que le seul déplacement physique des boîtes de culture contenant les explants rétiniens induit des modifications importantes de la phase de l'horloge de la rétine (avance ou retard). Cet effet pourrait être causé par la simple ré-homogénéisation des composés du milieu lors du déplacement des boîtes de culture. Ce protocole utilisé dans toutes les études précédentes (Buhr et Van Gelder 2014 ; Buhr et al. 2015 ; Ruan et al. 2008) induit donc un biais majeur dont il a fallu s'affranchir pour obtenir des conditions optimales d'étude de la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne. Cet effet sur la phase des horloges circadiennes est très peu documenté. Deux études ont évalué l'effet d'une stimulation mécanique respectivement sur des explants de RPE (Baba et al.

2010) et sur des explants de SCN de souris (Nishide et al. 2008). Dans la première étude, les auteurs ont évalué l'effet de stimulations lumineuses sur l'horloge du RPE en utilisant un protocole similaire à celui utilisé pour la rétine. Les explants de RPE n'ayant pas subi de stimulation lumineuse mais ayant été bougé du Lumicycle présentent des décalages de phase importants, jusqu'à plusieurs heures d'avance ou de retard (Baba et al. 2010). Ce résultat indique donc l'existence d'un effet similaire à celui que nous avons observé dans un autre tissu. Dans l'étude sur les explants de SCN (Nishide et al. 2008), la stimulation mécanique ne correspond pas à un déplacement physique des boîtes de culture contenant les explants mais au retrait puis au remplacement du même milieu dans la boîte de culture, réalisée à CT21. Les auteurs n'ont pas observé de modification significative de la phase d'expression de *Bmal1-Luc* par bioluminescence. La divergence des résultats entre notre étude et celle de Nishide et al. (2008) pourrait être attribuée à plusieurs facteurs : stimulation des explants non comparable et réalisée à différents CT (CT21 versus CT16), étude réalisée sur des SCN de souris et non pas sur de la rétine adulte, différents gènes de l'horloge suivis par bioluminescence (*Bmal1-Luc* versus *PER2::Luc*).

La mise en évidence de l'effet robuste et aléatoire du mouvement des boîtes de culture sur la phase de l'horloge rétinienne interroge sur les résultats obtenus par les études précédentes utilisant la méthode « classique » de stimulation lumineuse impliquant un déplacement des boîtes de culture (Buhr et Van Gelder 2014; Buhr et al. 2015; Ruan et al. 2008). Cet effet n'a pas été reporté dans ces études. Nos données suggèrent très fortement que le décalage de phase mesuré dans ces études n'est pas la conséquence uniquement de la stimulation lumineuse mais pourrait être imputé entièrement ou partiellement au mouvement lui-même. Dans ces études, l'utilisation de stimulations lumineuses longues (3h) et à forte irradiance (Buhr et Van Gelder 2014; Buhr et al. 2015) a pu permettre de masquer en partie cet effet. Le développement d'un système de stimulation, directement intégré dans le Lumicycle, a représenté une avancée importante qui nous a permis d'analyser de façon non-biaisée les effets de la lumière sur l'horloge rétinienne. Ce développement a été long et difficile à cause d'une part de la complexité de la forme de la matrice entourant les boîtes de culture et d'autre part de la sensibilité à la lumière des PMT qui a requis de concevoir un système étanche à la lumière.

6.2 Réponse globale de l'horloge rétinienne à lumière

6.2.1 Sensibilité à la lumière de l'horloge rétinienne

Établir la sensibilité à la lumière d'une fonction rythmique donnée est une étape clé en chronobiologie qui n'avait pas encore été réalisée pour l'horloge rétinienne. Cette sensibilité s'obtient en mesurant la réponse de l'horloge rétinienne à différentes stimulations lumineuses d'intensité croissante, par exemple le décalage de phase de PER2::Luc. L'utilisation de différentes longueurs d'onde permet, en outre, d'établir la sensibilité spectrale de cette réponse et d'en déduire les photorécepteurs mis en jeu.

Les premières études ont utilisé une durée et une irradiance uniques de lumière soit blanche (Ruan et al. 2008) soit monochromatique (480 nm, Buhr et Van Gelder 2014). En 2015, Buhr et al. (2015) ont appliqué des stimulations lumineuses à des explants rétiniens, à plusieurs irradiances et à 417 nm. Ils ont établi une courbe de réponse à l'irradiance mais sans déduire la sensibilité de l'horloge rétinienne à cette longueur d'onde. Cependant, ils ont utilisé des stimulations longues de 3 h. Or nos résultats indiquent que l'horloge rétinienne n'est pas capable d'intégrer les photons sur une durée supérieure à 30 min et sature au-delà de ces durées (**Article 1, figure 1**).

En utilisant le système de stimulation intégré au Lumicycle, nous avons établi les premières courbes de réponse à différentes durées et irradiances qui nous ont permis tout d'abord, d'optimiser les paramètres de la stimulation lumineuse utilisée. Nous avons ainsi montré qu'une durée plus courte (30 min versus 1h de lumière blanche ou 3h de lumière monochromatique) et une irradiance 10 fois inférieure à celle utilisée précédemment sont suffisantes pour induire un décalage de phase significatif de l'expression de PER2::Luc. Réduire la durée et l'irradiance de la stimulation, tout en obtenant une réponse similaire, est important car cela permet d'éviter toute phototoxicité liée à l'utilisation d'intensités de lumière trop importantes ou trop longues (Hunter et al. 2012 ; Pitts 1993), notamment à certaines longueurs d'onde.

Dans la **Figure 6.1**, nous comparons les seuils de sensibilités à la lumière de l'horloge centrale du SCN et de l'horloge rétinienne. Nous pouvons constater que l'irradiance nécessaire pour induire un décalage de phase de l'horloge rétinienne ($>10^{13}$ photons/cm², **article 1**) est très supérieure à l'intensité requise pour induire un décalage de phase comportemental ($10^9 - 10^{10}$ photons/cm²/s, Butler et Silver 2011 ; Freedman et al. 1999 ; Hattar et al. 2003 ; Hut et al. 2008 ; Panda et al. 2002). L'horloge rétinienne est donc moins sensible à la lumière que l'horloge centrale. Cette différence de sensibilité suggère l'implication de photorécepteurs différents et/ou de l'existence d'un mécanisme d'intégration des photons, distinct entre l'horloge rétinienne et l'horloge centrale du

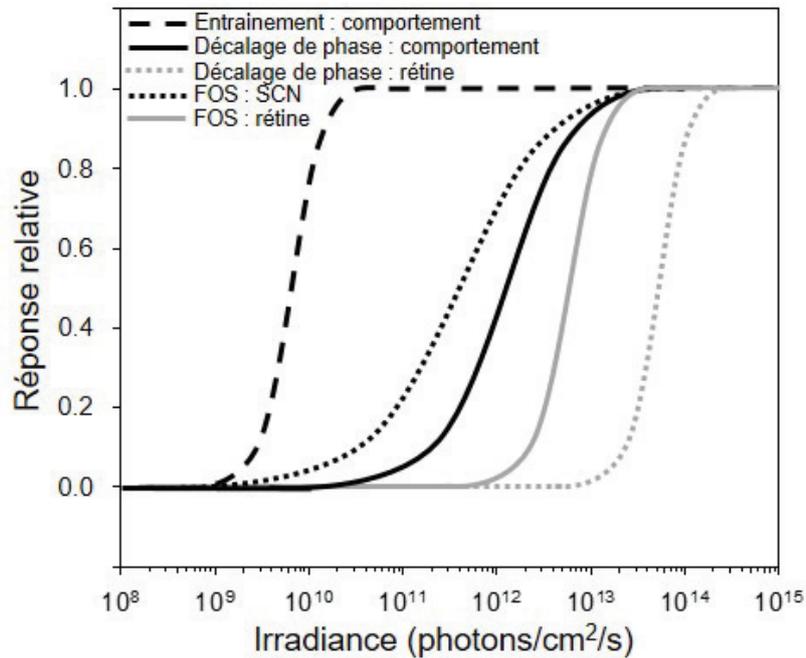


FIGURE 6.1 – Sensibilités à la lumière de l’horloge centrale et de l’horloge rétinienne. Cette figure compare la sensibilité de plusieurs réponses du système circadien (entraînement et décalage de phase comportemental, décalage de phase de PER2::Luc) dans la rétine et le SCN. L’induction de *C-Fos* par la lumière dans le SCN et la rétine est également reportée et permet de comparer la réponse à la lumière des horloges (rétinienne et centrale) et celle des tissus (rétine et SCN). Seules les études ayant utilisées des lumières monochromatiques comprises entre 465 et 520 nm ont été incluses pour conserver une comparaison valide des irradiances.

SCN.

De plus, on peut noter également une différence de sensibilité à la lumière de la rétine en tant que tissu, mesurée par l’induction de *C-Fos* (10^{12} photons/cm²/s, Dkhissi-Benyahya et al. 2000), par comparaison à celle de l’horloge rétinienne ($>10^{13}$ photons/cm²), évaluée par le décalage de phase de PER2::Luc (**Figure 6.1**). Ceci indique une différence entre le niveau de lumière suffisant pour générer une réponse de la rétine et celui nécessaire pour induire un décalage de phase de l’horloge rétinienne, suggérant une dichotomie entre les mécanismes d’intégration de l’information lumineuse pour ces deux réponses au sein même de la rétine. Les mécanismes mis en jeu restent à élucider.

6.2.2 Rôle des photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne

Pour identifier le rôle de chaque type de photorécepteurs, notre stratégie a été d'utiliser tout d'abord des stimulations monochromatiques de différentes longueurs d'onde chez les souris WT et de comparer les réponses obtenues, une approche classique en chronobiologie (Lucas et al. 2012).

Chez les souris WT, nous avons montré que des stimulations lumineuses à 395, 465 ou 520 nm induisent un décalage de phase de l'horloge rétinienne, suggérant que cette dernière est capable de répondre dans le spectre lumineux visible et dans l'UV. De plus, ces stimulations induisent un décalage de phase de PER2::Luc comparable aux 3 longueurs d'onde : on ne peut donc pas exclure que les irradiances utilisées soient saturantes. Cependant, étant donné que la gamme de sensibilité de l'horloge rétinienne est très étroite ($\sim 10^{13}$ - 10^{14} photons/cm²/s, **Figure 6.1**), nous avons sélectionné une irradiance nous assurant d'obtenir un décalage de phase significatif pour toutes les stimulations testées.

Malgré la proximité des sensibilités spectrales de plusieurs photorécepteurs, l'utilisation de différentes longueurs d'onde nous éclaire en partie sur les photorécepteurs impliqués. En effet, la sensibilité de la neuropsine étant réduite de plus de 5 unités log à 520 nm par rapport à sa sensibilité maximale, l'obtention d'un décalage de phase à cette longueur d'onde invalide donc la possibilité que la neuropsine soit la seule opsine responsable de la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne (Buhr et al. 2015). D'autres éléments minimisent un rôle potentiel de la neuropsine. En effet, cette opsine est détectée dans la rétine (Kojima et al. 2011 ; Tarttelin et al. 2003) mais ne présente pas une expression significative chez le genre humain (Kojima et al. 2011) et le primate non-humain (Mure et al. 2018). Chez la souris, elle est également très faiblement exprimée : nous n'avons pu la quantifier qu'en utilisant des niveaux d'amplifications importants par RT-qPCR. Chez l'humain, il est de plus difficile de concevoir un rôle de la neuropsine dans l'entraînement de l'horloge rétinienne car le cristallin filtre les UV, pour des longueurs d'onde inférieures à 390 nm (Boettner et Wolter 1962 ; Najjar et al. 2016 ; Pitts 1993).

En outre, l'étude de Buhr et al. (2015) présente certains biais expérimentaux. Tout d'abord, ils ont utilisé des stimulations lumineuses à 417 nm induisant un décalage de phase de PER2::Luc, qu'ils attribuent uniquement aux opsines sensibles aux UV, la neuropsine et/ou l'opsine des cônes SW. Or, en se basant sur les nomogrammes des différents photorécepteurs murins, la neuropsine a une sensibilité à peine supérieure à celle de la rhodopsine et de l'opsine des cônes MW (respectivement 1,3 et 1,5 fois

plus sensible ; **Article 1, figure S4**) à 417 nm et environ 0,2 fois moins sensible que la mélanopsine. En utilisant cette longueur d'onde et les forts niveaux de lumière ainsi que la durée longue de la stimulation, il n'est pas possible d'exclure une participation de la mélanopsine, des cônes MW ou des bâtonnets.

L'utilisation de modèles transgéniques déficients soit en photorécepteurs (*Opn4^{-/-}*, *h.red DTA*, *TRβ^{-/-}*), soit dans des protéines des voies de phototransduction (*Gnat1^{-/-}*, *Gnat2^{-/-}*), a été une approche cruciale pour disséquer le rôle des photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge du SCN (Altimus et al. 2010 ; Dkhissi-Benyahya et al. 2007 ; Dollet et al. 2010 ; Hattar et al. 2002, 2003 ; Lucas et al. 2003 ; Panda et al. 2002). Dans notre étude, l'apport des modèles *Opn4^{-/-}*, *TRβ^{-/-}* et *Nrl^{-/-}* a été particulièrement important. Le croisement de ces modèles avec la lignée *Per2^{Luc}* au sein de notre laboratoire a permis d'obtenir de nouveaux modèles d'étude pertinents pour étudier la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne.

Nous avons ainsi montré que la présence de bâtonnets, mais pas de la mélanopsine ou des cônes MW, est requise pour l'induction d'un décalage de phase de l'horloge rétinienne par de la lumière visible (520 nm). Cependant, il est important de noter que le décalage de phase de PER2::Luc mesuré est la résultante de signaux de bioluminescence émis par les différentes couches de la rétine : on ne peut donc exclure la possibilité que l'absence de mélanopsine ou de cônes MW ait un effet sur une des horloges de la rétine mais que cet effet ne soit pas détectable à un niveau plus global d'intégration. Pour résoudre cette question, l'analyse par bioluminescence de la réponse à la lumière de chaque oscillateur isolé mécaniquement (Jaeger et al. 2015) ou en utilisant une caméra avec une résolution spatiale à un niveau cellulaire (Luminoview) peut être envisagé. Dans la 2e partie de mon travail de thèse, j'ai abordé cette problématique par une approche différente (**voir section 6.2.3**).

Nos résultats s'opposent à ceux de Buhr et Van Gelder (2014) et Buhr et al. (2015) qui excluent tout rôle des photorécepteurs dont les bâtonnets. En effet, ces auteurs ont montré que des rétines de souris *Opn4^{-/-rd1/rd1}* (sans cônes, bâtonnets et mélanopsine) sont entraînées par un cycle de lumière blanche *in vitro* (Buhr et Van Gelder 2014). Cependant, chez ce modèle, les bâtonnets et les cônes dégénèrent progressivement avec l'âge. Or, les quantifications par qPCR des opsines chez le modèle *Opn4^{-/-rd1/rd1}* indique que l'expression de la rhodopsine et de l'opsine SW, même fortement réduite, persiste (Buhr et Van Gelder 2014), ce qui avait déjà été rapporté précédemment (Nir et al. 1989 ; Semo et al. 2007). On ne peut donc pas exclure qu'une population de bâtonnets persiste et puisse jouer un rôle dans l'entraînement photique de l'horloge rétinienne. Le niveau d'expression de l'opsine MW n'a par ailleurs pas été mesuré dans cette étude

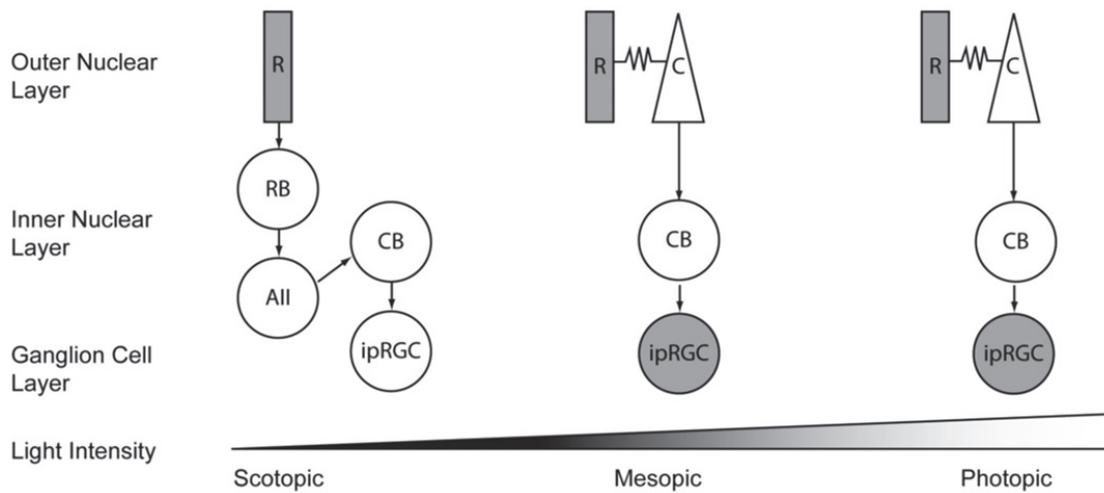


FIGURE 6.2 – Modèle décrivant les circuits utilisés par les bâtonnets pour l'entraînement par la lumière de l'horloge centrale du SCN selon le niveau de luminosité. R = bâtonnets ; RB = cellule bipolaire de bâtonnets ; AII = cellule amacrine AII ; CB = cellule bipolaire de cône ; C = cône. D'après Altimus et al. 2010.

(Buhr et Van Gelder 2014).

L'implication des bâtonnets dans la régulation des fonctions non-visuelles à la lumière (constriction pupillaire, entraînement et décalage de phase comportemental) a déjà été démontrée, non seulement dans leur domaine de sensibilité mais également à des irradiances élevées, bien au-delà de leur domaine scotopique de sensibilité (Altimus et al. 2010 ; Lall et al. 2010). Ces études ont conclu que, selon l'intensité lumineuse, la réponse des bâtonnets emprunte différentes voies de transmission de l'influx nerveux dans la rétine. À faible irradiances (scotopique), les bâtonnets transmettent leur message nerveux par la voie classique des bipolaires de bâtonnets (**Figure 6.2**) tandis qu'à moyenne (mésopique) et forte (photopique) irradiances, les bâtonnets utiliseraient plutôt la voie des cônes *via* les jonctions communicantes (**Figure 6.2** ; (Altimus et al. 2010)). Cette capacité des bâtonnets à répondre à des niveaux élevés de lumière, avec une récupération plus rapide, a été très récemment décrite également pour des réponses visuelles (Tikidji-Hamburyan et al. 2017), au-delà du seuil de réponse des bâtonnets.

Chez la souris WT, des stimulations lumineuses à 395 et à 520 nm induisent des retards de phase de PER2::Luc équivalents, malgré la diminution de sensibilité de la rhodopsine (4 fois moins sensible) à 395 nm par rapport à 520 nm. Nous avons donc voulu déterminer si les bâtonnets étaient également responsables de décalage de phase de PER2::Luc à 395 nm en exposant des rétines de souris *Nrl^{-/-}* à de la lumière UV (395 nm). Les rétines ainsi stimulées présentent un retard de phase diminué par rapport aux WT mais

significativement supérieur aux DC. Cela indique donc d'une part que les bâtonnets participent à la réponse dans l'UV et d'autre part qu'un ou plusieurs autres photorécepteurs sont mis en jeu à cette longueur d'onde. Les deux photorécepteurs sensibles aux UV sont les cônes SW et la neuropsine. Buhr et al. (2015) ont testé la contribution des cônes SW à l'aide du modèle murin KO pour l'opsine SW (*Opn1sw^{-/-}*) à 417 nm et n'ont pas observé de différences de la réponse par comparaison aux WT et ceci quelle que soit l'irradiance utilisée. Cependant, comme indiquée plus haut, l'utilisation de la longueur d'onde 417 nm ne permet pas d'exclure toute contribution des bâtonnets compte tenu de leur sensibilité. Pour affirmer un rôle exclusif de la neuropsine, les auteurs auraient dû évaluer le décalage de phase de l'horloge rétinienne dans l'UV (370-380 nm) sur des explants de rétines de souris *Opn5^{-/-}*. Enfin, le spectre de la lumière blanche utilisé lors de la plupart des expériences d'entraînement de l'horloge rétinienne est dépourvu d'une composante UV (Buhr et Van Gelder 2014; Buhr et al. 2015) et soulève à nouveau la question de la seule activation de la neuropsine.

En résumé, nos résultats montrent donc un rôle des bâtonnets dans le spectre visible et une contribution additionnelle des cônes SW et/ou de la neuropsine dans l'UV dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne. La **figure 6.3** présente un schéma récapitulatif des rôles des différents photorécepteurs impliqués dans le décalage de phase des horloges rétinienne et centrale.

6.2.3 Effet de l'absence d'un photopigment sur la période endogène de la rétine

Un autre résultat important de cette étude est que l'absence de la mélanopsine ou des cônes MW raccourcit significativement la période endogène de l'horloge rétinienne. Le mécanisme responsable de cet effet n'est pas encore identifié mais une hypothèse est actuellement étudiée au sein de l'équipe par une doctorante Chaimaa Kinane (Kinane et al., en préparation) dans un projet sur l'ontogenèse de l'horloge rétinienne. Le raccourcissement de la période endogène est observé chez les souris déficientes en mélanopsine dès l'émergence de l'horloge rétinienne au stade post-natal P8 et pourrait impliquer la DA. En effet, les souris *Opn4^{-/-}* présente une perturbation du système dopaminergique et une perte de l'expression rythmique de certains gènes de l'horloge au niveau de la couche des photorécepteurs (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). Ainsi, la perte de rythmicité dans la couche des photorécepteurs pourrait modifier directement ou indirectement la période endogène globale de l'horloge rétinienne par des mécanismes encore non élucidés. L'étude des paramètres de l'horloge (période, phase) au cours du

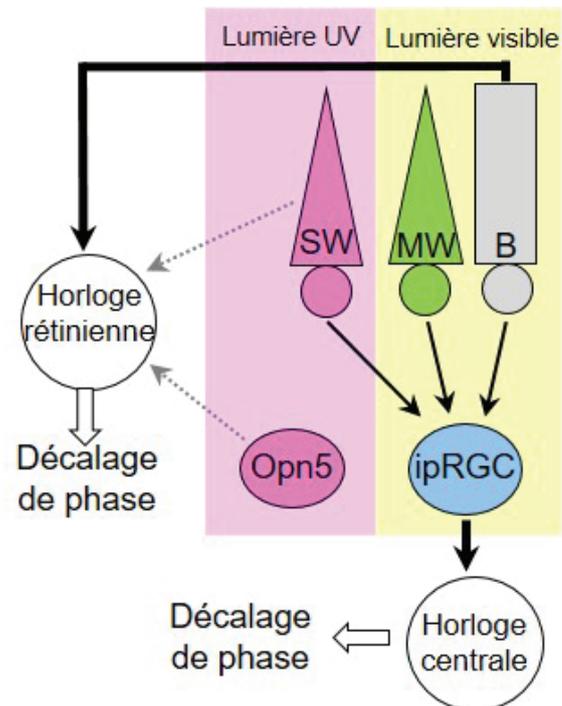


FIGURE 6.3 – Schéma récapitulatif des contributions des photorécepteurs rétiniens dans l'induction d'un décalage de phase de l'horloge centrale du SCN et de l'horloge rétinienne. Les ipRGCs intègrent les informations issues des cônes et des bâtonnets afin de réguler tout un panel de fonctions non-visuelles à la lumière comme le décalage de phase comportemental. Le décalage de phase de l'horloge rétinienne fait appel aux bâtonnets lors de stimulations avec de la lumière visible et pourrait impliquer un recrutement supplémentaire des cônes SW et/ou de la neuropsine (Opn5) dans l'UV.

développement, couplé à des approches pharmacologiques (agonistes et antagonistes des différents récepteurs à la DA) chez des souris WT et *Opn4*^{-/-} sont en cours afin de résoudre cette question.

6.3 Réponse des horloges rétiniennes à la lumière

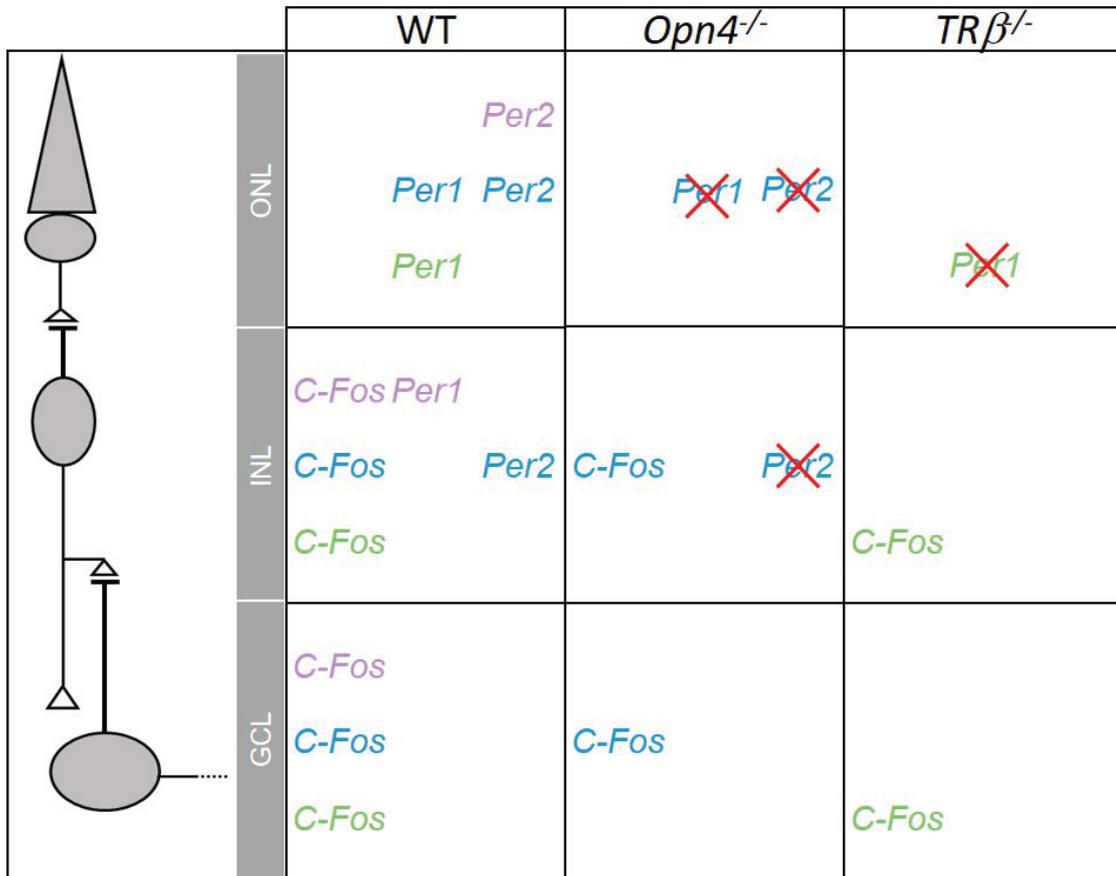
Cette approche nous a permis d'analyser la réponse à la lumière de chaque horloge et de déterminer si l'une d'entre elle joue un rôle majeur dans la réponse globale de l'horloge rétinienne. Une précédente étude de l'équipe avait analysé la réponse des gènes *Per1* et *Per2* dans la région externe (ONL) et interne (INL-GCL) chez des souris WT et *Opn4*^{-/-} en réponse à une stimulation monochromatique à 480 nm (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). La présente étude est la première à analyser l'induction de *C-Fos* et des gènes de l'horloge au sein des trois couches nucléaires de la rétine isolées, en réponse à des stimulations lumineuses à trois longueurs d'onde et chez des souris sauvages et deux modèles déficients en photorécepteurs. La réponse à la lumière de l'horloge rétinienne n'a été précédemment analysée qu'à un niveau global, sur des rétines entières (Lahouaoui et al. 2014, 2016 ; Namihira et al. 2001 ; Yujnovsky et al. 2006). Une limite à cette approche est que les trois gènes choisis présentent une cinétique différente d'induction par la lumière. *C-Fos* est induit de façon rapide et transitoire (Colwell et Menaker 1992), tandis que *Per1* et *Per2* ont une induction plus lente dans la rétine avec un maximum entre 1h et 1h30 respectivement après le début de la stimulation (Namihira et al. 2001). Cette approche permet toutefois de mesurer l'induction de plusieurs gènes sur un seul échantillon et de comparer la réponse à la lumière de la rétine (*C-Fos*) et celle de l'horloge rétinienne (*Per1*, *Per2*).

Les résultats présentés ici sont cependant préliminaires et doivent être confirmés dans les semaines à venir. Ils permettent néanmoins d'avoir un aperçu de l'induction des gènes selon les couches, les longueurs d'onde utilisées et les génotypes. Les résultats sont résumés dans la **figure 6.4**.

Pour le marqueur d'activité neuronale *C-Fos*, nous avons observé une induction de ce gène aux trois longueurs d'onde utilisées (370, 465 et 530 nm) dans la GCL et l'INL mais pas dans l'ONL chez les souris WT. L'absence d'induction dans l'ONL est cohérente avec une étude précédente qui n'avait pas détecté la protéine C-FOS dans l'ONL après une stimulation de lumière blanche ou UV (360 nm ; Hughes et al. 2016). Chez les *Opn4*^{-/-} et les *TRβ*^{-/-}, le même patron est observé : une induction de *C-Fos* dans la GCL et l'INL mais pas dans l'ONL. Ces résultats suggèrent que l'absence de la mélanopsine ou des cônes MW ne modifie pas la capacité de la rétine à répondre à la lumière et que

l'information nerveuse est transmise aux couches internes. Ces résultats confirment ce qui avait été indirectement observé précédemment avec ces modèles : l'absence d'un de ces photorécepteurs n'empêche pas la transmission de l'information lumineuse, même si une altération de la sensibilité des réponses visuelles (ERG,...) et non visuelles à la lumière (constriction pupillaire, entraînement, décalage de phase) est observée (Barnard et al. 2006 ; Dkhissi-Benyahya et al. 2007 ; Dollet et al. 2010 ; Hattar et al. 2003 ; Lucas et al. 2003 ; Panda et al. 2002).

Nous avons d'autre part quantifié les gènes de l'horloge *Per1* et *Per2*, impliqués dans les mécanismes du fonctionnement endogène de l'horloge et connus pour être induits par la lumière. Chez les souris WT, l'induction de *Per1* et de *Per2* n'est pas localisée au sein des mêmes couches rétinienne. En effet, une stimulation lumineuse à 480 nm induit *Per2* dans l'INL et dans l'ONL mais induit *Per1* uniquement dans l'ONL. Une stimulation lumineuse à 530 nm induit uniquement *Per1* et seulement dans l'ONL. Enfin, une stimulation par de la lumière UV induit *Per1* dans l'INL et *Per2* dans l'ONL. Chez les deux modèles KO (*TRβ^{-/-}* et *Opn4^{-/-}*) et quelle que soit la longueur d'onde utilisée, l'induction de *Per1* et de *Per2* est abolie par comparaison aux souris WT. Les souris *TRβ^{-/-}* ne présentent plus d'induction de *Per1* dans l'ONL suggérant un rôle des cônes MW dans la réponse à la lumière de l'horloge localisée dans la couche des photorécepteurs. Chez les souris *Opn4^{-/-}*, nous avons observé une perte de l'induction de *Per2* dans l'INL et la GCL. Ces résultats ne sont que partiellement en accord avec ceux obtenus précédemment (Dkhissi-Benyahya et al. 2013). Chez les souris WT, l'induction de *Per1* et *Per2* a été observée dans la rétine externe (ONL) et interne (INL+GCL) (OB2013). Chez les souris *Opn4^{-/-}*, Dkhissi-Benyahya et al. (2013) décrit une perte d'induction de *Per1-Per2* dans la rétine externe mais pas interne. Il est nécessaire de confirmer ce résultat. Bien que l'absence d'induction de *Per1* et *Per2* dans la GCL suggère une absence de rôle direct des ipRGCs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne, la perte d'induction de *Per2* chez les *Opn4^{-/-}* dans l'INL et l'ONL suggère que la mélanopsine est impliquée dans la régulation de l'horloge rétinienne. Les ipRGCs pourraient réguler, via la voie rétrograde (**Voir section 2.3.3**) l'induction par la lumière de l'expression des gènes de l'horloge dans l'INL grâce aux contacts de leurs collatérales avec les cellules amacrines (Joo et al. 2013 ; Prigge et al. 2016). Au niveau de l'ONL, on peut envisager soit une régulation directe grâce aux ipRGCs de type M1 interplexiformes qui possèdent des prolongements dendritiques jusqu'aux photorécepteurs (Sondereker et al. 2017). Soit une régulation indirecte par l'intermédiaire de la DA libérée par les cellules amacrines dopaminergiques sous contrôle des ipRGCs (D.-Q. Zhang et al. 2012, 2008). En effet, la DA peut agir de façon paracrine sur les photorécepteurs et a déjà été



	WT	<i>Opn4</i> ^{-/-}	<i>TRβ</i> ^{-/-}
ONL	<i>Per2</i> <i>Per1 Per2</i> <i>Per1</i>	<i>Per1 Per2</i>	<i>Per1</i>
INL	<i>C-Fos Per1</i> <i>C-Fos Per2</i> <i>C-Fos</i>	<i>C-Fos</i> <i>Per2</i>	<i>C-Fos</i>
GCL	<i>C-Fos</i> <i>C-Fos</i> <i>C-Fos</i>	<i>C-Fos</i>	<i>C-Fos</i>

FIGURE 6.4 – Récapitulatif de l'induction de gènes dans les différentes couches de la rétine après une stimulation lumineuse. Les gènes indiqués sont induit par la lumière. La couleur de chaque gène correspond à la longueur d'onde de la stimulation : violet = 370 nm ; bleu = 480 nm ; vert = 530 nm. Les croix rouges représentent la perte de l'induction d'un gène par rapport au WT.

identifiée comme un facteur régulant la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne (Ruan et al. 2008 ; Yujnovsky et al. 2006).

L'induction par la lumière UV de *Per1* et *Per2* suggère un rôle des opsines sensibles aux UV (opsine SW et/ou neuropsine). Cela devra être confirmé en utilisant un modèle adéquat déficient en opsine SW (*Opn1sw*^{-/-}) ou en neuropsine (*Opn5*^{-/-}).

Conclusions et perspectives

Dans un contexte très controversé, mon projet de thèse a permis d'établir la réponse à la lumière de 1) l'horloge rétinienne de souris et d'identifier les photorécepteurs impliqués, et 2) chaque horloge présente dans les trois couches de la rétine.

Nous avons tout d'abord mis au point un protocole standardisé de mise en culture des explants rétiniens afin de calculer la phase de l'horloge et les temps circadiens des oscillations de PER2::Luc. Nous avons ensuite développé un dispositif de stimulation intégré dans le Lumicycle nous permettant d'éviter les effets du mouvement sur la phase des oscillations de PER2::Luc. Ces développements ont représenté une étape cruciale pour l'étude *in vitro* de la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne.

L'approche globale *in vitro* a permis de mettre en évidence le rôle majeur et inattendu des bâtonnets dans la réponse de l'horloge rétinienne à la lumière visible. Il reste à caractériser les voies de signalisation de la transmission de la lumière à partir des bâtonnets et conduisant au décalage de phase de PER2::Luc. Altimus et al. (2010) ont identifié trois voies possibles, responsables de l'entraînement photique du SCN, selon l'irradiance. Dans notre étude, l'horloge rétinienne ne répond qu'à de forte irradiance (photopique) : il est donc possible que l'information lumineuse utilise la même voie que celle décrite par Altimus et al. (2010) à forte irradiances, et mettant en jeu la voie des cônes via les jonctions communicantes entre les bâtonnets et les cônes. Or, Ruan et al. (2008) a observé que l'amplitude des décalages de phase de PER2::Luc est diminuée par l'ajout d'agonistes des récepteurs D1 de la DA dans le milieu de culture. Cet effet pourrait être dû à un découplage des jonctions communicantes entre bâtonnets et cônes par la DA (Ribelayga2012), diminuant ainsi la transmission de l'information lumineuse captée par les bâtonnets et transitant par la voie des cônes.

Plusieurs approches sont envisageables pour évaluer les cellules potentiellement impliquées, en aval des bâtonnets :

- Bloquer les jonctions communicantes entre les cônes et les bâtonnets pharmacologiquement (carbenoxolone) avant la stimulation lumineuse.
- Appliquer des bloqueurs spécifiques des récepteurs glutamatergiques des cellules bipolaires de type ON et OFF.
- Utiliser des modèles génétiques dont certaines voies de signalisation au niveau des photorécepteurs sont invalidées (Altimus et al. 2010).

L'approche *in vivo* a permis de disséquer plus précisément le rôle des photorécepteurs au niveau des différentes horloges rétiniennes. Les résultats obtenus sont encore préliminaires car de nombreuses difficultés techniques ont considérablement ralenti le déroulement de cette expérience et conduit à un échantillonnage faible pour certaines conditions. Il conviendra donc, dans un premier temps, de compléter ces données en augmentant le nombre d'échantillons. De plus, nous avons mis en évidence le rôle majeur des bâtonnets que nous n'avions pas envisagé en début d'expérimentation. Pour disséquer avec plus de précisions leur implication dans la réponse à la lumière des différentes horloges rétiniennes, des souris *Nrl^{-/-}* ont été exposés à des stimulations lumineuses à 530 nm et les échantillons sont en cours de traitement. Cependant, nous avons pu observer, contrairement à l'approche *in vitro*, que l'absence de la mélanopsine ou des cônes MW, abolit toute induction des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2* dans l'ONL et dans l'INL. Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser une approche permettant de distinguer la réponse issue de chaque horloge. Bien que ces résultats soient préliminaires, ils sont en accord avec ceux décrits auparavant par Dkhissi-Benyahya et al. (2013) et valident l'approche employée.

Les résultats obtenus par les deux approches semblent contradictoires concernant notamment le rôle des cônes MW et de la mélanopsine. Il est cependant important de souligner que ces deux techniques ne mesurent pas la même réponse (décalage de phase de PER2::Luc versus induction de *Per1* et *Per2*). Bien qu'il soit classiquement admis que l'induction par la lumière des gènes de l'horloge *Per1-Per2* conduit *in fine* au décalage de phase comportemental (Dunlap 1999). Hannibal et al. (2001) ont observé que ces 2 réponses, ne sont pas corrélées chez des souris KO pour le récepteur du PACAP de type 1. De plus, nous mesurons la réponse à la lumière de chaque couche isolée par l'approche *in vivo*, tandis que *in vitro*, la réponse globale de la rétine est enregistrée. Ceci pouvant conduire au masquage partiel ou total de la réponse d'une ou plusieurs couches, notamment si elles ne sont pas en phase (Dkhissi-Benyahya et al. 2013) ou si une couche a un signal prédominant sur les autres (Ruan et al. 2008).

En conclusion, nous avons montré que l'horloge rétinienne de souris est sensible à des lumières dans le spectre visible et dans l'UV. De plus, nos résultats suggèrent un rôle différentiel des photorécepteurs en fonction de la réponse mesurée (décalage de phase de PER2::Luc et induction des gènes de l'horloge par la lumière). Plusieurs questions restent à résoudre. Quelles sont les voies de signalisation mises en jeu, de la réception de l'information lumineuse jusqu'à l'entraînement photique des horloges ? Quels sont les acteurs et les mécanismes permettant le couplage entre les horloges rétiniennes en réponse à la lumière ? Une meilleure connaissance du fonctionnement des horloges rétiniennes et de leurs réponses à la lumière est fondamentale car de nombreuses pathologies oculaires sont associées à leur dysfonctionnement (pour revue, voir Felder-Schmittbuhl et al. 2017 ; Annexe1).

Bibliographie

- Abe, Michikazu, Erik D. Herzog, Shin Yamazaki, M Straume, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki, Michael Menaker et Gene D. Block. 2002. « Circadian rhythms in isolated brain regions. » *The Journal of Neuroscience* 22 (1) : 350–6.
- Abrahamson, Eric E, et Robert Y Moore. 2001. « Suprachiasmatic nucleus in the mouse : retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections ». *Brain Research* 916 : 172–191.
- Ait-Hmyed Hakkari, Ouafa, Niyazi Acar, Elise Savier, Perrine Spinnhirny, Mohammed Bennis, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl, Jorge Mendoza et David Hicks. 2016. « Rev-Erb α modulates retinal visual processing and behavioral responses to light. » *FASEB journal* 30 (11) : 3690–3701.
- Ait-Hmyed, Ouafa, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl, Marina Garcia-Garrido, Susanne Beck, Christina Seide, Vithiyanjali Sothilingam, Naoyuki Tanimoto, Mathias Seeliger, Mohammed Bennis et David Hicks. 2013. « Mice lacking Period 1 and Period 2 circadian clock genes exhibit blue cone photoreceptor defects ». *European Journal of Neuroscience* 37 (7) : 1048–1060.
- Akiyama, Masashi, Yasuko Kouzu, Satomi Takahashi, Hisanori Wakamatsu, Takahiro Moriya, Miyuki Maetani, Shigenori Watanabe, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki et Shigenobu Shibata. 1999. « Inhibition of Light-or Glutamate-Induced mPer1 Expression Represses the Phase Shifts into the Mouse Circadian Locomotor and Suprachiasmatic Firing Rhythms ». *The Journal of Neuroscience* 19 (3) : 1115–1121.
- Albrecht, U, Z S Sun, G Eichele et C C Lee. 1997. « A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. » *Cell* 91 (7) : 1055–64.
- Altimus, Cara M., Ali D. Güler, Nazia M. Alam, A Cyrus Arman, Glen T. Prusky, Alapakkam P. Sampath et Samer Hattar. 2010. « Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. » *Nature neuroscience* 13 (9) : 1107–12.
- Altimus, Cara M., Ali D. Güler, K L Villa, David S. McNeill, Tara Legates et Samer Hattar. 2008. « Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 105 (50) : 19998–20003.

- Arshavsky, Vadim Y. 2002. « Like Night and Day : Rods and Cones Have Different Pigment Regeneration Pathways Sustained ». *Neuron* 36 : 1–4.
- Asher, Gad, Hans Reinke, Matthias Altmeyer, Maria Gutierrez-Arcelus, Michael O. Hottiger et Ueli Schibler. 2010. « Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding ». *Cell* 142 (6) : 943–953.
- Aton, Sara J., et Erik D. Herzog. 2005. « Minireview Come Together, Right.Now : Synchronization of Rhythms in a Mammalian Circadian Clock ». *Neuron* 48 : 531–534.
- Aton, Sara J, James E Huettner, Martin Straume et Erik D. Herzog. 2006. « GABA and Gi/o differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 103 (50) : 19188–93.
- Baba, Kenkichi, Nikita Pozdeyev, Francesca Mazzoni, Susana Contreras-Alcantara, Cui-meï Liu, Manami Kasamatsu, Theresa Martinez-Merlos, Enrica Strettoi, P. Michael Iuvone et Gianluca Tosini. 2009. « Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 106 (35) : 15043–8.
- Baba, Kenkichi, Anamika Sengupta, Manfredi Tosini, Susana Contreras-alcantara et Gianluca Tosini. 2010. « Circadian regulation of the PERIOD2 : :LUCIFERASE bioluminescence rhythm in the mouse retinal pigment epithelium- choroid ». *Molecular Vision* 16 : 2605–2611.
- Balsalobre, Aurélio, Steven A. Brown, Lysiane Marcacci, François Tronche, Christoph Kellendonk, Holger M. Reichardt, Günther Schütz et Ueli Schibler. 2000. « Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling ». *Science* 289 (5488) : 2344–2347.
- Balsalobre, Aurélio, Francesca Damiola et Ueli Schibler. 1998. « A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells ». *Cell* 93 (6) : 929–937.
- Bando, Hideki, Takeshi Nishio, Gijsbertus T J Van Der Horst, Satoru Masubuchi, Yasuo Hisa et Hitoshi Okamura. 2007. « Vagal Regulation of Respiratory Clocks in Mice ». *The Journal of Neuroscience* 27 (16) : 4359–4365.
- Bargiello, T A, F R Jackson et Michael W Young. 1984. « Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. » *Nature* 312 (5996) : 752–4.
- Barnard, Alun R., Samer Hattar, Mark W. Hankins et Robert J. Lucas. 2006. « Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. » *Current biology* 16 (4) : 389–95.
- Baver, Scott B, Galen E Pickard, Patricia J Sollars et Gary E Pickard. 2008. « Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. » *The European journal of neuroscience* 27 (7) : 1763–70.

- Berson, David M., Ana Maria Castrucci et Ignacio Provencio. 2010. « Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. » *The Journal of comparative neurology* 518 (13) : 2405–22.
- Berson, David M., Felice A. Dunn et Motoharu Takao. 2002. « Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock ». *Science* 295 (5557) : 1070–1073.
- Bhatwadekar, Ashay D., Josephine V. Glenn, Tim M. Curtis, Maria B. Grant, Alan W. Stitt et Tom A. Gardiner. 2009. « Retinal endothelial cell apoptosis stimulates recruitment of endothelial progenitor cells. » *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (10) : 4967–73.
- Bhatwadekar, Ashay D., Yuanqing Yan, Xiaoping Qi, Jeffrey S. Thinschmidt, Matthew B. Neu, Sergio Li Calzi, Lynn C. Shaw et al. 2013. « Per2 Mutation Recapitulates the Vascular Phenotype of Diabetes in the Retina and Bone Marrow ». *Diabetes* 62 (1) : 273–282.
- Bobu, Corina, et David Hicks. 2009. « Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. » *Investigative ophthalmology & visual science* 50 (7) : 3495–502.
- Boettner, Edward A., et J. Reimer Wolter. 1962. « Transmission of the Ocular Media ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 1 (6) : 776–783.
- Brancaccio, Marco, Elizabeth S Maywood, Johanna E Chesham, Andrew S.I. Loudon et Michael H Hastings. 2013. « A Gq-Ca²⁺ axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. » *Neuron* 78 (4) : 714–28.
- Brancaccio, Marco, Andrew P. Patton, Johanna E. Chesham, Elizabeth S. Maywood et Michael H. Hastings. 2017. « Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling ». *Neuron* 93 : 1420–1435.
- Breuninger, Tobias, Christian Puller, Silke Haverkamp et Thomas Euler. 2011. « Behavioral/Systems/Cognitive Chromatic Bipolar Cell Pathways in the Mouse Retina ». *The Journal of Neuroscience* 31 (17) : 6504–6517.
- Bridges, RG. 1959. « Visual pigments of some common laboratory mammals. » *Nature* 184 (17) : 1337–8.
- Buhr, Ethan D., et Russell N. Van Gelder. 2014. « Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 111 (23) : 8625–30.
- Buhr, Ethan D., Seung-Hee Yoo et Joseph S. Takahashi. 2010. « Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. » *Science* 330 (6002) : 379–385.

- Buhr, Ethan D., Wendy W. S. Yue, Xiaozhi Ren, Zheng Jiang, Hsi-wen Rock Liao, Xue Mei, Shruti Vemaraju et al. 2015. « Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local Circadian Oscillators in Mammalian Retina and Cornea ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 2–7.
- Bunger, MK, LD Wilsbacher, SM Moran, C Clendenin, LA Radcliffe, JB Hogenesch, Simon MC, Takahashi Joseph S et Bradfield CA. 2000. « Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. » *Cell* 103 (7) : 1009–17.
- Bünning, E. 1932. « Über die Erbllichkeit der Tagesperiodizität bei den Phaseolus Blättern. » *Jahrb. Für Wiss. Bot.* 77 : 283–320.
- . 1935. « Zur kenntis der erblichen Tagesperiodizität bei den primarblättern von Phaseolus multiflorus. » *Jahrb. Für Wiss. Bot.* 81 : 411–418.
- Buonfiglio, Daniella C., André Malan, Cristina Sandu, Catherine Jaeger, José Cipolla-Neto, David Hicks et Marie-Paule Felder-Schmittbuhl. 2014. « Rat retina shows robust circadian expression of clock and clock output genes in explant culture. » *Molecular vision* 20 : 742–52.
- Busik, Julia V., Maria Tikhonenko, Ashay Bhatwadekar, Madalina Opreanu, Nafissa Yakubova, Sergio Caballero, Danny Player et al. 2009. « Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (13) : 2897–2906.
- Butler, Matthew P., et Rae Silver. 2011. « Divergent photic thresholds in the non-image-forming visual system : entrainment, masking and pupillary light reflex ». *Proceedings of the Royal Society : Biological Sciences* 278 (1706) : 745–750.
- Cameron, Morven A., Alun R. Barnard, Roelof A. Hut, Xavier Bonnefont, Gijsbertus T J van der Horst, Mark W. Hankins et Robert J. Lucas. 2008. « Electroretinography of wild-type and Cry mutant mice reveals circadian tuning of photopic and mesopic retinal responses. » *Journal of Biological Rhythms* 23 (6) : 489–501.
- Colwell, Christopher S, et Michael Menaker. 1992. « NMDA as Well as Non-NMDA Receptor Antagonists Can Prevent the Phase-Shifting Effects of Light on the Circadian System of the Golden Hamster ». *Journal of Biological Rhythms* 7 (2) : 125–136.
- Dacey, Dennis M., H W Liao, B B Peterson, F R Robinson, V C Smith, J Pokorny, K W Yau et P D Gamlin. 2005. « Melanopsin-expressing ganglion cells in primate retina signal colour and irradiance and project to the LGN ». *Nature* 433 (7027) : 749–754.
- Damiola, Francesca, N. Le Minh, N. Preitner, Benoît Kornmann, F. Fleury-Olela et Ueli Schibler. 2000. « Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus ». *Genes and Development* 14 (23) : 2950–2961.

- Daniele, Lauren L., Concepcion Lillo, Arkady L. Lyubarsky, Sergei S. Nikonov, Nancy Philp, Alan J. Mears, Anand Swaroop, David S. Williams et Edward N. Pugh. 2005. « Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse. » *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (6) : 2156–67.
- Dardente, Hugues, et Nicolas Cermakian. 2005. « Les noyaux suprachiasmatiques : une horloge circadienne composée ». *MEDECINE/SCIENCES* 1 (21) : 66–72.
- Darwin, Charles, et Francis Darwin. 1880. *The Power of Movement in Plants*. Murray, London : John.
- DeBruyne, Jason P., Elizabeth Noton, Christopher M. Lambert, Elizabeth S. Maywood, David R. Weaver et Steven M. Reppert. 2006. « A Clock Shock : Mouse CLOCK Is Not Required for Circadian Oscillator Function ». *Neuron* 50 (3) : 465–477.
- DeBruyne, Jason P., David R. Weaver et Steven M. Reppert. 2007. « Peripheral circadian oscillators require CLOCK ». *Current Biology* 17 (14) : R538–R539.
- Dey, J, A.-J F Carr, F R A Cagampang, A S Semikhodskii, Andrew S.I. Loudon, M H Hastings et E S Maywood. 2005. « The tau Mutation in the Syrian Hamster Differentially Reprograms the Circadian Clock in the SCN and Peripheral Tissues ». *Journal of Biological Rhythms* 20 (2) : 99–110.
- Dinet, Virginie, Nariman Ansari, Claudia Torres-Farfan et Horst-Werner Korf. 2007. « Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice ». *Journal of Pineal Research* 42 (1) : 83–91.
- Dkhissi-Benyahya, Ouria, Christine Coutanson, Kenneth Knoblauch, Hasna Lahouaoui, Vincent Leviel, Catherine Rey, Mohamed Bennis et Howard M. Cooper. 2013. « The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. » *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (18) : 3435–47.
- Dkhissi-Benyahya, Ouria, Claude Gronfier, Wena De Vanssay, Frederic Flamant et Howard M. Cooper. 2007. « Modeling the Role of Mid-Wavelength Cones in Circadian Responses to Light ». *Neuron* 53 (5) : 677–687.
- Dkhissi-Benyahya, Ouria, B Sicard et Howard M. Cooper. 2000. « Effects of irradiance and stimulus duration on early gene expression (Fos) in the suprachiasmatic nucleus : temporal summation and reciprocity ». *J Neurosci* 20 (20) : 7790–7797.
- Dollet, Anna, Urs Albrecht, Howard M. Cooper et Ouria Dkhissi-Benyahya. 2010. « Cones are required for normal temporal responses ». *Chronobiology international* 27 (4) : 768–781.
- Dorenbos, Ronald, Massimo Contini, Hajime Hirasawa, Stefano Gustincich et Elio Raviola. 2007. « Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells ». *Visual Neuroscience* 24 (04) : 573–580.

- D'Ortous de Mairan, Jean-Jacques. 1729. « Observation botanique ». In *Histoire de l'Académie Royale*, 35–36.
- Doyle, Susan E., Michael S Grace, Wilson Mcivov et Michael Menaker. 2002. « Circadian rhythms of dopamine in mouse retina : The role of melatonin ». *Visual Neuroscience* 19 : 593–601.
- Drouyer, Elise, Ouria Dkhissi-Benyahya, Christophe Chiquet, Elizabeth WoldeMussie, Guadalupe Ruiz, Larry A. Wheeler, Philippe Denis et Howard M. Cooper. 2008. « Glaucoma alters the circadian timing system. » *PLoS One* 3 (12) : e3931.
- Dubocovich, M L. 1983. « Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. » *Nature* 306 (5945) : 782–4.
- Dunlap, Jay C. 1999. « Molecular Bases for Circadian Clocks Review ». *Cell* 96 : 271–290.
- Ebihara, Shizufumi, Theodore Marks, David J. Hudson et Michael Menaker. 1986. « Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse ». *Science* 231 (4737) : 491–493.
- Ecker, Jennifer L, Olivia N Dumitrescu, Kwoon Y Wong, Nazia M Alam, Shih-Kuo Chen, Tara Legates, Jordan M Renna, Glen T Prusky, David M. Berson et Samer Hattar. 2010. « Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors : cellular diversity and role in pattern vision ». *Neuron* 67 (1) : 49–60.
- Euler, Thomas, Horst Schneider et Heinz Wgssle. 1996. « Glutamate Responses of Bipolar Cells in a Slice Preparation of the Rat Retina ». *The Journal of Neuroscience* 16 (9) : 2934–2944.
- Felder-Schmittbuhl, Marie-Paule, Hugo Calligaro et Ouria Dkhissi-Benyahya. 2017. « The retinal clock in mammals : role in health and disease ». *ChronoPhysiology and Therapy* Volume 7 : 33–45.
- Freedman, Melanie S., Robert J. Lucas, Bobby Soni, Malcolm von Schantz, Marta Muñoz, Zoë David-Gray, Russell G. Foster et al. 1999. « Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors ». *Science* 284 (5413) : 502–504.
- Fu, Yingbin, et K.-W Yau. 2007. « Phototransduction in mouse rods and cones ». *Eur J Neurosci* 19 : 805–819.
- Gallego, Monica, Erik J Eide, Margaret F Woolf, David M Virshup et Daniel B Forger. 2006. « An opposite role for tau in circadian rhythms revealed by mathematical modeling ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 103 (28) : 10618–10623.
- Gallego, Monica, Heeseog Kang et David M Virshup. 2006. « Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2 ». *Biochem. J* 399 : 169–175.

- Gallego, Monica, et David M. Virshup. 2007. « Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (2) : 139–148.
- García-Fernández, José M, Carme Alvarez-López et Rafael Cernuda-Cernuda. 2007. « Cytoplasmic localization of mPER1 clock protein isoforms in the mouse retina ». *Neuroscience Letters* 419 : 55–58.
- Gauthier, K., O. Chassande, M. Plateroti, J. P. Roux, C. Legrand, B. Rousset, R. Weiss, J. Trouillas et J. Samarut. 1999. « Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development ». *Embo J* 18 (3) : 623–631.
- Gekakis, N. 1998. « Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism ». *Science* 280 (5369) : 1564–1569.
- Goldman, Arnold I, Paul S Teirstein et Paul O Brien. 1980. « Investigative Ophthalmology & Visual Science disc shedding in the rod outer segment of the rat retina ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 19 : 1257–1267.
- Govardovskii, V I, N Fyhrquist, T Reuter, D G Kuzmin et K Donner. 2000. « In search of the visual pigment template ». *Visual Neuroscience* 17 (4) : 509–528.
- Goz, Didem, Keith Studholme, Douglas A Lappi, Mark D Rollag, Ignacio Provencio et Lawrence P Morin. 2008. « Targeted Destruction of Photosensitive Retinal Ganglion Cells with a Saporin Conjugate Alters the Effects of Light on Mouse Circadian Rhythms ». *PLoS ONE* 3 (9).
- Green, Carla B. 2003. « Molecular Control of Xenopus Retinal Circadian Rhythms ». *Journal of Neuroendocrinology* 15 : 350–354.
- Griffin, E. A.Jr., David Staknis et Charles J. Weitz. 1999. « Light-Independent Role of CRY1 and CRY2 in the Mammalian Circadian Clock ». *Science* 286 (5440) : 768–771.
- Güler, Ali D., CM Altimus, JL Ecker et S Hattar. 2007. « Multiple Photoreceptors Contribute to Nonimage-forming Visual Functions Predominantly through Melanopsin-containing ... Multiple Photoreceptors Contribute to Nonimage-forming Visual Functions Predominantly through Melanopsin-containing Retinal Ganglion ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 122 : 509–15.
- Güler, Ali D., Jennifer L. Ecker, Gurprit S. Lall, Shafiqul Haq, Cara M. Altimus, Hsi-Wen Liao, Alun R. Barnard et al. 2008. « Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. » *Nature* 453 (7191) : 102–105.
- Gustincich, Stefano, Andreas Feigenspan, Werner Sieghart et Elio Raviola. 1999. « Composition of the GABA A Receptors of Retinal Dopaminergic Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 19 (18) : 7812–7822.

- Hack, Iris, Leo Peichl, Johann Helmut et Brandstätter. 1999. « An alternative pathway for rod signals in the rodent retina : Rod photoreceptors, cone bipolar cells, and the localization of glutamate receptors ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 96 (24) : 14130–35.
- Hampson, Edith C G M, David I Vaney et Reto Weilep. 1992. « Dopaminergic Modulation of Gap Junction Permeability between Amacrine Cells in Mammalian Retina ». *The Journal of Neuroscience* 12 (12).
- Hannibal, Jens, Birgitte Georg et Jan Fahrenkrug. 2013. « Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats ». *Experimental Eye Research* 106 : 55–63.
- Hannibal, Jens, Birgitte Georg, Peter Hindersson et Jan Fahrenkrug. 2005. « Light and Darkness Regulate Melanopsin in the Retinal Ganglion Cells of the Albino Wistar Rat ». *Journal of Molecular Neuroscience* 27 : 147–155.
- Hannibal, Jens, Françoise Jamen, Harriette S Nielsen, Laurant Journot, Philippe Brabet et Jan Fahrenkrug. 2001. « Dissociation between Light-Induced Phase Shift of the Circadian Rhythm and Clock Gene Expression in Mice Lacking the Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Type 1 Receptor ». *The Journal of Neuroscience* 21 (13) : 4883–4890.
- Hardin, Paul E., Jeffrey C. Hall et Michael Rosbash. 1990. « Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels ». *Nature* 343 : 536–540.
- Hatori, Megumi, Hiep Le, Christopher Vollmers, Sheena Racheal Keding, Nobushige Tanaka, Christian Schmedt, Timothy Jegla et Satchidananda Panda. 2008. « Inducible ablation of melanopsin-expressing retinal ganglion cells reveals their central role in non-image forming visual responses ». *PLoS ONE* 3 (6) : e2451.
- Hattar, Samer, Monica Kumar, Alexander Park, Patrick Tong, Jonathan Tung, King-Wai W Yau et David M. Berson. 2006. « Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse ». *J Comp Neurol* 497 (3) : 326–349.
- Hattar, Samer, Hsi-Wen Liao, Motoharu Takao, David M. Berson et K.-W Yau. 2002. « Melanopsin-containing retinal ganglion cells : architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. » *Science* 295 (5557) : 1065–70.
- Hattar, Samer, Robert J. Lucas, N. Mrosovsky, S. Thompson, Ronald H. Douglas, Mark W. Hankins, J Lem et al. 2003. « Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. » *Nature* 424 (6944) : 76–81.
- Herzog, Erik D., Michael E Geusz, Sat Bir, S Khalsa, Martin Straume et Gene D Block. 1997. « Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multimicroelectrode plates ». *Brain Research* 757 : 285–290.

- Herzog, Erik D., Tracey Hermanstynne, Nicola J. Smyllie et Michael H. Hastings. 2017. « Regulating the suprachiasmatic nucleus (SCN) circadian clockwork : Interplay between cell- autonomous and circuit-level mechanisms ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (1).
- Hirano, Arisa, Ying-Hui Fu et Louis J Ptáček. 2016. « The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life ». *Nature Publishing Group* 23 : 1053–60.
- Hirasawa, Hajime, Michelino Puopolo et Elio Raviola. 2009. « Extrasynaptic Release of GABA by Retinal Dopaminergic Neurons ». *J Neurophysiol* 102 : 146–158.
- Hirota, Tsuyoshi, Toshiyuki Okano, Koichi Kokame, Hiroko Shirotani-Ikejima, Toshiyuki Miyata et Yoshitaka Fukada. 2002. « Glucose Down-regulates Per1 and Per2 mRNA Levels and Induces Circadian Gene Expression in Cultured Rat-1 Fibroblasts ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (46) : 44244–44251.
- Honma, Sato, Wataru Nakamura, Tetsuo Shirakawa et Ken-Ichi Honma. 2004. « Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period ». *Neuroscience Letters* 358 : 173–176.
- Honma, Sato, Tetsuo Shirakawa, Yumiko Katsuno, Masakazu Namihira et Ken-Ichi Honma. 1998. « Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats ». *Neuroscience letters* 250 : 157–160.
- Hughes, Steven, Mark W. Hankins, Russell G. Foster et Stuart N. Peirson. 2012. *Melanopsin phototransduction : Slowly emerging from the dark*. 1^{re} éd., 199 : 1–19. Elsevier B.V.
- Hughes, Steven, Jessica Rodgers, Doron Hickey, Russell G. Foster, Stuart N. Peirson et Mark W. Hankins. 2016. « Characterisation of light responses in the retina of mice lacking principle components of rod, cone and melanopsin phototransduction signalling pathways ». *Scientific Reports* 6 : 280–86.
- Hughes, Steven, Thomas S Watson, Russell G. Foster, Stuart N. Peirson et Mark W. Hankins. 2013. « Report Nonuniform Distribution and Spectral Tuning of Photosensitive Retinal Ganglion Cells of the Mouse Retina ». *Current Biology* 23 : 1696–1701.
- Hughes, T E. 1997. « Are there ionotropic glutamate receptors on the rod bipolar cell of the mouse retina ? » *Visual neuroscience* 14 (1) : 103–9.
- Hunter, Jennifer J., Jessica I.W Morgan, William H. Merigan, David H. Sliney, Janet R. Sparrow et David R. Williams. 2012. « The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. » *Progress in retinal and eye research* 31 (1) : 28–42.

- Hut, Roelof A., Malgorzata Oklejewicz, Camille Rieux et Howard M Cooper. 2008. « Photic sensitivity ranges of hamster pupillary and circadian phase responses do not overlap. » *Journal of Biological Rhythms* 23 (1) : 37–48.
- Hwang, Christopher K, Shyam S Chaurasia, Chad R Jackson, Guy C.-K Chan, Daniel R Storm et P Michael Iuvone. 2013. « Circadian Rhythm of Contrast Sensitivity Is Regulated by a Dopamine–Neuronal PAS-Domain Protein 2–Adenylyl Cyclase 1 Signaling Pathway in Retinal Ganglion Cells ». *The Journal of Neuroscience* 33 (38) : 14989–14997.
- Ishida, Atsushi, Tatsushi Mutoh, Tomoko Ueyama, Hideki Bando, Satoru Masubuchi, Daiichiro Nakahara, Gozoh Tsujimoto et Hitoshi Okamura. 2005. « Light activates the adrenal gland : Timing of gene expression and glucocorticoid release ». *Cell Metabolism* 2 (5) : 297–307.
- Iuvone, P. Michael, Gianluca Tosini, Nikita Pozdeyev, Rashidul Haque, David C Klein et Shyam S Chaurasia. 2005. « Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. » *Progress in retinal and eye research* 24 (4) : 433–56.
- Izumo, Mariko, Carl Hirschie Johnson et Shin Yamazaki. 2003. « Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting : Temperature compensation and damping ». 100 (26) : 16089–16094.
- Jackson, Chad R., Guo-Xiang Ruan, Fazila Aseem, Jane Abey, Karen L. Gamble, Greg Stanwood, Richard D. Palmiter, P. Michael Iuvone et Douglas G. McMahon. 2012. « Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision. » *The Journal of neuroscience* 32 (27) : 9359–68.
- Jacobs, Gerald H., Jay Neitz et J F Deegan. 1991. « Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. » *Nature* 353 (6345) : 655–656.
- Jadhav, Vaishnavi, Qianyi Luo, James M. Dominiguez, Jude Al-Sabah, Brahim Chacour, Maria B Grant, Ashay D. Bhatwadekar et James M Dominguez. 2016. « Per2-Mediated Vascular Dysfunction Is Caused by the Upregulation of the Connective Tissue Growth Factor (CTGF). » *PloS one* 11 (9) : e0163367.
- Jaeger, Catherine, Cristina Sandu, André Malan, Katell Mellac, David Hicks et Marie-Paule Felder-Schmittbuhl. 2015. « Circadian organization of the rodent retina involves strongly coupled, layer-specific oscillators ». *The FASEB Journal* 29 (4) : 1493–1504.
- Jagota, Anita, Horacio O. De La Iglesia et William J. Schwartz. 2000. « Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro ». *Nature Neuroscience* 3 (4) : 372–376.
- Jeon, C. J., Enrica Strettoi et Richard H. Masland. 1998. « The major cell populations of the mouse retina. » *The Journal of Neuroscience* 18 (21) : 8936–46.

- Jin, Nan Ge, Alice Z Chuang, Philippe J Masson, Christophe P. Ribelayga et Guadalupe Ruiz. 2015. « Rod electrical coupling is controlled by a circadian clock and dopamine in mouse retina ». *J Physiol* 5937 (5937) : 1597–1631.
- Jin, Xiaowei, Lauren P Shearman, David R Weaver, Mark J Zylka, Geert J De Vries et Steven M. Reppert. 1999. « A Molecular Mechanism Regulating Rhythmic Output from the Suprachiasmatic Circadian Clock ». *Cell* 96 : 57–68.
- Joo, Hannah R, Beth B Peterson, Dennis M. Dacey, Samer Hattar et Shih-Kuo Chen. 2013. « Recurrent axon collaterals of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. » *Visual neuroscience* 30 (4) : 175–82.
- Kaeffer, Bertrand, et Lissia Pardini. 2005. « Clock genes of mammalian cells : implications in tissue culture ». *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Animal* 41 : 311–320.
- Kaylor, Joanna J., Tongzhou Xu, Norianne T. Ingram, Avian Tsan, Hayk Hakobyan, Gordon L. Fain et Gabriel H. Travis. 2017. « Blue light regenerates functional visual pigments in mammals through a retinyl-phospholipid intermediate ». *Nature Communications* 8 (1) : 1–9.
- Kefalov, Vladimir J. 2011. « Rod and Cone Visual Pigments and Phototransduction through Pharmacological, Genetic, and Physiological Approaches ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (3) : 1635–1641.
- Kojima, Daisuke, Suguru Mori, Masaki Torii, Akimori Wada, Rika Morishita et Yoshitaka Fukada. 2011. « UV-Sensitive Photoreceptor Protein OPN5 in Humans and Mice ». Sous la direction de Shin Yamazaki. *PLoS ONE* 6 (10) : e26388.
- Kondratov, Roman V., Anna A. Kondratova, Victoria Y. Gorbacheva, Olena V. Vykhovnets et Marina P. Antoch. 2006. « Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock ». *Genes dev* 20 (14) : 1868–1873.
- Konopka, Ronald J, et Seymour Benzer. 1971. « Clock Mutants of *Drosophila melanogaster* ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 68 (9) : 2112–2116.
- Kornmann, Benoît, Olivier Schaad, Hermann Bujard, Joseph S. Takahashi et Ueli Schibler. 2007. « System-Driven and Oscillator-Dependent Circadian Transcription in Mice with a Conditionally Active Liver Clock ». *PLoS biology* 5 (2) : 179–189.
- Kornmann, Benoît, Olivier Schaad, Hans Reinke, Camille Saini et Ueli Schibler. 2007. « Regulation of Circadian Gene Expression in Liver by Systemic Signals and Hepatocyte Oscillators Regulation of Circadian Gene Expression in Liver by Systemic Signals and Hepatocyte Oscillators ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LXXII : 319–330.
- Krigel, Arthur, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl et David Hicks. 2010. « Circadian-clock driven cone-like photoreceptor phagocytosis in the neural retina leucine zipper gene knockout mouse. » *Molecular vision* 16 : 2873–81.

- Kuhlman, Sandra J, Rae Silver, Joseph Le Sauter, Abel Bult-Ito et Douglas G McMahon. 2003. « Phase Resetting Light Pulses Induce Per1 and Persistent Spike Activity in a Subpopulation of Biological Clock Neurons ». *The Journal of Neuroscience* 23 (41) : 1441–1450.
- Kume, Kazuhiko, Mark J Zylka, Sathyanarayanan Sriram, Lauren P Shearman, David R Weaver, Xiaowei Jin, Elizabeth S Maywood, Michael H Hastings et Steven M. Reppert. 1999. « mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop ». *Cell* 98 : 193–205.
- Kunst, Stefanie, Tanja Wolloscheck, Debra K Kelleher, Uwe Wolfrum, S Anna Sargsyan, P. Michael Iuvone, Kenkichi Baba, Gianluca Tosini et Rainer Spessert. 2015. « Pgc-1a and Nr4a1 Are Target Genes of Circadian Melatonin and Dopamine Release in Murine Retina ». *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 56 : 6084–6094.
- Lahouaoui, Hasna, Christine Coutanson, Howard M. Cooper, Mohamed Bennis et Ouria Dkhissi-Benyahya. 2014. « Clock Genes and Behavioral Responses to Light Are Altered in a Mouse Model of Diabetic Retinopathy ». *PLoS ONE* 9 (7) : e101584.
- . 2016. « Diabetic retinopathy alters light-induced clock gene expression and dopamine levels in the mouse retina ». *Molecular Vision* 22 : 959–969.
- Lall, Gurprit S., Victoria L Revell, Hiroshi Momiji, Jazi Al-Enezi, Cara M. Altimus, Ali D. Güler, Carlos Aguilar et al. 2010. « Distinct Contributions of Rod, Cone, and Melanopsin Photoreceptors to Encoding Irradiance ». *Neuron* 66 (3) : 417–428.
- Lamb, Trevor D., et E.N. Pugh. 2004. « Dark adaptation and the retinoid cycle of vision ». *Progress in Retinal and Eye Research* 23 (3) : 307–380.
- Lavail, Matthew M. 1976. « Rod outer segment disk shedding in rat retina : relationship to cyclic lighting ». *Science* 194 (4269) : 1071–4.
- Le Minh, N., Francesca Damiola, François Tronche, Günther Schütz et Ueli Schibler. 2001. « Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators ». *The EMBO journal* 20 (24) : 7128–7136.
- Liu, Lei-Lei, Nathan J. Spix et Dao-Qi Zhang. 2017. « NMDA Receptors Contribute to Retrograde Synaptic Transmission from Ganglion Cell Photoreceptors to Dopaminergic Amacrine Cells ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 : 1–13.
- Liu, Xiaoqin, Zhijing Zhang et Christophe P. Ribelayga. 2012. « Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. » *PLoS ONE* 7 (11) : e50602.
- Lowrey, Phillip L., Kazuhiro Shimomura, Marina P. Antoch, Shin Yamazaki, Peter D Zemenides, Martin R Ralph, Michael Menaker et Joseph S. Takahashi. 2000. « Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation tau ». *Science* 288 (5465) : 483–491.

- Lucas, Robert J., Ronald H. Douglas et Russell G. Foster. 2001. « Characterization of an ocular photopigment capable of driving pupillary constriction in mice ». *Nat Neurosci* 4 (6) : 621–6.
- Lucas, Robert J., Melanie S. Freedman, Marta Muñoz, José Manuel García-Fernández et Russell G. Foster. 1999. « Regulation of the Mammalian Pineal by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors ». *Science* 284 (5413) : 505–507.
- Lucas, Robert J., Samer Hattar, Motoharu Takao, David M. Berson, Russell G. Foster et K.-W Yau. 2003. « Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice ». *Science* 299 (5604) : 245–247.
- Lucas, Robert J., Gurprit S. Lall, Annette E. Allen et Timothy M. Brown. 2012. *How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock*. 1^{re} éd., chap. 1, 199 : 1–18. Elsevier B.V.
- Lupi, Daniela, Henrik Oster, Stewart Thompson et Russell G. Foster. 2008. « The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. » *Nature neuroscience* 11 (9) : 1068–1073.
- Manglapus, Mary K, P. Michael Iuvone, Herbert Underwood, Mary E Pierce et Robert B Barlow. 1999. « Dopamine Mediates Circadian Rhythms of Rod–Cone Dominance in the Japanese Quail Retina ». *The Journal of Neuroscience* 19 (10) : 4132–4141.
- Marcheva, Biliana, Kathryn Moynihan Ramsey, Ethan D. Buhr, Yumiko Kobayashi, Hong Su, Caroline H. Ko, Ganka Ivanova et al. 2010. « Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes ». *Nature* 466 (7306) : 627–631.
- Maronde, Erik, et Dirk Motzkus. 2003. « Oscillation of human period 1 (hPER1) reporter gene activity in human neuroblastoma cells in vivo. » *Chronobiology international* 20 (4) : 671–81.
- Masland, Richard H. 2001. « The fundamental plan of the retina ». *Nature* 4 (9) : 877–886.
- . 2003. « The retina's fancy tricks ». *Nature Neuroscience* 423 : 387–388.
- . 2012. « The Neuronal Organization of the Retina ». *Neuron* 76 (2) : 266–280.
- Mata, Nathan L, Roxana A Radu, Richard S Clemmons et Gabriel H Travis. 2002. « Isomerization and Oxidation of Vitamin A in Cone-Dominant Retinas : A Novel Pathway for Visual-Pigment Regeneration in Daylight ». *Neuron* 36 (1) : 69–80.
- Mears, Alan J., Mineo Kondo, Prabodha K. Swain, Yuichiro Takada, Ronald A. Bush, Thomas L. Saunders, Paul A. Sieving et Anand Swaroop. 2001. « Nrl is required for rod photoreceptor development. » *Nature genetics* 29 (4) : 447–52.
- Mohawk, Jennifer A., Carla B. Green et Joseph S. Takahashi. 2012. « Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals ». *Annu. Rev. Neurosci* 35 : 445–62.

- Moore, Robert Y., et Victor B. Eichler. 1972. « Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat ». *Brain Research* 42 (1) : 201–206.
- Mrosovsky, N., et Samer Hattar. 2005. « Diurnal mice (*Mus musculus*) and other examples of temporal niche switching ». *J Comp Physiol* 191 : 1011–1024.
- Mullen, RJ, et Matthew M. Lavail. 1976. « Inherited Retinal Dystrophy : Primary Defect in Pigment Epithelium Determined with Experimental Rat Chimeras ». *Science* 192 (4241) : 799–801.
- Mure, Ludovic S., HD. Le, G Benegiamo, MW Chang, L Rios, J Ngalla, N Maini et al. 2018. « Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. » *Science*.
- Mure, Ludovic S., Camille Rieux, Samer Hattar et Howard M. Cooper. 2007. « Melanopsin-dependent nonvisual responses : evidence for photopigment bistability in vivo ». *J Biol Rhythms* 22 (5) : 411–424.
- Nagano, Mamoru, Akihito Adachi, Ken-Ichi Nakahama, Toru Nakamura, Masako Tamada, Elizabeth Meyer-Bernstein, Amita Sehgal et Yasufumi Shigeyoshi. 2003. « An Abrupt Shift in the Day/Night Cycle Causes Desynchrony in the Mammalian Circadian Center ». *The Journal of Neuroscience* 23 (14) : 6141–6151.
- Najjar, Raymond P., Petteri Teikari, Pierre-Loïc Cornut, Kenneth Knoblauch, Howard M. Cooper et Claude Gronfier. 2016. « Heterochromatic Flicker Photometry for Objective Lens Density Quantification. » *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (3) : 1063–71.
- Naka, K I, et W A H Rushton. 1966. « S-potentials from luminosity units in the retina of fish (Cyprinidae). » *The Journal of physiology* 185 (3) : 587–99.
- Namihira, Masakazu, Sato Honma, Hiroshi Abe, S Masubuchi, Masaaki Ikeda et Ken-ichi Honma. 2001. « Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. » *Neuroreport* 12 (3) : 471–5.
- Namihira, Masakazu, Sato Honma, Hiroshi Abe, Yusuke Tanahashi, Masaaki Ikeda et Ken-ichi Honma. 1999. « Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the rat retina ». *Neuroscience Letters* 271 (1) : 1–4.
- Nelson, Ralph. 1977. « Cat Cones Have Rod Input : A Comparison of the Response Properties ». *Journal of Comparative Neurology* 172 : 109–135.
- Nelson, Ralph, et Victoria Connaughton. 2007. *Webvision : Bipolar Cell Pathways in the Vertebrate Retina*.

- Ng, Lily, James B Hurley, Blair Dierks, Maya Srinivas, Carmen Saltó, Björn Vennström, Thomas A Reh et Douglas Forrest. 2001. « A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors ». *Nature Genetics* 27 (1) : 94–98.
- Nguyen-Legros, J, et D Hicks. 2000. « Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. » *International review of cytology* 196 : 245–313.
- Nielsen, Henriette S., Jens Hannibal et Jan Fahrenkrug. 2002. « Vasoactive intestinal polypeptide induces per1 and per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus late at night ». *European Journal of Neuroscience* 15 (3) : 570–574.
- Niki, Tomoko, Toshiyuki Hamada, Michiko Ohtomi, Katsuhiko Sakamoto, Satoru Suzuki, Koichiro Kako, Yasuhiko Hosoya, Kazumasa Horikawa et Norio Ishida. 1998. « The Localization of the Site of Arylalkylamine N-Acetyltransferase Circadian Expression in the Photoreceptor Cells of Mammalian Retina ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 248 : 115–120.
- Nir, Izhak, N Agarwal, G Sagie et DS Papermaster. 1989. « Opsin distribution and synthesis in degenerating photoreceptors of rd mutant mice. » *Exp.Eye Res.* 49 (3) : 403–21.
- Nishide, Shin-Ya, Sato Honma et Ken-ichi Honma. 2008. « The circadian pacemaker in the cultured suprachiasmatic nucleus from pup mice is highly sensitive to external perturbation ». *European Journal of Neuroscience* 27 : 2686–2690.
- Nishide, Shin-Ya, Sato Honma, Yoshihiro Nakajima, Masaaki Ikeda, Kenkichi Baba, Yoshihiro Ohmiya et Ken-Ichi Honma. 2006. « New reporter system for Per1 and Bmal1 expressions revealed self-sustained circadian rhythms in peripheral tissues ». *Genes to Cells* 11 (10) : 1173–1182.
- Ouk, Koliane, Steven Hughes, Carina A. Pothecary, Stuart N. Peirson et Jennifer A. Morton. 2016. « Attenuated pupillary light responses and downregulation of opsin expression parallel decline in circadian disruption in two different mouse models of Huntington’s disease ». *Human Molecular Genetics* 25 (24) : ddw359.
- Pakhotin, Pavel, Anthony J. Harmar, Alexei Verkhatsky et Hugh D. Piggins. 2006. « VIP receptors control excitability of suprachiasmatic nuclei neurones ». *Eur J Physiol* 452 : 7–15.
- Panda, Satchidananda, Ignacio Provencio, Daniel C. Tu, Susana S. Pires, Mark D. Rollag, Ana Maria Castrucci, Mathew T. Pletcher et al. 2003. « Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photic Responses in Blind Mice ». *Science* 301 (5632) : 525–527.

- Panda, Satchidananda, Trey K Sato, Ana Maria Castrucci, Mark D. Rollag, Willem J. DeGrip, John B. Hogenesch, Ignacio Provencio et Steve A. Kay. 2002. « Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. » *Science* 298 (5601) : 2213–2216.
- Peirson, Stuart N., Jason N Butler, Giles E Duffield, Sharanjit Takher, Puneet Sharma et Russell G. Foster. 2006. « Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351 (4) : 800–807.
- Pepe, Isidoro Mario. 2001. « Recent Advances in Our Understanding of Rhodopsin and Phototransduction ». *Progress in retinal and eye research* 20 (6) : 733–759.
- Piccolino, Marco, et Carmela Trimarchi. 1987. « Lateral interactions between vertebrate photoreceptors ». *Photochem Photobiol* 45 (2) : 305–314.
- Piggins, Hugh D, Michael C Antie et Benjamin Rusakiz2. 1995. « Neuropeptides Phase Shift the Mammalian Circadian Pacemaker ». *The Journal of Neuroscience* 15 (8) : 5612–5622.
- Pittendrigh, Colin S. 1960. « Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25 : 159–184.
- Pitts, Donald G. 1993. « Ocular Effects of Radiant Energy ». Chap. 6 in *Environmental Vision*, 151–220. Boston : Elsevier.
- Prigge, Cameron L., Po-Ting Yeh, Nan-Fu Liou, Chi-Chan Lee, Shih-Feng You, Lei-Lei Liu, David S. McNeill et al. 2016. « M1 ipRGCs Influence Visual Function through Retrograde Signaling in the Retina. » *The Journal of Neuroscience* 36 (27) : 7184–97.
- Prolo, Laura M., Joseph S. Takahashi et Erik D. Herzog. 2005. « Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. » *Journal of Neuroscience* 25 (2) : 404–408.
- Provencio, Ignacio, Guisen Jiang, Willem J. De Grip, William Pär Hayes et Mark D. Rollag. 1998. « Melanopsin : An opsin in melanophores, brain, and eye ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 95 (1) : 340–5.
- Provencio, Ignacio, Mark D. Rollag et Ana Maria Castrucci. 2002. « Photoreceptive net in the mammalian retina ». *Nature* 415 : 493.
- Puopolo, M, S E Hochstetler, Stefano Gustincich, R M Wightman et E Raviola. 2001. « Extrasynaptic release of dopamine in a retinal neuron : activity dependence and transmitter modulation. » *Neuron* 30 (1) : 211–25.
- Ralph, M R, et M Menaker. 1988. « A mutation of the circadian system in golden hamsters. » *Science* 241 (4870) : 1225–7.
- Ralph, M., Russell G. Foster, F. Davis et Michael Menaker. 1990. « Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period ». *Science* 247 (4945) : 975–978.

- Reddy, Pranhitha, William A Zehring, David A Wheeler, Vincent Pirrotta, Christopher Hadfield, Jeffrey C. Hall et Michael Rosbash. 1984. « Molecular Analysis of the period Locus in *Drosophila melanogaster* and Identification of a Transcript Involved in Biological Rhythms ». *Cell* 00 (38) : 701–710.
- Reed, Helen E., Alert Meyer-Spasche, David J. Cutler, Clive W. Coen et Hugh D. Piggins. 2001. « Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) phase-shifts the rat suprachiasmatic nucleus clock in vitro ». *European Journal of Neuroscience* 13 (4) : 839–843.
- Reichenbach, Andreas, et Andreas Bringmann. 2013. « New functions of müller cells ». *Glia* 61 (5) : 651–678.
- Reichenbach, Andreas, C Fromter, R Engelmann, H Wolburg, M Kasper et J Schnitzer. 1995. « Muller glial cells of the tree shrew retina. » *The Journal of comparative neurology* 360 (2) : 257–270.
- Reifler, Aaron N, Andrew P Chervenak, Michael E Dolikian, Brian A Benenati, Benjamin S Meyers, Zachary D Demertzis, Andrew M Lynch et al. 2015. « The rat retina has five types of ganglion-cell photoreceptors ». *Experimental Eye Research* 130 : 17–28.
- Reppert, Steven M. 1998. « A clockwork explosion ! » *Neuron* 21 (1) : 1–4.
- Ribelayga, Christophe P, Yu Cao et Stuart C. Mangel. 2008. « The Circadian Clock in the Retina Controls Rod-Cone Coupling ». *Neuron* 59 : 790–801.
- Ripperger, Jürgen A., et Steven A. Brown. 2010. « Transcriptional regulation of circadian clocks. » In *The Circadian Clock*, sous la direction d’Urs Albrecht, 37–78.
- Roger, Jerome E., Keerthi Ranganath, Lian Zhao, Radu I. Cojocaru, Matthew Brooks, Norimoto Gotoh, Shobi Veleri et al. 2012. « Preservation of cone photoreceptors after a rapid yet transient degeneration and remodeling in cone-only *Nrl*^{-/-} mouse retina. » *The Journal of Neuroscience* 32 (2) : 528–41.
- Röhlich, P, T van Veen et A Szél. 1994. « Two different visual pigments in one retinal cone cell. » *Neuron* 13 (5) : 1159–66.
- Rosenfeld, P, W Sutanto, S Levine et E R De Kloet. 1988. « Ontogeny of type I and type II corticosteroid receptors in the rat hippocampus. » *Brain research* 470 (1) : 113–8.
- Ruan, Guo-Xiang, Gregg C. Allen, Shin Yamazaki et Douglas G. McMahon. 2008. « An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. » *PLoS biology* 6 (10) : e249.
- Ruan, Guo-Xiang, Karen L. Gamble, Michael L. Risner, Laurel A. Young et Douglas G. McMahon. 2012. « Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. » *PLoS ONE* 7 (6) : e38985.
- Ruan, Guo-Xiang, Dao-Qi Zhang, Tong-Rong Zhou, Shin Yamazaki et Douglas G. McMahon. 2006. « Circadian organization of the mammalian retina. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 103 (25) : 9703–8.

- Ruby, N. F. 2002. « Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light ». *Science* 298 (5601) : 2211–2213.
- Sakamoto, Katsuhiko, et Norio Ishida. 1998. « Molecular cloning of serotonin N acetyltransferase gene from the mouse and its daily expression in the retina ». *Neuroscience Letters* 250 : 181–184.
- Sakamoto, Katsuhiko, Cuimei Liu, Manami Kasamatsu, Nikita V. Pozdeyev, P. Michael Iuvone et Gianluca Tosini. 2005. « Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells ». *European Journal of Neuroscience* 22 : 3129–3136.
- Sakamoto, Katsuhiko, Cuimei Liu et Gianluca Tosini. 2004. « Classical Photoreceptors Regulate Melanopsin mRNA Levels in the Rat Retina ». *The Journal of Neuroscience* 24 (43) : 9693–9697.
- Sakamoto, Katsuhiko, K Oishi, M Shiraishi, S Hamano, H Otsuka, Y Miyake et Norio Ishida. 2000. « Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. » *Neuroreport* 11 (18) : 3995–7.
- Salaberry, Nora L, Maria Mateo et Jorge Mendoza. 2017. « The Clock Gene *Rev-Erba* Regulates Methamphetamine Actions on Circadian Timekeeping in the Mouse Brain ». *Molecular neurobiology* 54 : 5327–5334.
- Sandu, Cristina, David Hicks et Marie-Paule Felder-Schmittbuhl. 2011. « Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. » *The European journal of neuroscience* 34 (3) : 507–16.
- Sandu, Cristina, Taole Liu, André Malan, Etienne Challet, Paul Pévet et Marie-Paule Felder-Schmittbuhl. 2015. « Circadian clocks in rat skin and dermal fibroblasts : differential effects of aging, temperature and melatonin ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (11) : 2237–2248.
- Schaeren-Wiemers, N, E Andre, J P Kapfhammer et M Becker-Andre. 1997. « The expression pattern of the orphan nuclear receptor ROR β in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm ». *European Journal of Neuroscience* 9 (12) : 2687–2701.
- Schantz, Malcolm von, Robert J. Lucas et Russell G. Foster. 1999. « Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina ». *Mol Brain Res* 72 (1) : 108–114.
- Schmidt, Tiffany M, et Paulo Kofuji. 2009. « Functional and Morphological Differences among Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells ». *The Journal of Neuroscience* 29 (2) : 476–482.

- Schmidt, Tiffany M, Michael Tri, H Do, Dennis Dacey, Robert J. Lucas, Samer Hattar et Anna Matynia. 2011. « Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells : From Form to Function ». *The Journal of Neuroscience* 31 (45) : 16094–16101.
- Schmutz, Isabelle, Sabrina Wendt, Anna Schnell, Achim Kramer, Isabelle M Mansuy et Urs Albrecht. 2011. « Protein Phosphatase 1 (PP1) Is a Post-Translational Regulator of the Mammalian Circadian Clock ». *PLoS ONE* 6 (6).
- Schneeweis, David M., et Julie L. Schnapf. 1995. « Photovoltage of Rods and Cones in the Macaque Retina ». *Science* 268 (5213) : 1053–1056.
- Semo, Ma'ayan, Anthony a. Vugler et Glen Jeffery. 2007. « Paradoxical opsin expressing cells in the inner retina that are augmented following retinal degeneration ». *European Journal of Neuroscience* 25 (8) : 2296–2306.
- Sengupta, Anamika, Kenkichi Baba, Francesca Mazzoni, Nikita V Pozdeyev, Enrica Strettoi, P. Michael Iuvone et Gianluca Tosini. 2011. « Localization of Melatonin Receptor 1 in Mouse Retina and Its Role in the Circadian Regulation of the Electroretinogram and Dopamine Levels ». *PLoS ONE* 6 (9) : e24483.
- Shearman, Lauren P, Mark J Zylka, David R Weaver, Lee F Kolakowski et Steven M. Reppert. 1997. « Two period Homologs : Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei ». *Neuron* 19 : 1261–1269.
- Shigeyoshi, Yasufumi, Kouji Taguchi, Shuzo Yamamoto, Seiichi Takekida, Lily Yan, Hajime Tei, Takahiro Moriya et al. 1997. « Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript ». *Cell* 91 (7) : 1043–1053.
- Shirakawa, Tetsuo, Sato Honma, Yumiko Katsuno, Haruhisa Oguchi et Ken-ichi Honma. 2000. « Synchronization of circadian ® ring rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons ». *European Journal of Neuroscience* 12 : 2833–2838.
- Siwicki, Kathleen K, Cheryl Eastman, Gabriele Petersen, Michael Rosbash et Jeffrey C. Hall. 1988. « Antibodies to the period Gene Product of *Drosophila* Reveal Diverse Tissue Distribution and Rhythmic Changes in the Visual System ». *Neuron* 1 : 141–150.
- Smallwood, Philip M, Bence P Olveczky, Gary L Williams, Gerald H. Jacobs, Benjamin E Reese, Markus Meister et Jeremy Nathans. 2003. « Genetically engineered mice with an additional class of cone photoreceptors : Implications for the evolution of color vision ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 100 (20) : 11706–11711.
- Smith, Robert G, Michael A Freed et Peter Sterling. 1986. « Microcircuitry of the Dark-Adapted Cat Retina : Functional Architecture of the Rod-Cone Network ». *The Journal of Neuroscience* 6 (12) : 3505–3517.

- Sondereker, Katelyn B., Jessica R. Onyak, Shakib W. Islam, Christopher L. Ross et Jordan M. Renna. 2017. « Melanopsin ganglion cell outer retinal dendrites : Morphologically distinct and asymmetrically distributed in the mouse retina ». *Journal of Comparative Neurology* 525 (17) : 3653–3665.
- Soucy, Ed, Yanshu Wang, Sheila Nirenberg, Jeremy Nathans et Markus Meister. 1998. « A Novel Signaling Pathway from Rod Photoreceptors to Ganglion Cells in Mammalian Retina pathways is maintained in subsequent circuitry ; ON bi- polars excite ON ganglion cells, and OFF bipolars excite OFF ganglion cells. As a result, a transient increase i ». *Neuron* 21 : 481–493.
- Stephan, Friedrich K, et Irving Zucker. 1972. « Circadian Rhythms in Drinking Behavior and Locomotor Activity of Rats Are Eliminated by Hypothalamic Lesions (suprachiasmatic and medial preoptic nuclei/retino-hypothalamic projection) ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 69 (6) : 1583–1586.
- Stokkan, Karl-Arne, Shin Yamazaki, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki et Michael Menaker. 2001. « Entrainment of the circadian Clock in the liver by feeding ». *Science* 291 : 490–493.
- Storch, Kai-Florian, Carlos Paz, James Signorovitch, Elio Raviola, Basil Pawlyk, Tiansen Li et Charles J. Weitz. 2007. « Intrinsic circadian clock of the mammalian retina : importance for retinal processing of visual information ». *Cell* 130 (4) : 730–741.
- Strauss, Olaf. 2005. « The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function ». *Physiol Rev* 85 : 845–881.
- Strettoi, Enrica, Alan J. Mears et Anand Swaroop. 2004. « Recruitment of the rod pathway by cones in the absence of rods. » *The Journal of Neuroscience* 24 (34) : 7576–82.
- Sun, Hui, Jennifer P Macke et Jeremy Nathans. 1997. « Mechanisms of spectral tuning in the mouse green cone pigment ». *Neurobiology* 94 : 8860–8865.
- Swaroop, Anand, Douglas Kim et Douglas Forrest. 2010. « Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. » *Nature reviews. Neuroscience* 11 (8) : 563–76.
- Szél, A, P Röhlich, K Mieziowska, G Aquirre et T van Veen. 1993. « Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave sensitive cone pigments in the mouse retina : a developmental study ». *J Comp Neurol* 331 (4) : 561–77.
- Takahashi, Joseph S. 2015. « Molecular components of the circadian clock in mammals ». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 17 (1) : 6–11.
- . 2016. « Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock ». *Nature Reviews Genetics* 18 (3) : 164–179.

- Tarttelin, Emma E., James Bellingham, Mark W. Hankins, Russell G. Foster et Robert J. Lucas. 2003. « Neuropsin (Opn5) : A novel opsin identified in mammalian neural tissue ». *FEBS Letters* 554 (3) : 410–416.
- Tei, Hajime, Hitoshi Okamura, Yasufumi Shigeyoshi, Chiaki Fukuhara, Ritsuko Ozawa, Matsumi Hirose et Yoshiyuki Sakaki. 1997. « Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene ». *Nature* 389 : 512–516.
- Tikidji-Hamburyan, Alexandra, Katja Reinhard, Riccardo Storchi, Johannes Dietter, Hartwig Seitter, Katherine E. Davis, Saad Idrees et al. 2017. « Rods progressively escape saturation to drive visual responses in daylight conditions ». *Nature Communications* 8 (1) : 1813.
- Tosini, Gianluca, Alec J Davidson, Chiaki Fukuhara, Manami Kasamatsu et Oscar Castanon-Cervantes. 2007. « Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. » *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (14) : 3866–71.
- Tosini, Gianluca, et Michael Menaker. 1996. « Circadian rhythms in cultured mammalian retina. » *Science* 272 (5260) : 419–21.
- . 1998. « The clock in the mouse retina : Melatonin synthesis and photoreceptor degeneration ». *Brain Research* 789 : 221–228.
- Tsukamoto, Yoshihiko, et Naoko Omi. 2017. « Classification of Mouse Retinal Bipolar Cells : Type-Specific Connectivity with Special Reference to Rod-Driven AII Amacrine Pathways ». *Frontiers in Neuroanatomy* 11 (92) : 1–25.
- Van Den Pol, A N, et K L Tsujimoto. 1985. « Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus : immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens ». *Neuroscience* 15 (4) : 1086–985.
- Vitaterna, MH, DP King, AM Chang, JM Kornhauser, PL Lowrey, JD McDonald, WF Dove, LH Pinto, FW Turek et JS Takahashi. 1994. « Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. » *Science* 264 (5159) : 719–25.
- Völgyl, Béla, Samir Chheda et Stewart A. Bloomfield. 2009. « Tracer coupling patterns of the ganglion cell subtypes in the mouse retina ». *Journal of Comparative Neurology* 512 (5) : 664–687.
- Wakamatsu, H, S Takahashi, Takahiro Moriya, S T Inouye, H Okamura, Masashi Akiyama et S Shibata. 2001. « Additive effect of mPer1 and mPer2 antisense oligonucleotides on light-induced phase shift. » *Neuroreport* 12 (1) : 127–31.
- Wang, Jin-shan, Maureen E Estevez, M Carter Cornwall et Vladimir J. Kefalov. 2009. « Intra-Retinal Visual Cycle Required for Rapid and Complete Cone Dark Adaptation ». *Nature Neuroscience* 12 (3) : 295–302.

- Wang, Jin-shan, et Vladimir J. Kefalov. 2011. « The Cone-specific visual cycle ». *Progress in Retinal and Eye Research* 30 (2) : 115–128.
- Watanabe, Kazuto, Jiri Vanecek et Sadao Yamaoka. 2000. « In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide ». *Brain Research* 877 : 361–366.
- Welsh, David K., Diomedes E. Logothetis, Markus Meister et Steven M. Reppert. 1995. « Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. » *Neuron* 14 (4) : 697–706.
- Welsh, David K., et Takako. Noguchi. 2012. « Cellular bioluminescence imaging ». *Cold Spring Harbor protocols* 2012 (8) : 852–866.
- Welsh, David K., Seung-Hee Yoo, Andrew C. Liu, Joseph S. Takahashi et Steve A. Kay. 2004. « Bioluminescence Imaging of Individual Fibroblasts Reveals Persistent, Independently Phased Circadian Rhythms of Clock Gene Expression ». *Curr Biol* 14 (24) : 2289–2295.
- Witkovsky, Paul, Eleonora Veisenberger, Joseph Lesauter, Lily Yan, Madeleine Johnson, Dao-Qi Zhang, Douglas McMahon et Rae Silver. 2003. « Cellular/Molecular Cellular Location and Circadian Rhythm of Expression of the Biological Clock Gene Period 1 in the Mouse Retina ». *The Journal of Neuroscience* 23 (20) : 7670–7676.
- Xu, Lili, Guo-xiang Ruan, Heng Dai, Andrew C. Liu, John Penn et Douglas G. McMahon. 2016. « Mammalian retinal Müller cells have circadian clock function ». *Molecular Vision* 22 : 275–283.
- Yamaguchi, Shun, Hiromi Isejima, Takuya Matsuo, Ryusuke Okura, Kazuhiro Yagita, Masaki Kobayashi et Hitoshi Okamura. 2003. « Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus ». *Science* 302 (5649) : 1408–1412.
- Yamazaki, Shin, Rika Numano, Michikazu Abe, Akiko Hida, Ri-ichi Takahashi, Matsugu Ueda, Gene D. Block, Yoshiyuki Sakaki, Michael Menaker et Hajime Tei. 2000. « Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats ». *Science* 288 (5466) : 682–685.
- Yan, Lily, et Hitoshi Okamura. 2002. « Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus ». *European Journal of Neuroscience* 15 (7) : 1153–1162.
- Yan, Lily, et R Silver. 2002. « Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts ». *Eur J Neurosci* 16 (8) : 1531–1540.
- Yan, Lily, Seiichi Takekida, Yasufumi Shigeyoshi et Hitoshi Okamura. 1999. « Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus : circadian profile and the compartment specific response to light ». *Neuroscience* 94 (1) : 141–150.

- Yang, Guangrui, Lihong Chen, Gregory R. Grant, Georgios Paschos, W.-L. Song, Erik S. Musiek, Vivian Lee et al. 2016. « Timing of expression of the core clock gene *Bmal1* influences its effects on aging and survival ». *Science Translational Medicine* 8 (324) : 324ra16.
- Yoo, Seung-Hee, Shin Yamazaki, Phillip L. Lowrey, Kazuhiro Shimomura, Caroline H. Ko, Ethan D. Buhr, Sandra M. Siepka et al. 2004. « PERIOD2 : :LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 101 (15) : 5339–46.
- Yujnovsky, Irene, Jun Hirayama, Masao Doi, Emiliana Borrelli et Paolo Sassone-Corsi. 2006. « Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK :BMAL1. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 103 (16) : 6386–91.
- Zehring, William A, David A Wheeler, Pranhitha Reddy, T-Ronald J Konopka, Charalambos P Kyriacou, Michael Rosbash et Jeffrey C. Hall. 1984. « P-Element Transformation with period Locus DNA Restores Rhythmicity to Mutant, Arrhythmic *Drosophila melanogaster* ». *Cell* 39 : 369–376.
- Zhang, Dao-Qi, Michael A. Belenky, Patricia J. Sollars, Gary E. Pickard et Douglas G. McMahon. 2012. « Melanopsin mediates retrograde visual signaling in the retina. » *PLoS ONE* 7 (8) : e42647.
- Zhang, Dao-Qi, Kwoon Y. Wong, Patricia J. Sollars, David M. Berson, Gary E. Pickard et Douglas G. McMahon. 2008. « Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. » *Proc.Natl.Acad.Sci.* 105 (37) : 14181–6.
- Zhang, Ray, Nicholas F. Lahens, Heather I. Ballance, Michael E. Hughes et John B. Hogenesch. 2014. « A circadian gene expression atlas in mammals : Implications for biology and medicine ». *Proc.Natl.Acad.Sci.* 111 (45) : 16219–16224.
- Zhao, Hui, Timothy C Doyle, Olivier Coquoz, Flora Kalish, Bradley W Rice et Christopher H Contag. 2005. « Emission spectra of bioluminescent reporters and interaction with mammalian tissue determine the sensitivity of detection in vivo. » *Journal of Biomedical Optics* 10 (4) : 41210.
- Zhao, Xiwu, W. Pack, N. W. Khan et Kwoon Y. Wong. 2016. « Prolonged Inner Retinal Photoreception Depends on the Visual Retinoid Cycle ». *Journal of Neuroscience* 36 (15) : 4209–4217.
- Zhao, Xiwu, Ben K. Stafford, Ashley L. Godin, W. Michael King et Kwoon Y. Wong. 2014. « Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells ». *Journal of Physiology* 592 (7) : 1619–1636.
- Zhao, Xiwu, Kwoon Y Wong et Dao-Qi Zhang. 2017. « Mapping physiological inputs from multiple photoreceptor systems to dopaminergic amacrine cells in the mouse retina. » *Scientific reports* 7 (1) : 7920.

Zylka, Mark J, Lauren P Shearman, David R Weaver et Steven M. Reppert. 1998. « Three period Homologs in Mammals : Differential Light Responses in the Suprachiasmatic Circadian Clock and Oscillating Transcripts Outside of Brain ». *Neuron* 20 : 1103–1110.

Cette première annexe est la revue publiée en 2017 dans la revue *ChronoPhysiology and Therapy*. Elle rapporte les dernières connaissances sur l'horloge rétinienne de mammifères.

The retinal clock in mammals: role in health and disease

Marie-Paule
Felder-Schmittbuhl^{1,*}
Hugo Calligaro²
Ouria Dkhissi-Benyahya^{2,*}

¹Institute of Cellular and Integrative
Neurosciences, UPR3212, CNRS,
Université de Strasbourg, Strasbourg,

²University of Lyon, Stem Cell and
Brain Research Institute, INSERM
U1208, Bron, France

*These authors contributed equally to
this work

Abstract: The mammalian retina contains an extraordinary diversity of cell types that are highly organized into precise circuits to perceive and process visual information in a dynamic manner and transmit it to the brain. Above this builds up another level of complex dynamic, orchestrated by a circadian clock located within the retina, which allows retinal physiology, and hence visual function, to adapt to daily changes in light intensity. The mammalian retina is a remarkable model of circadian clock because it harbors photoreception, self-sustained oscillator function, and physiological outputs within the same tissue. However, the location of the retinal clock in mammals has been a matter of long debate. Current data have shown that clock properties are widely distributed among retinal cells and that the retina is composed of a network of circadian clocks located within distinct cellular layers. Nevertheless, the identity of the major pacemaker, if any, still warrants identification. In addition, the retina coordinates rhythmic behavior by providing visual input to the master hypothalamic circadian clock in the suprachiasmatic nuclei (SCN). This light entrainment of the SCN to the light/dark cycle involves a network of retinal photoreceptor cells: rods, cones, and intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs). Although it was considered that these photoreceptors synchronized both retinal and SCN clocks, new data challenge this view, suggesting that none of these photoreceptors is involved in photic entrainment of the retinal clock. Because circadian organization is a ubiquitous feature of the retina and controls fundamental processes, the coherence from cell to tissue is critical for circadian functions, and disruption of retinal clock organization or its response to light can potentially have a major impact on retinal pathophysiology and vision.

Keywords: retina, clock gene, circadian, ipRGC, photoreceptor, light

Introduction

From algae to mammals, nearly all organisms have adapted their lifestyle to the environmental 24 h light/dark (LD) cycle. Daily rhythms in behavior and physiology are programmed by a group of biological clocks widely present in a variety of tissues and cells, including the retina, and organized in a hierarchical manner. The central clock in the suprachiasmatic nucleus (SCN) lies at the top of the network and coordinates the phases of many peripheral clocks throughout the body. The temporal phase of the SCN is adjusted daily by light, which is captured by the retina, in order to synchronize organism-wide behavioral and physiological rhythms with the LD cycle. One of the first rhythms described in mammalian retina was the finding that rod outer segment disk shedding cycles in relationship with lighting conditions.¹ Furthermore, experiments performed in amphibians and birds demonstrated that the retina contains an endogenous circadian clock, able to oscillate in constant condition in a culture dish.^{2,3}

Correspondence: Ouria Dkhissi-Benyahya
Chronobiology and Affective Disorders,
Stem Cell and Brain Research Institute,
INSERM U1208, 18 Avenue Doyen
Lépine, 69500 Bron, France
Tel +33 4 7291 3487
Fax +33 4 7291 3461
Email ouria.benyahya@inserm.fr

However, it was not until 1996 that cultured hamster retina was reported to maintain autonomous circadian rhythms for melatonin secretion, providing evidence that an endogenous clock is also present in the mammalian retina,^{4,5} regardless of the absence of the SCN.^{6,7} Progress toward understanding the mechanisms of circadian rhythm generation and light entrainment of the retinal clock has been hampered by technical limitations. The successful development of bioluminescence recording using luciferase reporter coupled to clock genes fundamentally revolutionized studies on circadian oscillators.^{8,9} This technique provides the advantage of detecting and quantifying circadian rhythms in retinal living cells or explants, as well as revealing retinal circadian oscillations in vitro in long-term studies in mammals.¹⁰ Many reports have now clearly demonstrated that several molecular, cellular, and physiological retinal rhythms are under the control of a retinal circadian clock or, more likely, a network of clocks localized in multiple types of neurons and glial Müller cells (Figure 1).¹¹

Molecular organization and light entrainment of the retinal clock

Molecular basis of retinal circadian rhythms

The endogenous functioning of circadian clocks, including the retina, involves an integrated network of clock genes interacting in transcriptional–translational feedback loops.¹² Complexes of BMAL1 and CLOCK proteins bind to E-box enhancer elements in the promoters of *Period 1–3* (*Per1–3*), *Cryptochrome 1–2* (*Cry1–2*) clock genes, and “clock-controlled genes” and thereafter drive their expression. PER and CRY proteins form heterodimers that translocate back into the nucleus to inhibit CLOCK/BMAL1 transcriptional activity and therefore their own expression, forming the core negative feedback loop (Figure 1). Fine-tuning and reinforcement of this loop are ensured by another loop involving activation by CLOCK/BMAL1 of the *Ror* and *RevErb* nuclear hormone receptor–encoding genes. By competitive binding

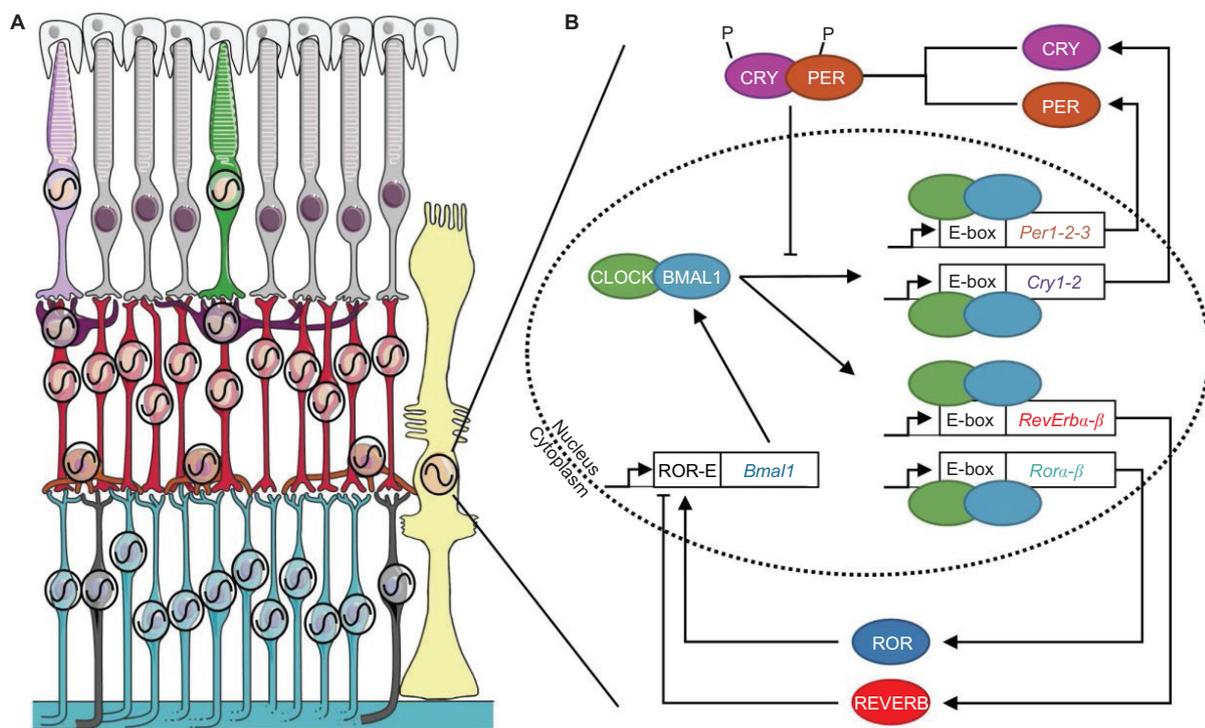


Figure 1 The circadian clock system in the mammalian retina.

Notes: (A) Clock machinery has been described in all retinal neurons, besides rods, as well as in glial Müller cells (black oscillation). Light purple: SW cone; green: MW cone; gray: rod; purple: horizontal cell; red: bipolar cell; orange: amacrine cell; blue: ganglion cell; black: ipRGCs; yellow: Müller cell; white: retinal pigmented epithelium.¹²⁴ (Adapted from Servier Medical Art [homepage on the Internet]. Available from: <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>. Accessed January 1, 2017.x (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)). (B) The endogenous molecular mechanism generating circadian rhythms is based on transcriptional–translational feedback loops involving clock genes. The CLOCK/BMAL1 heterodimer binds to an enhancer box (E-box) and drives the transcription of the clock genes *Period* (*Per1–3*), *Cryptochrome* (*Cry1–2*), *Rora-β*, and *RevErbα-β*. PER and CRY proteins in turn inhibit CLOCK/BMAL1 transcriptional activity. By competitive binding to retinoid-related orphan receptors response elements (ROR-E) sites, the REVERB and ROR proteins repress or activate *Bmal1* transcription, respectively.

Abbreviations: MW, middle-wavelength sensitive; SW, short-sensitive.

to ROR-E sites, the REVERB and ROR proteins, respectively, repress or activate *Bmal1* gene transcription. Importantly, additional posttranslational events, such as proteasomal degradation, phosphorylation, acetylation, ubiquitination, and sumoylation, are also key components in the generation and timing of circadian rhythms. The culmination of activities of these transcription factors regulates circadian biology, from molecular mechanisms to overall behavior, thus constituting a time code for the cell and the entire organism.

Impact of clock gene deletion on retinal functions

Mutant and transgenic rodent models have provided a useful tool to evaluate a specific clock gene's function in circadian rhythms. However, the majority of clock genes have functionally redundant paralogs that are able to perform effectively as the primary gene. Thus, deleting a specific clock gene does not necessarily disrupt the clock mechanism within a cell but may change circadian parameters at the level of the tissue or the organism. *Per2*-knockout mice exhibit retinal vascular damage, reduction in retinal thickness, and a decrease in the electroretinogram (ERG) amplitude, similar to those found in type 2 diabetes.^{13–15} A double-clock gene mutant, the *Per1^{Brdm1}/Per2^{Brdm1}* mouse, exhibits delayed photoreceptor differentiation and alterations in short-wavelength cone distribution.¹⁶ *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}* and *Bmal1* retina-specific knockout mice show a loss of ERG circadian rhythm, suggesting that functional *Bmal1* and *Cry1-Cry2* genes are required for rhythmic retinal processing of visual stimuli, independently from the central clock.^{17,18} In addition, *Bmal1^{-/-}* mice present abnormal circadian gene expression profiles in LD cycles, suggesting that *Bmal1* is involved in the light regulation of gene expression. Silencing of *RevErba* using small interfering RNA induces retinal abnormalities, such as pan-retinal spotting and decreased response to light.¹⁹ By contrast, Ait-Hmyed et al²⁰ reported a hypersensitivity to light in *RevErba^{-/-}* mice, concomitant with an increased number of melanopsin-containing ganglion cells, suggesting that this clock gene modulates light sensitivity and visual processing. Only one study has extensively explored the rhythmic phenotype of single clock gene knockout in retina. Using several clock-gene-deficient mice, Ruan et al²¹ reported that the retinal clock is more vulnerable to clock gene disruption than the SCN. The authors showed that *Per1*, *Cry1*, and *Clock* are each necessary for the expression of molecular circadian rhythms by the retina. By contrast, knocking out *Per2*, *Per3*, or *Cry2* individually does not blunt the rhythm but modulates its period or amplitude.²¹ For example, retinal explants from

Per3^{-/-} mice show a period-shortening effect, whereas the period of the SCN clock is not altered. This differential pattern of circadian rhythm alterations between the retina and the SCN was proposed to relate to the fact that cellular coupling among clock cells/layers is not uniform throughout the retina,²² whereas oscillators are strongly coupled in the SCN.²³

Entrainment of the retinal clock by light

An especially important finding was that “blind” transgenic mice lacking functional rods and cones (*rd/rd cl*) exhibit near-normal photoentrainment of circadian rhythms.^{24,25} This subsequently led to the discovery of a novel opsin, melanopsin (OPN4), expressed in a subset of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs), with a peak of sensitivity at ~480 nm.^{26–28} It is now clear that ipRGCs combine their direct intrinsic responses with signals derived from rods and cones to regulate diverse non-image-forming responses,²⁹ with each photoreceptor encoding distinct parameters of the light.^{30–34} However, we currently lack a comprehensive understanding of how light regulates the retinal clock in mammals and of the role of the different photoreceptors.

Nevertheless, several lines of evidence suggest that ipRGCs influence retinal network and physiology. Melanopsin was shown to be critical for diurnal and circadian regulation of the mouse photopic and scotopic ERG, suggesting influence of melanopsin up to the photoreceptor level.^{35–37} In agreement with this, we reported that circadian rhythms of clock gene expression are lost in the photoreceptor layer (PRL) of *Opn4^{-/-}* mice.³⁸ In addition, synaptic contact of ipRGCs with other retinal neurons has been reported in rodents, monkeys, and humans.^{39–42} Specifically, ipRGCs provide excitatory sustained light responses to dopaminergic (DAergic) amacrine cells, which are influential modulators of retinal circuitry.⁴³ In the absence of melanopsin, this sustained response is lost,⁴⁰ and blue light fails to activate the DAergic system and to induce *Per1-Per2* mRNA expression in the PRL.³⁸ The function of these retrograde connections is currently unknown, but they represent a potential mechanism for transmitting irradiance information to the outer retina.

In mammals, the first rhythm shown in vitro to be synchronized with LD cycles was melatonin secretion in the mouse retina.⁵ Ten years later, Ruan et al¹⁰ clearly established that a pulse of white light administered at circadian time (CT)13 or CT19, respectively, delays or advances the phase of PER2^{Luc}, principally via the DA D1 receptor. Recent data suggest that the photoreceptors regulating light response of retinal rhythms differ from those used by the SCN.^{44,45} PER2^{Luc} rhythm is still entrained to LD cycle in

rd1/rd1;Opn4^{-/-} mice, lacking rods, cones, and melanopsin.⁴⁴ The authors propose that an ultraviolet (UV)-sensitive opsin, neuropsin (OPN5), is the sole opsin required to phase-shift the retinal clock in response to light.⁴⁵ Neuropsin is expressed in many vertebrate species and is localized in a subset of mouse RGCs,^{45–48} but it is unclear whether it is expressed in ganglion cells distinct from ipRGCs. However, Hughes et al⁴⁹ suggested a limited role for neuropsin in driving light response in the mouse retina because UV light stimulation failed to induce both c-FOS and excitatory responses in mice lacking the essential components of the phototransduction signaling pathways present in rods, cones, and ipRGCs.⁴⁹ All these studies raise important questions about the relationship between neuropsin and melanopsin and their respective roles in the light response of the retinal clock.

Cellular and layer organization of the retinal clock

At the cellular level

In early studies, analysis of the expression pattern of core clock genes in the whole retina was the classic approach used to assess the functioning of the retinal clock.⁵⁰ However, this methodology led to significant dissimilarities among the results observed in different species or even within the same species among different strains.⁵⁰ Moreover, the cellular diversity of mammalian retina renders difficult the analysis of the circadian clock at the whole-tissue level because differences in phasing and period between cells/layers may result in low-amplitude rhythmicity or masking of coherent clock gene expression.^{22,38,51–55} It is therefore essential to determine which cell types possess clock properties to understand rhythm generation in the retina. Based on the molecular and physiological data from amphibians and birds, the initial prevailing model for circadian organization in vertebrate retinas proposed that photoreceptors contain self-sustained circadian clocks.^{56–58} By contrast, the cellular location of the retinal clock in mammals has been a matter of long debate. In early research, retinal degenerative animal models such as the *rd* mouse and the Royal College of Surgeons rat, both characterized by progressive degeneration of photoreceptors, showed arrhythmic melatonin release, whereas the daily rhythms of DA were retained,^{5,59} suggesting that photoreceptors are necessary to maintain rhythmic melatonin production, but their integrity was not required for DA signaling. With the discovery of clock genes, photoreceptors have been the site of the most intensive controversy because initial reports claimed that expression of *Clock*, *Bmal1*, *Per1-2*, or *Cry2* takes place in the outer nuclear layer (ONL) of rodents,^{60–62}

whereas others failed to detect them.^{17,52,63} More recently, by using ONL isolated by laser microdissection, vibratome sectioning, or following kainic acid treatment, several studies demonstrated clock property in rat photoreceptors under an LD cycle, but these rhythms were severely damped in constant darkness, indicating that the photoreceptor clock is not robust,^{64–66} although data obtained in the mouse support the opposite conclusion.³⁸ This latter analysis was the first to compare the kinetics of clock gene expression in ONL and inner retina (ganglion cell layer [GCL] + inner nuclear layer [INL]) and concluded that both retinal compartments show clock gene oscillations, interestingly without any obvious phase relationship (Figure 2). However, only ONL displayed the complete set of oscillating clock genes, suggesting that the main clock is located within the photoreceptors.³⁸ Conversely, several studies support the idea that the generation of rhythms takes place mainly in the inner retina.^{17,52,63,67} The strongest evidence is provided by the study of *Per2^{Luc}* mice. When analyzed on an *rd* background, on which photoreceptors degenerate quite early, *PER2^{Luc}* activity was shown to be rhythmic⁵² and generated in the inner retina specifically.¹⁰ Responsible cell types have not been identified yet, although DAergic amacrine cells, which have been shown to express the whole set of clock genes,⁶⁸ are a good candidate. Although their contribution to clock gene oscillations in the retina has been poorly evaluated, ganglion cells have also been reported to harbor clock gene transcripts or products,^{52,61–63,69} sometimes with sparse distribution. The most extensive *ex vivo* analysis of the distribution of clock gene expression in the retina was conducted by immunohistochemistry in the mouse. Surprisingly, the authors came to the conclusion that, although clock proteins are present in most cell types besides rods, rhythmic expression is detected uniquely in cones.⁵³ Müller cells, the main glial cell type of the retina, have been demonstrated to also express sustained rhythms in primary culture of rodent or human cells transduced by luciferase-expressing viruses.⁷⁰ Taken together and in spite of some discrepancy, these data suggest that clock genes are expressed throughout the retina.

At the level of layers

Studying the specific clock properties and robustness of a retinal subregion by *ex vivo* analyses is limited by the existence of potential input received from neighboring cells. By using an original, vibratome-based procedure to isolate the retinal cellular layers (PRL, INL, and GCL) from *Per2^{Luc}* mice, we established that these 3 layers can act as functional, self-sustained circadian pacemakers.²² However, explants of

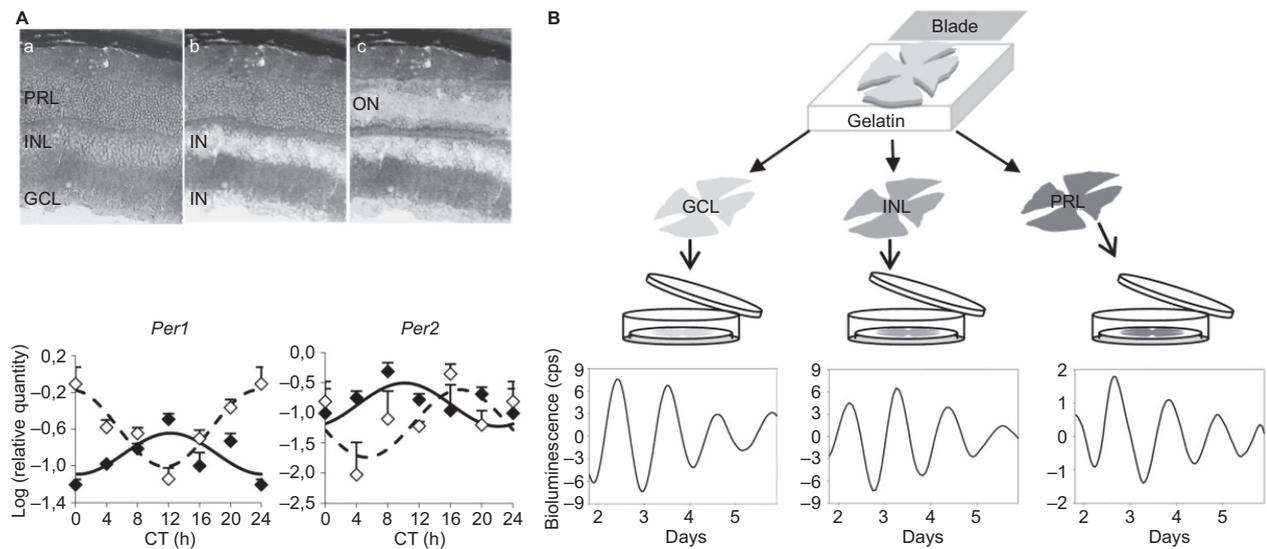


Figure 2 The retinal clock contains a network of clocks.

Notes: (A) Top panel: photomicrographs of a retinal section of wild-type mouse (a) before and after laser microdissection of (b) the IN of the retina, including the INL + GCL, and (c) the ON, which includes the PRL. Bottom panel: circadian expression of *Per1* and *Per2* clock genes in the inner (solid line) and the outer (dashed line) retinal layers of the wild-type mouse. Note that both compartments, the IN and the ON, show clock gene oscillations, interestingly without any obvious phase relationship. *Cell Mol Life Sci*. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light, 70(18), 2013, 3435–3447, Dkhissi-Benyahya O, Coutanson C, Knoblauch K, et al. With permission of Springer.³⁸ **(B)** Top panel: Vibratome-sectioning method for isolation of the PRL, the INL, and the GCL from freshly mounted retinas. Bottom panel: Representative bioluminescence recordings (detrended data following 24 h running average subtraction) of a GCL (left panel), an INL (middle panel), and a PRL (right panel) sample from *PER2^{Luc}* mice during the first week of culture. Data from Jaeger et al and Sandu et al.^{22,66}

Abbreviations: cps, counts per second; CT, circadian time; GCL, ganglion cell layer; IN, inner region; INL, inner nuclear layer; ON, outer region; PRL, photoreceptor layer.

PRLs showed the lowest amplitude and robustness, which correlated with the absence of rhythms in PRLs isolated similarly from *Per1*-luciferase rats, in which GCL and INL showed clear rhythms (Figure 2).²² These results confirm that the retina is a network of circadian oscillators located in the different layers and in which the INL and GCL provide major contribution. In conclusion, expression of clock genes has been detected in most retinal neurons as well as in glial cells.⁷⁰ The identity of the major pacemaker, if any, still warrants identification but it is likely that, as in the SCN, the global network plays a role in the sustainability of the retinal clock.

Intercellular/layer synchronization in the retina

Irrespective of the exact cellular location of the retinal clock in mammals, data from early studies indicate that the retinal oscillators are interconnected, notably through the DA/melatonin feedback loop.⁵⁰ In the current view essentially derived from amphibian and avian models, the secretion of DA by a subset of amacrine cells in the light period and the synthesis of melatonin in PRLs during the night signal to the retina that it is day and night, respectively. Both molecules display reciprocal negative effects, involving, respectively, the melatonin receptors present in the INL, amacrine cells in particular,^{71,72} and the D2-like DA recep-

tors located on photoreceptors.^{73,74} Taken together, these cells and neuromodulators constitute an intercellular feedback loop that regulates retinal rhythmic physiology (melatonin and DA displaying overt largely distributed receptors) and sustains the rhythmic activity of the clocks that have not been localized yet. In this respect, the case of most mouse lines is odd because they do not synthesize melatonin and are unable to maintain rhythmic DA release in constant dark conditions,⁵⁹ although they otherwise display robust *PER2^{Luc}* oscillations.^{10,22} This result indicates that DAergic cells, at least in melatonin-deficient mice, are not the site of rhythm generation and that photoreceptors in melatonin-proficient mice, contain a clock releasing melatonin as a synchronizing signal. The localization of the clock contained in the inner retina still awaits identification, but it has been suggested that it does not rely on any synchronizing signal from the remainder of the retina or within the clock population itself. Indeed, in the presence of agonists or antagonists of most common neurotransmitters, as well as upon blocking of neural transmission, the cycling bioluminescence from *PER2^{Luc}* retinas was barely affected.^{10,22} Only treatment with gamma-aminobutyric acid (GABA) decreased the amplitude, indicating that it has a negative impact on the synchronization.^{10,22} We observed that, upon dividing retinas from the same strain of mice into distinct cellular layers or combinations thereof,

the period of *PER2^{Luc}* oscillations was strongly correlated with the degree of dissociation of the tissue. Moreover, communication between the INL and GCL appeared to rely on their synaptic connection because both layers sampled individually and cultured together exhibited periods similar to those of the independent layers and significantly higher than those of INL + GCL sampled together. In addition, the blocking of gap junctions, similar to dissociating the retinas, increased the period of the retinal clock, although this effect was only partial. These data support the idea that the retinal clock is rather composed of several oscillators, which are located in the distinct layers and strongly connected not only by gap junctions but also by other (notably synaptic) signals that remain to be identified.

Functions controlled by the retina clock

Many functions have been described to be rhythmic in the retina exposed to the LD cycle and are thought to optimize adaptation of vision to the daily changes in light intensity. Many of them have been shown to remain rhythmic in constant conditions and, hence, to be regulated by a circadian clock: this is the case for melatonin and DA synthesis,⁷⁵ phagocytosis of photoreceptor outer segments,¹ amplitude of the photopic ERG,^{35,76} contrast sensitivity,⁷⁷ and rod–cone coupling.⁷⁸ Since the demonstration of the existence of an autonomous clock in the mammalian retina,⁴ it has been essentially assumed that the rhythmic retinal functions are under the control of the retina clock seen as a whole. The ongoing paradigm about how circadian clocks control their outputs is based on the idea that clock transcription factors transfer their rhythmicity to their target genes. In this context, generation of tissue-specific cycling gene expression programs can result from either indirect transcriptional activation by transcription factors that are targets of the clock or direct effects from the combination of clock factors and tissue-specific regulators. By using high-throughput transcriptome analyses, it has been demonstrated that ~43% of protein-encoding genes in mammals are rhythmic.⁷⁹ One groundbreaking study conducted on whole eyes sampled throughout the 24 h cycle nicely showed that, in LD conditions, the knockout of *Bmal1* induces an alteration of rhythmic expression in 90% of the genes, with total loss of rhythmicity in 60% of them.¹⁷ This study hence places the circadian clock in the center of rhythmic functions in the retina, *Bmal1* being required even to mediate the effects of the LD cycle on gene expression. However, analysis of the genes identified as rhythmic in this study did not reveal

clear enrichment in specific functions, most major pathways, including photoreceptor signaling and synaptic transmission, being found in the gene list.¹⁷ A similar study was reported more recently, with whole eye globes sampled at 2 zeitgeber times (ZT): ZT1.5, coinciding with the peak of photoreceptor outer segment phagocytosis, and ZT9.⁸⁰ The authors describe rhythmic expression of genes related to both the phosphoinositide metabolism and regulation of phagocytosis, with maxima correlating with the peak of phagocytosis in the retina. Concomitantly, another study was conducted on rat photoreceptors isolated by laser microdissection at ZT6 and ZT18.⁸¹ Forty genes displaying differential day/night expression in PRLs and confirmed in whole retina samples were reported, notably linked to transcriptional regulation, cell cycle and cell death, cell response to environmental signals, and retina-specific functions (*Grk1*, *Rorb*, *Pax4*, and *Pgc1a*), confirming that the clock controls many distinct processes in photoreceptors.⁸¹

More globally, insight into how the clock controls retinal function has been mainly obtained as a result of targeted analysis of gene expression, in most cases by Northern blotting and/or real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), which has led to a wide list of cycling genes, either in LD or in LD and constant dark (DD) conditions (Table 1). Not surprisingly, the genes identified as rhythmic mainly refer to visual function, indicating that, even if there is a bias in the analysis, photoreceptors display rhythmic activity regulated at the gene expression level. They also indicate that part of this regulation involves cycling transcription factors and signaling proteins that are not retina specific.

Regarding clock-controlled genes, the most investigated ones relate to the regulation of melatonin synthesis, described as a characteristic output from the retinal clock in most vertebrate species examined.^{2,82,83} In mammals, the site for melatonin synthesis has not been located strictly to the PRL because melatonin synthesis is retained upon photoreceptor degeneration⁸⁴ and also because the enzymes involved in its synthesis are detected in the GCL.⁸⁵ However, its regulation in the PRL has been the best characterized. Expression of several enzymes involved in the biochemical cascade generating melatonin was shown to be rhythmic in the rat retina: TPH, HIOMT, and AA-NAT,⁸⁶ which catalyzes the penultimate, rate-limiting step. The promoter of the *Anat* gene contains an E-box sequence, which was shown to be stimulated by BMAL1/CLOCK.⁸⁷ This gene is likely regulated as well through its well-conserved CRE site, which mediates cyclic adenosine monophosphate (cAMP) activation potentially during the night, following photoreceptor depolarization.

Table I Genes whose expression (mRNA or protein) was reported to vary over the 24 h cycle in light/dark (LD), constant dark (DD), or both conditions (LD and DD)

Gene symbol	Lighting condition in which temporal variation in gene expression over ~24 h was demonstrated in whole retina samples, and related references
<i>A2aR</i>	LD: Li et al ¹²⁵
<i>Aanat</i>	LD: Roseboom et al ¹²⁶ ; Schneider et al ⁶⁵ LD and DD: Sakamoto et al ⁸⁴ ; Sakamoto et al ¹²⁷ ; Bai et al ¹²⁸ ; Bobu et al ¹²⁹
<i>Acadm</i>	LD and DD: Vancura et al ¹³⁰
<i>Adcy1</i>	LD: Hwang et al ⁷⁷ DD: Jackson et al ¹³¹ LD and DD: Fukuhara et al ⁸⁸
<i>Adra1b</i>	LD and DD: Kunst et al ⁸¹
<i>Arr3</i>	LD and DD: Bobu et al ¹²⁹
<i>Asns</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Atf3</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Cdkn1b</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Cerk</i>	LD and DD: Kunst et al ⁸¹
<i>Cx36</i>	LD and DD: Katti et al ¹³²
<i>Cox1</i>	LD and DD: de Zavalía et al ¹³³
<i>Cpt1a</i>	LD and DD: Vancura et al ¹³⁰
<i>Cttnal1</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Dbp</i>	DD: Sakamoto et al ⁷ ; Storch et al ¹⁷ ; Lahouaoui et al ⁵⁵
<i>Dicer</i>	LD: Yan et al ¹³⁴
<i>Drd4</i>	LD: Li et al ¹²⁵ ; Klitten et al ¹³⁵ DD: Storch et al ¹⁷ LD and DD: Bai et al ¹²⁸ ; Jackson et al ¹³¹
<i>Dyrk2</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Egr1</i>	LD: Humphries and Carter ¹³⁶ ; Man et al ¹³⁷ LD and DD: Bai et al ¹²⁸
<i>Egr2</i>	LD: Bai et al ¹²⁸
<i>Esrrb</i>	LD: Kunst et al ¹³⁸
<i>Fos</i>	LD: Humphries and Carter ¹³⁶ ; Yoshida et al ¹³⁹ ; Kamphuis et al ¹⁴⁰
<i>Gapdh</i>	LD: Kamphuis et al ¹⁴⁰
<i>Gnat1</i>	LD: Brann and Cohen ¹⁴¹
<i>Grk1</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Gsk3b</i>	LD: Vancura et al ¹³⁰
<i>Gys1</i>	LD: Vancura et al ¹³⁰
<i>Hiomt</i>	LD: Gauer and Kraft ¹⁴²
<i>c-Jun</i>	LD: Kamphuis et al ¹⁴⁰
<i>Kcnb1</i>	LD: Holter et al ¹⁴³
<i>Kcnv2</i>	LD: Holter et al ¹⁴³
<i>Mertk</i>	LD: Law et al ¹⁴⁴
<i>Noct</i>	LD and DD: Wang et al ¹⁴⁵
<i>Nr2c1</i>	LD: Kunst et al ¹³⁸
<i>Nr2e3</i>	LD: Mollema et al ¹⁹ LD and DD: Kunst et al ¹⁴⁶
<i>Nr4a1</i>	LD and DD: Kunst et al ¹⁴⁶
<i>Nupr1</i>	LD: Kunst et al ¹³⁸
<i>Opn1mw</i>	LD: Sakamoto et al ¹⁴⁷ LD and DD: Bobu et al ¹²⁹
<i>Opn1sw</i>	LD: Sakamoto et al ¹⁴⁷ DD: von Schantz et al ¹⁴⁸ LD and DD: Bobu et al ¹²⁹
<i>Opn2</i>	LD: Sakamoto et al ¹⁴⁷ DD: von Schantz et al ¹⁴⁸ LD and DD: Bobu et al ¹²⁹
<i>Opn4</i>	LD: Bobu et al ¹²⁹ ; Mathes et al ¹⁴⁹ LD and DD: Sakamoto et al ¹⁵⁰ ; Hannibal et al ¹⁵¹

(Continued)

Table I (Continued)

Gene symbol	Lighting condition in which temporal variation in gene expression over ~24 h was demonstrated in whole retina samples, and related references
<i>Otx2</i>	LD: Kunst et al ¹³⁸
<i>Pax4</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Pde8a</i>	LD and DD: Kunst et al ⁸¹
<i>Pde10a</i>	LD and DD: Wolloscheck et al ¹⁵²
<i>Pla2g1b</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Ppargc1a</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Rcvrn</i>	LD: Kamphuis et al ¹⁴⁰ ; Wiechmann and Sinacola ¹⁵³
<i>Rhobtb1</i>	LD: Kunst et al ⁸¹
<i>Sirt1, 2, 5-7</i>	LD: Ban et al ¹⁵⁴
<i>Th</i>	LD: Sakamoto et al ¹⁵⁰
<i>Tph1</i>	LD: Kamphuis et al ¹⁴⁰ ; Liang et al ¹⁵⁵
<i>Tph2</i>	LD: Liang et al ¹⁵⁵
<i>Usp2a, 2b</i>	LD: Scoma et al ¹⁵⁶

This CRE-mediated control probably works also in constant conditions because cAMP is rhythmic in constant darkness.⁸⁸ Indeed, the BMAL1/CLOCK dimer directly stimulates transcription of *Ac1* gene (encoding adenylate cyclase 1), potentially restricting its expression to the end of the day and night, thus gating cAMP increase and *Aanat* activation to the same temporal window.⁸⁸

The potential role of the retinal clock in eye disease

A myriad of circadian rhythms has been described in the mammalian eye. Most of them, if not all, are regulated by the retinal clock.⁵⁰ Furthermore, the mammalian retinal clock controls cell survival and growth processes in the eye, including the susceptibility of photoreceptors to degeneration from light damage or during aging.^{89,90} The widespread control of signaling, metabolism, and gene expression exerted by the retinal circadian clock suggests that its integrity is critical for maintaining normal rhythmic responses and retina homeostasis. Thus, this organ represents a major target for impairments induced by circadian misalignment or retinal diseases.

Several ocular pathologies, such as diabetes, glaucoma, or age-related macular degeneration, are associated with degeneration of retinal cells, including photoreceptors, which receive and integrate light signals from the environment. These pathologies represent the major causes of blindness that not only affect vision but also lead to a decrease or loss of the photic input to the circadian system, impairing proper synchronization to the environmental 24 h cycle and thus adding to vision loss another strong handicap.

Dysregulation of clock gene expression has been identified as a key factor in the pathogenesis of several diseases or

retinal alterations. *Bmal1*^{-/-} mice display ocular abnormalities, including corneal neovascularization, keratinization, and progressive inflammation,⁹¹ associated with reduced life span, as well as premature aging symptoms, such as cataracts, also reported in *Clock*-deficient mice.⁹² *Clock* mutant and *Bmal1* conditional knockout mice develop type 1 diabetes,⁹³ whereas *Per2*-knockout mice exhibit retinal phenotype similar to that found in type 2 diabetes.^{13–15} Conversely, diabetes is also associated with circadian disruption of clock gene expression. In rodent models of type 1^{94,96} or type 2⁹⁵ diabetes, the expression of several clock genes, including *Clock*, *Bmal1*, *Per1-Per2*, and *Cry1-2*, was downregulated in the retina, whereas no alterations were observed in the SCN. We reported similar observations using a mouse model of type 1 diabetes induced by streptozotocin injection.⁵⁵ In this model, the amplitude of *Per1* and *Cry1* gene expression is upregulated, whereas *Per3* loses its circadian rhythmicity in the retina. In addition to the dysregulation of the retinal clock organization, we reported disturbances in one of its main outputs, the DAergic system, with 56% reduction in the total number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells in diabetic mice,⁵⁵ in accordance with previous studies performed both in mouse and rat models of diabetes.^{97–101} The diabetes-associated visual dysfunction reported in rodent models^{100,102,103} and in diabetic patients who exhibit defects in color perception and contrast sensitivity can be treated by DA precursors or DA agonists.¹⁰⁰ However, the underlying mechanisms are still unclear. The decline in DA content during diabetes may be related to a reduced number of retinal DAergic neurons, low levels of DA synthesis, or an impairment of DA release from the cells. In addition, a deficit in light induction of *Th*, *c-Fos*, and *Per1* in response to 480 nm light has been reported during the development

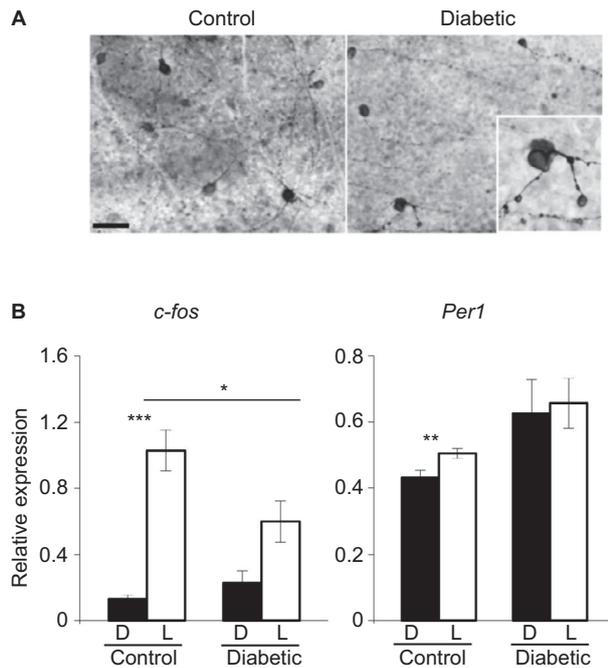


Figure 3 ipRGCs and light-induced gene expression are altered in a mouse model of diabetic retinopathy.

Notes: (A) Representative photomicrographs of flat-mounted retinas from control and diabetic mouse models immunostained by melanopsin antibody at 12 weeks postdiabetes. Morphological abnormalities of ipRGCs, such as soma swelling and increased varicosities in the dendrites, were observed in the peripheral retina of diabetic animals. Enlarged image of a melanopsin-positive cell (inset: magnification $\times 100$). Scale bar = 50 μm . (B) Relative light-induced *c-Fos* and *Per1* mRNA levels in the retinas of control and diabetic mice at 12 weeks postdiabetes. Control and diabetic mice were exposed to a 480 nm monochromatic light pulse (1.17×10^{14} photons/cm²/s, 15 min duration) delivered at CT16. White bars represent animals that received the light pulse (L). The dark control mice (D, black bars) were handled the same way but did not receive any light stimulus. Data are presented as mean value \pm SEM. Asterisk indicates a statistically significant difference: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ (modified from^{55,104}). Adapted from Lahouaoui H, Coutanson C, Cooper HM, Bennis M, Dkhissi-Benyahya O. Diabetic retinopathy alters light-induced clock gene expression and dopamine levels in the mouse retina. *Mol Vis.* 2016;22:959.⁵⁵ Adapted from Lahouaoui H, Coutanson C, Cooper HM, Bennis M, Dkhissi-Benyahya O. Clock genes and behavioral responses to light are altered in a mouse model of diabetic retinopathy. *PLoS One.* 2014;9(7):e101584.¹⁰⁴

Abbreviations: CT, circadian time; ipRGC, intrinsically photosensitive retinal ganglion cell; SEM, standard error of the mean.

of diabetic retinopathy, possibly through impaired ipRGCs (Figure 3).^{55,104} In patients with type 2 diabetes, ipRGC dysfunction has been proposed to be investigated for diagnostic purpose by using the postillumination pupil response (PIPR), a sustained constriction of the pupil after light offset.¹⁰⁵

The classic hallmark of glaucomatous optic neuropathies is the progressive loss of RGCs and their axons, with concomitant insidious defects in the visual field. As for RGCs, ipRGC abnormalities have been reported in rodent models of experimental glaucoma^{106–109} and in glaucomatous patients.^{110,111} We reported an ~50%–70% reduction of RGC axon terminals (including ipRGCs) in several visual and non-visual structures, notably in the SCN, and an alteration of the expression of opsin genes in the retina in an experimental rat

model of glaucoma,¹⁰⁶ as observed by others.¹¹² In addition, several nonvisual responses to light were affected, such as the pupillary light response, light-induced nocturnal pineal melatonin suppression, and locomotor activity rhythm.^{106,108} Dysfunction of ipRGCs in animal models of glaucoma have been corroborated by human studies because glaucoma patients with sleep disorders showed a reduction in the pupillary light response and suppression of nocturnal melatonin by light.^{113–118}

The potential role of ipRGCs has been described in other pathological processes. Concurrent regression of embryonic hyaloid vasculature and formation of the retinal vasculature occur postnatally in the mouse,¹¹⁹ and the light response pathway that regulates both processes involves melanopsin.¹²⁰ In neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's, a contribution of retinal deficits to circadian abnormalities has been suggested because loss of ipRGCs has been found to be associated with β -amyloid deposits.¹²¹ Degeneration of cone and melanopsin pathways has also been reported in a mouse model of Huntington's disease.¹²² All these data suggest alteration of both retinal photoreception and photic signal transmission necessary to entrain the retinal and the central clocks in several degenerative diseases. Using impaired circadian photoreception as a marker or biological indicator of retinal or brain pathologies will represent a valuable research tool for diagnostic purposes. ERG anomalies are, for instance, associated with several psychiatric disorders.¹²³

Conclusion

The retina constitutes a fascinating clock model perfectly suitable both to understand the molecular mechanisms of circadian rhythm generation at the cellular and tissue levels and to characterize the synchronizing factors coordinating multiple oscillators at the tissue level. To elucidate these key unresolved questions, the development of in vitro culture of isolated cells or retinal explants from bioluminescent mice models, coupled with a spatial resolution of the signal, is crucial to monitor clock oscillations at the single-cell level in all retinal layers and over several days. Disruption of retinal clock organization or its entrainment by light may have major impacts on visual and nonvisual functions. In addition, given its highly rhythmic physiology, the retina potentially represents a major target for impairments induced by circadian misalignment. Thus, it will be important to assess the potential detrimental effects of repetitive clock phase shifts, such as those induced by shift work or repetitive jet lag, on retina function and health.

Acknowledgments

This research was supported by the University of Strasbourg Institute for Advanced Studies (USIAS) and Coopération et mobilité internationales Rhône-Alpes (Rhône-Alpes CMIRA).

Disclosure

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- LaVail M. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science*. 1976;194(4269):1071–1074.
- Besharse JC, Iuvone PM. Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature*. 1983;305(5930):133–135.
- Pierce ME, Sheshberadaran H, Zhang Z, Fox LE, Applebury ML, Takahashi JS. Circadian regulation of iodopsin gene expression in embryonic photoreceptors in retinal cell culture. *Neuron*. 1993;10(4):579–584.
- Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 1996;272(5260):419–421.
- Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res*. 1998;789(2):221–228.
- Terman JS, Reme CE, Terman M. Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 1993;605(2):256–264.
- Sakamoto K, Oishi K, Shiraishi M, et al. Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport*. 2000;11(18):3995–3997.
- Yamazaki S, Numano R, Abe M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000;288(5466):682–685.
- Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, et al. PERIOD2:LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5339–5346.
- Ruan G-X, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol*. 2008;6(10):e249.
- Besharse JC, McMahon DG. The retina and other light-sensitive ocular clocks. *J Biol Rhythms*. 2016;31(3):223–243.
- Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*. 2016;18(3):164–179.
- Bhatwadekar AD, Glenn JV, Curtis TM, Grant MB, Stitt AW, Gardiner TA. Retinal endothelial cell apoptosis stimulates recruitment of endothelial progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(10):4967–4973.
- Bhatwadekar AD, Yan Y, Qi X, et al. Per2 mutation recapitulates the vascular phenotype of diabetes in the retina and bone marrow. *Diabetes*. 2013;62(1):273–282.
- Jadhav V, Luo Q, Dominguez M J 2nd, et al. Per2-mediated vascular dysfunction is caused by the upregulation of the connective tissue growth factor (CTGF). *PLoS One*. 2016;11(9):e0163367.
- Ait-Hmyed O, Felder-Schmittbuhl M-P, Garcia-Garrido M, et al. Mice lacking Period 1 and Period 2 circadian clock genes exhibit blue cone photoreceptor defects. *Eur J Neurosci*. 2013;37(7):1048–1060.
- Storch K-F, Paz C, Signorovitch J, et al. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell*. 2007;130(4):730–741.
- Cameron MA, Barnard AR, Hut RA, et al. Electroretinography of wild-type and cry mutant mice reveals circadian tuning of photopic and mesopic retinal responses. *J Biol Rhythms*. 2008;23(6):489–501.
- Mollema NJ, Yuan Y, Jelcick AS, et al. Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina. *PLoS One*. 2011;6(3):e17494.
- Ait-Hmyed Hakkari O, Acar N, Savier E, et al. Rev-Erb α modulates retinal visual processing and behavioral responses to light. *FASEB J*. 2016;30(11):3690–3701.
- Ruan G-X, Gamble KL, Risner ML, Young LA, McMahon DG. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One*. 2012;7(6):e38985.
- Jaeger C, Sandu C, Malan A, Mellac K, Hicks D, Felder-Schmittbuhl M-P. Circadian organization of the rodent retina involves strongly coupled, layer-specific oscillators. *FASEB J*. 2015;29(4):1493–1504.
- Liu C, Li S, Liu T, Borjigin J, Lin JD. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. 2007;447(7143):477–481.
- Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, et al. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*. 1999;284(5413):502–504.
- Lucas RJ, Freedman MS, Munoz M, Garcia-Fernandez J, Foster RG. Novel ocular photoreceptors regulate the mammalian circadian system: II. Acute inhibition of pineal melatonin. *Science*. 1999;284(5413):502–504.
- Provencio I, Jiang G, De Grip WJ, Hayes WP, Rollag MD. Novel skin and brain opsin, melanopsin is found in the chicken. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(4):S236.
- Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002;295(5557):1070–1073.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*. 2002;295(5557):1065–1070.
- Hughes S, Jagannath A, Rodgers J, Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Signalling by melanopsin (OPN4) expressing photosensitive retinal ganglion cells. *Eye*. 2016;30(2):247–254.
- Dkhissi-Benyahya O, Gronfier C, De Vanssay W, Flamant F, Cooper HM. Modeling the role of mid-wavelength cones in circadian responses to light. *Neuron*. 2007;53(5):677–687.
- Altimus CM, Güler AD, Alam NM, et al. Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. *Nat Neurosci*. 2010;13(9):1107–1112.
- Dollet A, Albrecht U, Cooper HM, Dkhissi-Benyahya O. Cones are required for normal temporal responses to light of phase shifts and clock gene expression. *Chronobiol Int*. 2010;27(4):768–781.
- Lall GS, Revell VL, Momiji H, et al. Distinct contributions of rod, cone, and melanopsin photoreceptors to encoding irradiance. *Neuron*. 2010;66(3):417–428.
- Lucas RJ, Lall GS, Allen AE, Brown TM. How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog Brain Res*. 2012;199:1–18.
- Barnard AR, Hattar S, Hankins MW, Lucas RJ. Melanopsin regulates visual processing in the mouse retina. *Curr Biol*. 2006;16(4):389–395.
- Allen AE, Storch R, Martial FP, et al. Melanopsin-driven light adaptation in mouse vision. *Curr Biol*. 2014;24(21):2481–2490.
- Milosavljevic N, Allen AE, Cehajic-Kapetanovic J, Lucas RJ. Chemo-genetic activation of ipRGCs drives changes in dark-adapted (scotopic) electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(14):6305.
- Dkhissi-Benyahya O, Coutanson C, Knoblauch K, et al. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(18):3435–3447.
- Wong KY, Dunn FA, Graham DM, Berson DM. Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J Physiol*. 2007;582(pt 1):279–296.
- Zhang D-Q, Belenky MA, Sollars PJ, Pickard GE, McMahon DG. Melanopsin mediates retrograde visual signaling in the retina. *PLoS One*. 2012;7(8):e42647.
- Reifler AN, Chervenak AP, Dolikian ME, et al. All spiking, sustained ON displaced amacrine cells receive gap-junction input from melanopsin ganglion cells. *Curr Biol*. 2015;25(21):2763–2773.

42. Prigge CL, Yeh P-T, Liou N-F, et al. M1 ipRGCs influence visual function through retrograde signaling in the retina. *J Neurosci*. 2016;36(27):7184–7197.
43. Zhang D-QQ, Wong KY, Sollars PJ, Berson DM, Pickard GE, McMahon DG. Intraretinal signaling by ganglion cell photoreceptors to dopaminergic amacrine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14181–14186.
44. Buhr ED, Van Gelder RN. Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8625–8630.
45. Buhr ED, Yue WWS, Ren X, et al. Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(42):13093–13098.
46. Kojima D, Mori S, Torii M, Wada A, Morishita R, Fukada Y. UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PLoS One*. 2011;6(10):e26388.
47. Yamashita T, Ono K, Ohuchi H, et al. Evolution of mammalian Opn5 as a specialized UV-absorbing pigment by a single amino acid mutation. *J Biol Chem*. 2014;289(7):3991–4000.
48. Tarttelin EE, Bellingham J, Hankins MW, Foster RG, Lucas RJ. Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue. *FEBS Lett*. 2003;554(3):410–416.
49. Hughes S, Rodgers J, Hickey D, Foster RG, Peirson SN, Hankins MW. Characterisation of light responses in the retina of mice lacking principle components of rod, cone and melanopsin phototransduction signalling pathways. *Sci Rep*. 2016;6:28086.
50. McMahon DG, Iuvone M, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2014;39:58–76.
51. Peirson SN, Butler JN, Duffield GE, Takher S, Sharma P, Foster RG. Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(4):800–807.
52. Ruan G-X, Zhang D-QQ, Zhou T-R, Yamazaki S, McMahon DG. Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(25):9703–9708.
53. Liu X, Zhang Z, Ribelayga CP. Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS One*. 2012;7(11):e50602.
54. Buonfiglio DC, Malan A, Sandu C, et al. Rat retina shows robust circadian expression of clock and clock output genes in explant culture. *Mol Vis*. 2014;20:742–752.
55. Lahouaoui H, Coutanson C, Cooper HM, Bennis M, Dkhissi-Benyahya O. Diabetic retinopathy alters light-induced clock gene expression and dopamine levels in the mouse retina. *Mol Vis*. 2016;22:959.
56. Cahill GM, Besharse JC. Circadian clock functions localized in xenopus retinal photoreceptors. *Neuron*. 1993;10(4):573–577.
57. Zhu H, LaRue S, Whiteley A, Steeves TD, Takahashi JS, Green CB. The *Xenopus* clock gene is constitutively expressed in retinal photoreceptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;75(2):303–308.
58. Zhu H, Green CB. Three cryptochromes are rhythmically expressed in *Xenopus laevis* retinal photoreceptors. *Mol Vis*. 2001;7:210–215.
59. Doyle SE, Grace MS, McIvor W, Menaker M. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci*. 2002;19(5):593–601.
60. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, et al. Role of the clock protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998;280:1564–1568.
61. Namihira M, Honma S, Abe H, Masubuchi S, Ikeda M, Honma K. Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina. *Neuroreport*. 2001;12(3):471–475.
62. Dinet V, Ansari N, Torres-Farfan C, Korf H-WW. Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J Pineal Res*. 2007;42(1):83–91.
63. Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, et al. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene *Period 1* in the mouse retina. *J Neurosci*. 2003;23(20):7670–7676.
64. Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J*. 2007;21(14):3866–3871.
65. Schneider K, Tippmann S, Spiwox-Becker I, et al. Unique clockwork in photoreceptor of rat. *J Neurochem*. 2010;115(3):585–594.
66. Sandu C, Hicks D, Felder-Schmittbuhl M-P. Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur J Neurosci*. 2011;34(3):507–516.
67. Miyamoto Y, Sancar A. Vitamin B2-based blue light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6097–6102.
68. Dorenbos R, Contini M, Hirasawa H, Gustincich S, Raviola E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis Neurosci*. 2007;24(4):573–580.
69. Garcia-Fernández JM, Álvarez-López C, Cernuda-Cernuda R. Cytoplasmic localization of mPER1 clock protein isoforms in the mouse retina. *Neurosci Lett*. 2007;419(1):55–58.
70. Xu L, Ruan G, Dai H, Liu AC, Penn J, McMahon DG. Mammalian retinal Müller cells have circadian clock function. *Mol Vis*. 2016;22:275–283.
71. Dubocovich ML. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*. 1983;306(5945):782–784.
72. Fujieda H, Hamadanizadeh S, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience*. 1999;93(2):793–799.
73. Nguyen-Legros J, Chanut E, Versaux-Botteri C, Simon A, Trouvin J-H. Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D2-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J Neurochem*. 1996;67(6):2514–2520.
74. Tosini G, Dirden JC. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci Lett*. 2000;286(2):119–122.
75. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res*. 2005;24(4):433–456.
76. Danilenko KV, Plisov IL, Cooper HM, Wirz-Justice A, Hébert M. Human cone light sensitivity and melatonin rhythms following 24-hour continuous illumination. *Chronobiol Int*. 2011;28(5):407–414.
77. Hwang CK, Chaurasia SS, Jackson CR, Chan GC-K, Storm DR, Iuvone PM. Circadian rhythm of contrast sensitivity is regulated by a dopamine-neuronal pas-domain protein 2-adenylyl cyclase 1 signaling pathway in retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 2013;33(38):14989–14997.
78. Ribelayga CP, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron*. 2008;59(5):790–801.
79. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):16219–16224.
80. Mustafi D, Kevany BM, Genoud C, Bai X, Palczewski K. Photoreceptor phagocytosis is mediated by phosphoinositide signaling. *FASEB J*. 2013;27(11):4585–4595.
81. Kunst S, Wolloscheck T, Höltér P, et al. Transcriptional analysis of rat photoreceptor cells reveals daily regulation of genes important for visual signaling and light damage susceptibility. *J Neurochem*. 2013;124(6):757–769.
82. Hamm HE, Menaker M. Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(8):4998–5002.
83. Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM. Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol*. 1980;87(1):89–93.
84. Sakamoto K, Liu C, Tosini G. Classical photoreceptors regulate melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J Neurosci*. 2004;24(43):9693–9697.

85. Giancesini C, Clesse D, Tosini G, Hicks D, Laurent V. Unique regulation of the melatonin synthetic pathway in the retina of diurnal female *Arvicantthis ansorgei* (Rodentia). *Endocrinology*. 2015;156(9):3292–3308.
86. Tosini G, Baba K, Hwang CK, Iuvone PM. Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp Eye Res*. 2012;103:82–89.
87. Tosini G, Fukuhara C. The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):119–126.
88. Fukuhara C, Liu C, Ivanova TN, et al. Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J Neurosci*. 2004;24(8):1803–1811.
89. Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Kutty RK, Wiggert B. Circadian-dependent retinal light damage in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(12):3694–3701.
90. Baba K, Pozdeyev N, Mazzoni F, et al. Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(35):15043–15048.
91. Yang G, Chen L, Grant GR, et al. Timing of expression of the core clock gene *Bmal1* influences its effects on aging and survival. *Sci Transl Med*. 2016;8(324):324ra16.
92. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in *BMAL1*, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*. 2006;20(14):1868–1873.
93. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, et al. Disruption of the clock components *CLOCK* and *BMAL1* leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627–631.
94. Kuriyama K, Sasahara K, Kudo T, Shibata S. Daily injection of insulin attenuated impairment of liver circadian clock oscillation in the streptozotocin-treated diabetic mouse. *FEBS Lett*. 2004;572(1–3):206–210.
95. Busik JV, Tikhonenko M, Bhatwadekar AD, et al. Diabetic retinopathy is associated with bone marrow neuropathy and a depressed peripheral clock. *J Exp Med*. 2009;206(13):2897–2906.
96. Wang Q, Tikhonenko M, Bozack SN, et al. Changes in the daily rhythm of lipid metabolism in the diabetic retina. *PLoS One*. 2014;9(4):e95028.
97. Nishimura C, Kuriyama K. Alterations in the retinal dopaminergic neuronal system in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Neurochem*. 1985;45(2):448–455.
98. Seki M, Tanaka T, Nawa H, et al. Involvement of brain-derived neurotrophic factor in early retinal neuropathy of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes*. 2004;53(9):2412–2419.
99. Gastinger MJ, Singh RSJ, Barber AJ. Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and *Ins2^{Akita}*-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(7):3143.
100. Aung MH, Park HN, Han MK, et al. Dopamine deficiency contributes to early visual dysfunction in a rodent model of type 1 diabetes. *J Neurosci*. 2014;34(3):726–736.
101. Szabadfi K, Szabo A, Kiss P, et al. PACAP promotes neuron survival in early experimental diabetic retinopathy. *Neurochem Int*. 2014;64:84–91.
102. Kirwin SJ, Kanaly ST, Hansen CR, Cairns BJ, Ren M, Edelman JL. Retinal gene expression and visually evoked behavior in diabetic long evans rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(10):7654.
103. Akimov NP, Rentería RC. Spatial frequency threshold and contrast sensitivity of an optomotor behavior are impaired in the *Ins2Akita* mouse model of diabetes. *Behav Brain Res*. 2012;226(2):601–605.
104. Lahouaoui H, Coutanson C, Cooper HM, Bennis M, Dkhisssi-Benyahya O. Clock genes and behavioral responses to light are altered in a mouse model of diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2014;9(7):e101584.
105. Feigl B, Zele AJ, Fader SM, Howes AN, Hughes CE, Jones KA. The post-illumination pupil response of melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in diabetes. *Acta Ophthalmol Scand*. 2012;90(3):230–234.
106. Drouyer E, Dkhisssi-Benyahya O, Chiquet C, et al. Glaucoma alters the circadian timing system. *PLoS One*. 2008;3(12):e3931.
107. Wang H, Lu Q, Wang N, Liu H, Zhang L, Zhan G. Loss of melanopsin-containing retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(11):1015–1019.
108. de Zavalía N, Plano SA, Fernandez DC, et al. Effect of experimental glaucoma on the non-image forming visual system. *J Neurochem*. 2011;117(5):904–914.
109. El-Danaf RN, Huberman AD. Characteristic patterns of dendritic remodeling in early-stage glaucoma: evidence from genetically identified retinal ganglion cell types. *J Neurosci*. 2015;35(6):2329–2343.
110. Adhikari P, Zele AJ, Thomas R, Feigl B. Quadrant field pupillometry detects melanopsin dysfunction in glaucoma suspects and early glaucoma. *Sci Rep*. 2016;6:33373.
111. Kelbsch C, Maeda F, Strasser T, et al. Pupillary responses driven by ipRGCs and classical photoreceptors are impaired in glaucoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2016;254(7):1361–1370.
112. Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al. Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res*. 2015;132:17–33.
113. Pérez-Rico C, de la Villa P, Arribas-Gómez I, Blanco R. Evaluation of functional integrity of the retinohypothalamic tract in advanced glaucoma using multifocal electroretinography and light-induced melatonin suppression. *Exp Eye Res*. 2010;91(5):578–583.
114. Feigl B, Mattes D, Thomas R, Zele AJ. Intrinsically photosensitive (melanopsin) retinal ganglion cell function in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4362.
115. Kankipati L, Girkin CA, Gamlin PD. The post-illumination pupil response is reduced in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(5):2287–2292.
116. Lanzani MF, de Zavalía N, Fontana H, Sarmiento MIK, Golombek D, Rosenstein RE. Alterations of locomotor activity rhythm and sleep parameters in patients with advanced glaucoma. *Chronobiol Int*. 2012;29(7):911–919.
117. Münch M, Léon L, Collomb S, Kawasaki A. Comparison of acute non-visual bright light responses in patients with optic nerve disease, glaucoma and healthy controls. *Sci Rep*. 2015;5:15185.
118. Obara EA, Hannibal J, Heegaard S, Fahrenkrug J. Loss of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in severely staged glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57(11):4661.
119. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007;10(2):77–88.
120. Rao S, Chun C, Fan J, et al. A direct and melanopsin-dependent fetal light response regulates mouse eye development. *Nature*. 2013;494(7436):243–246.
121. La Morgia C, Ross-Cisneros FN, Koronyo Y, et al. Melanopsin retinal ganglion cell loss in Alzheimer disease. *Ann Neurol*. 2016;79(1):90–109.
122. Ouk K, Hughes S, Potheary CA, Peirson SN, Jennifer Morton A. Attenuated pupillary light responses and downregulation of opsin expression parallel decline in circadian disruption in two different mouse models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*. 2016;25(24):ddw359.
123. Lavoie J, Maziade M, Hébert M. The brain through the retina: the flash electroretinogram as a tool to investigate psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014;48:129–134.
124. Servier Medical Art [homepage on the Internet]. Available from: <http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>. Accessed January 1, 2017.
125. Li H, Zhang Z, Blackburn MR, Wang SW, Ribelayga CP, O'Brien J. Adenosine and dopamine receptors coregulate photoreceptor coupling via gap junction phosphorylation in mouse retina. *J Neurosci*. 2013;33(7):3135–3150.
126. Roseboom PH, Coon SL, Baler R, McCune SK, Weller JL, Klein DC. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology*. 1996;137(7):3033–3045.

127. Sakamoto K, Ishida N. Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett*. 1998;245(2):113–116.
128. Bai L, Zimmer S, Rickes O, et al. Daily oscillation of gene expression in the retina is phase-advanced with respect to the pineal gland. *Brain Res*. 2008;1203:89–96.
129. Bobu C, Sandu C, Laurent V, Felder-Schmittbuhl M-P, Hicks D. Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the Arvicantha ansorgei retina. *Mol Vis*. 2013;19:1060–1073.
130. Vancura P, Wolloscheck T, Baba K, Tosini G, Iuvone PM, Spessert R. Circadian and Dopaminergic Regulation of Fatty Acid Oxidation Pathway Genes in Retina and Photoreceptor Cells. Bartell PA, ed. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164665.
131. Jackson CR, Chaurasia SS, Hwang CK, Iuvone PM. Dopamine D₄ receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina. *Eur J Neurosci*. 2011;34(1):57–64.
132. Katti C, Butler R, Sekaran S. Diurnal and circadian regulation of connexin 36 transcript and protein in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(1):821–829.
133. de Zavalía N, Fernandez DC, Sande PH, et al. Circadian variations of prostaglandin E₂ and F₂ α release in the golden hamster retina. *J Neurochem*. 2010;112(4):972–979.
134. Yan Y, Salazar TE, Dominguez JM, et al. Dicer expression exhibits a tissue-specific diurnal pattern that is lost during aging and in diabetes. *PLoS One*. 2013;8(11):e80029.
135. Klitten LL, Rath MF, Coon SL, Kim J-S, Klein DC, Møller M. Localization and regulation of dopamine receptor D₄ expression in the adult and developing rat retina. *Exp Eye Res*. 2008;87(5):471–477.
136. Humphries A, Carter DA. Circadian dependency of nocturnal immediate-early protein induction in rat retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(2):551–556.
137. Man P-S, Evans T, Carter DA. Rhythmic expression of an egr-1 transgene in rats distinguishes two populations of photoreceptor cells in the retinal outer nuclear layer. *Mol Vis*. 2008;14:1176–1186.
138. Kunst S, Wolloscheck T, Grether M, Trunsch P, Wolfrum U, Spessert R. Photoreceptor cells display a daily rhythm in the orphan receptor Esrr β . *Mol Vis*. 2015;21:173–184.
139. Yoshida K, Kawamura K, Imaki J. Differential expression of c-fos mRNA in rat retinal cells: Regulation by light/dark cycle. *Neuron*. 1993;10(6):1049–1054.
140. Kamphuis W, Cailotto C, Dijk F, Bergen A, Buijs RM. Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(1):18–26.
141. Brann M, Cohen L. Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina. *Science* 1987;235(4788):585–587.
142. Gauer F, Craft CM. Circadian regulation of hydroxyindole-O-methyltransferase mRNA levels in rat pineal and retina. *Brain Res*. 1996;737(1):99–109.
143. Hölter P, Kunst S, Wolloscheck T, et al. The retinal clock drives the expression of Kcnn2, a channel essential for visual function and cone survival. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2012;53(11):6947.
144. Law A-L, Parinot C, Chatagnon J, et al. Cleavage of Mer tyrosine kinase (MerTK) from the cell surface contributes to the regulation of retinal phagocytosis. *J Biol Chem*. 2015;290(8):4941–4952.
145. Wang Y, Osterbur DL, Megaw PL, et al. Rhythmic expression of Nocturnin mRNA in multiple tissues of the mouse. *BMC Dev Biol*. 2001;1(1):9.
146. Kunst S, Wolloscheck T, Kelleher DK, et al. Pgc-1 α and Nr4a1 Are Target Genes of Circadian Melatonin and Dopamine Release in Murine Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(10):6084–6094.
147. Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Iuvone M, Tosini G. Intraocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Mol Vis*. 2006;12:117–124.
148. von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG. Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;72(1):108–114.
149. Mathes A, Engel L, Holthues H, Wolloscheck T, Spessert R. Daily Profile in Melanopsin Transcripts Depends on Seasonal Lighting Conditions in the Rat Retina. *J Neuroendocrinol*. 2007;19(12):952–957.
150. Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Pozdnyev N V, Iuvone PM, Tosini G. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur J Neurosci*. 2005;22(12):3129–3136.
151. Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp Eye Res*. 2013;106:55–63.
152. Wolloscheck T, Spiwoks-Becker I, Rickes O, Holthues H, Spessert R. Phosphodiesterase 10A: Abundance and circadian regulation in the retina and photoreceptor of the rat. *Brain Res*. 2011;1376:42–50.
153. Wiechmann AF, Sinacola MK. Diurnal expression of recoverin in the rat retina. *Mol Brain Res*. 1997;45(2):321–324.
154. Ban N, Ozawa Y, Inaba T, et al. Light–dark condition regulates sirtuin mRNA levels in the retina. *Exp Gerontol*. 2013;48(11):1212–1217.
155. Liang J, Wessel JH, Iuvone PM, Tosini G, Fukuhara C. Diurnal rhythms of tryptophan hydroxylase 1 and 2 mRNA expression in the rat retina. *Neuroreport*. 2004;15(9):1497–1500.
156. Scoma HD, Humby M, Yadav G, Zhang Q, Fogerty J, Besharse JC. The de-ubiquitinating enzyme, USP2, is associated with the circadian clockwork and regulates its sensitivity to light. *PLoS One*. 2011;6(9):e25382.

ChronoPhysiology and Therapy

Publish your work in this journal

ChronoPhysiology and Therapy is an international, peer-reviewed, open access journal focusing on research into the cyclic variations and rhythmicity in physiological processes in the body and the research and development and optimal timing of administration of therapeutic targets to achieve improved outcomes and quality of life for the patient. The

Submit your manuscript here: <https://www.dovepress.com/chronophysiology-and-therapy-journal>

Dovepress

manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Annexe 2 : *Curriculum vitae*

Current situation

2014 - 2018

Ph.D in Neurosciences and Cognition, University Claude Bernard Lyon 1
Ministerial funding for 3 years (rank 5/25)
Subject : Photic entrainment of retinal clocks: photoreceptors and molecular mechanisms involved
Thesis supervisor: O. Dkhissi-Benyahya, team "Chronobiology and Affective Disorders" Stem Cell and Brain Research Institute, INSERM U1208, Bron

Teaching

2014 - 2017

Cellular Biology: Bachelor "Life and Earth Sciences", years 1 and 3, University Claude Bernard Lyon 1
Bibliography: Bachelor "Sciences, Technologies, Health", year 1, University Claude Bernard Lyon 1

Training

2015

Animal Experimentation (level 1/b)
University Claude Bernard Lyon 1

January - June 2014

Master 2 "Cellular and Integrated Neurosciences"
Study of the role of cones on the endogenous retinal clock
Supervisor: M-P Felder-Schmittbuhl, Team "Rhythm, life and death of the retina"
Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg

2013

Voluntary Internship (5 weeks)
Quantification and imaging of clock genes in the retina
Supervisor: M-P Felder-Schmittbuhl, Team "Rhythm, life and death of the retina"
Institute for Cellular and Integrative Neurosciences, Strasbourg

Awards

French Society of Chronobiology (2016)

Travel award for 45th meeting of the French Society of Chronobiology

Wild Clocks Meeting (2015)

Travel award and additional funding to attend the meeting

Diploma

2012 - 2014

Master's M1 and M2 "Cellular and Integrative Neurosciences"
M1: rank 4/13; M2: rank 5/19
Life Science Faculty, University of Strasbourg (France)

2008 - 2011

Bachelor (Licence) "Cellular Biology and Physiology"
Life Science Faculty, University of Strasbourg (France)

Skills

Animal experimentation

Genotyping, tissue sampling, perfusion, locomotor activity

Cellular biology

Tissue explants culture, *in vitro* gene imaging (bioluminescence)

Molecular biology

DNA/RNA extraction, PCR, RT-qPCR, luciferase activity assay, laser microdissection

Histology

Immunostaining, Cresyl violet

Software

Behaviour: Clocklab
Gene imaging: Lumicycle Analysis
Statistic: Statistica, Sigmaplot, Minitab, R, Origin
Office, LaTeX

Languages

French: mother language
English: scientific
Deutsch: basis

Student Trainees

3 Neurosciences Master Students Explant culture, molecular biology and immunohistochemistry

Membership of Scientific Societies

Since 2017 **European Biological Rhythm Society**
Since 2016 **Society for Research on Biological Rhythms**
Since 2015 **French Society of Chronobiology**

Others activities

2016 - 2017 **Student representing at the laboratory council of Stem Cell and Brain Research Institute**

Publications

Calligaro H., Coutanson C., Najjar RP., Mazzaro N., Cooper HM., Haddjeri N., Felder-Schmittbuhl M-P. and Dkhissi-Benyahya O. *Rods are required for the light-induced phase shift of the retinal clock in mammals* (to be submitted to Plos Biol. In march)
Calligaro H., Coutanson C. and Dkhissi-Benyahya O. *Light induction of clock genes in retinal oscillators* (in preparation)
Felder-Schmittbuhl M-P., **Calligaro H.** and Dkhissi-Benyahya O. *The retinal clock in mammals: role in health and disease*. Chronophysiol and Ther. 2017;Volume 7:33-45

Communications

Calligaro H. *Rod photoreceptors are required for the light response of the retinal clock in mammals*. Oral presentation at the Scientific Meeting of Doctoral School Neuroscience et Cognition, Lyon, France. 2017
Calligaro H., Coutanson C., Najjar RP., Felder-Schmittbuhl M-P. and Dkhissi-Benyahya O. *Rod photoreceptors are required for the light response of the retinal clock in mammals*. Poster presentation at XV. Congress of European Biological Rhythms Society, Amsterdam, Netherlands. 2017
Calligaro H. *Dissecting the role of photoreceptors in the light response of the retinal clock in mammals*. Oral presentation at the Cortex Student Club, Lyon, France. 2017
Calligaro H., Coutanson C., Najjar RP., Felder-Schmittbuhl M-P. and Dkhissi-Benyahya O. *Rôle de la mélanopsine dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne des mammifères*. Poster presentation at the 45th Meeting of the French Society of Chronobiology, Strasbourg, France. 2016
Kinane C., Louati S., Coutanson C., **Calligaro H.**, Bennis M. and Dkhissi-Benyahya O. *Ontogénèse de l'horloge rétinienne des mammifères*. Poster presentation at the 45th Meeting of the French Society of Chronobiology, Strasbourg, France. 2016
Calligaro H. *Role of melanopsin in the light response of the mammalian retinal clock*. Oral presentation at the Sleep and Conciousness Workshop, Lyon Neuroscience Research Center, Lyon, France. 2016
Calligaro H., Coutanson C., Najjar RP., Felder-Schmittbuhl M-P. and Dkhissi-Benyahya O. *A new standardized method to assess the endogenous and light-response of the retinal clock in mammals*. Poster presentation at the 15th Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, Florida, USA. 2016
Calligaro H., Coutanson C., Najjar RP., Felder-Schmittbuhl M-P. and Dkhissi-Benyahya O. *A new standardized method to assess the endogenous and light-response of the retinal clock in mammals*. Poster presentation at the Scientific Meeting of Doctoral School Neuroscience et Cognition, Lyon, France. 2016
Calligaro H., Coutanson C., Cooper H.M., Felder-Schmittbuhl M-P and Dkhissi-Benyahya O. *Melanopsin is required for mammalian photoreceptor clock function: the potential role of dopamine*. Poster presentation at the Wild Clocks Meeting, Royal University of Groningen, Texel, Netherland. 2015

References

Dr. Ouria Dkhissi-Benyahya (ouria.benyahya@inserm.fr) researcher on the Chronobiology and Affective Disorders team at the Stem cell and Brain Research Institute. PhD supervisor

RÉPONSE À LA LUMIÈRE DES HORLOGES RÉTINIENNES : PHOTORÉCEPTEURS ET MÉCANISMES MOLÉCULAIRES MIS EN JEU

Résumé

La rétine contient une horloge endogène régulant différentes fonctions rythmiques et participae à la synchronisation de l'horloge centrale du SCN au temps géophysique. Cette synchronisation met en jeu les bâtonnets, les cônes et les cellules à mélanopsine. Contrairement au SCN, le rôle des photorécepteurs dans la réponse à la lumière de l'horloge rétinienne est controversé. Nos travaux et ceux d'autres équipes soutiennent un rôle de la mélanopsine alors que 2 études récentes suggèrent que seule la neuropsine est impliquée. Mon projet vise à disséquer le rôle des différents photorécepteurs par des approches *in vitro/ex vivo* chez des souris sauvages, *Per2^{Luc}* et/ou déficientes en photorécepteurs.

Des lumières monochromatiques ciblant différents photorécepteurs ont été appliquées à des explants rétiniens en culture de souris *Per2^{Luc}* ou déficientes en mélanopsine, cônes MW ou bâtonnets. Nos résultats montrent un rôle des bâtonnets dans le décalage de phase de l'horloge rétinienne par la lumière dans le spectre visible et une contribution additionnelle des cônes SW et/ou de la neuropsine dans l'UV. L'horloge rétinienne étant composée de plusieurs horloges et afin de déterminer leur réponse à la lumière, l'induction photique des gènes *Per1-Per2* et *C-Fos* a été analysée dans les couches rétiniennes isolées chez des souris sauvages et déficientes en photorécepteurs. Chez les souris sans mélanopsine ou cônes MW, l'induction de *Per1-Per2* est abolie dans toutes les couches, suggérant un rôle de ces photorécepteurs.

En résumé, nos résultats indiquent un rôle différentiel des photorécepteurs en fonction de la réponse mesurée (décalage de phase de *PER2::Luc* et induction des gènes de l'horloge par la lumière).

Mots clés : rétine ; horloge circadienne ; photoréception ; lumière ; bâtonnet

LIGHT RESPONSE OF THE RETINAL CLOCKS: PHOTORECEPTORS AND MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED

Abstract

The mammalian retina contains an endogenous pacemaker regulating retinal physiology and participate to the sybchronization of the temporal phase of the central clock of the SCN to environmental time. This entrainment process involves rods, cones and melanopsin-containing retinal ganglion cells. In contrast with the SCN, the role of these photoreceptors in the light response of the retinal clock is still controversial. While recent studies suggest that none of them is involved in light response of the retinal clock, others support a role for melanopsin. My project aims to dissect the role of these different photoreceptors in wild-type, *Per2^{Luc}* and/or photoreceptor-deficient mice using *in vitro/ex vivo* approaches.

Monochromatic lights targeting different photoreceptors were applied to retinal explants of *Per2^{Luc}* or melanopsin-, MW cones- or rods-deficient mice. Our results demonstrate that rods are required for the light-induced phase shift of the retinal clock in the visible spectrum and suggest an additional contribution of SW cones and/or neuropsin in the UV. As the retinal clock is composed of several clocks and in order to determine their response to light, the photic induction of *Per1-Per2* and *C-Fos* genes was analyzed in isolated retinal layers from wild-type and photoreceptor-deficient mice. In mice without melanopsin or MW cones, *Per1-Per2* induction by light is abolished in all layers, suggesting a role for these photoreceptors.

In summary, our results propose a differential contribution of the retinal photoreceptors as a function of the response recorded (phase shift of *PER2::Luc* or induction of clock genes by light).

Keywords: retina; circadian clock; photoreception; light ; rod

Institut Cellule Souche et Cerveau, INSERM U1208

18 avenue Doyen Lépine – 69675 Bron cedex - France –