



HAL
open science

Caractérisation moléculaire et pharmacologique de l'horloge circadienne située dans l'habénula

Nora Salaberry

► **To cite this version:**

Nora Salaberry. Caractérisation moléculaire et pharmacologique de l'horloge circadienne située dans l'habénula. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ031 . tel-02917946

HAL Id: tel-02917946

<https://theses.hal.science/tel-02917946>

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

(INCI – CNRS 3212)

THÈSE présentée par :

Nora SALABERRY

soutenue le : **04 Juin 2018**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie / Neurosciences

**Caractérisation moléculaire et pharmacologique
de l'horloge circadienne située dans l'habénula**

THÈSE dirigée par :

Dr MENDOZA Jorge

Chargé de recherche, INCI, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr DKHISSI-BENYAHYA Ouria

Chargé de recherche, INSERM U1208 - Stem cell and Brain
Research Institute (SBRI), Bron

Dr FRANCOIS-BELLAN Anne-Marie

Chargé de recherche, Institut de Neurophysiopathologie,
Aix-Marseille Université

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr LELIEVRE Vincent

Professeur, INCI, Université de Strasbourg

Dr FELDER-SCHMITTBUHL Marie-Paule

Directeur de recherche, INCI, Strasbourg

Pr ALBRECHT Urs

Professeur, Université de Fribourg (Suisse)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour la discussion enrichissante lors de ma soutenance. Merci aux Dr Ouria Dkhissi-Benyahya, Dr Anne-Marie François-Bellan, Pr Vincent Lelièvre, Pr Urs Albrecht, Dr Marie-Paule Felder-Schmittbuhl mais également au Dr Lucas Lecourtier qui à cause de péripéties administratives n'a pu être un membre officiel, l'est tout autant que les autres pour Jorge et moi.

Malgré un enseignement de master pas des plus optimal sur Strasbourg, je ne regrette absolument pas d'avoir quitté Bordeaux, ce qui m'a permis de rencontrer celui qui fut mon maître de stage, puis directeur de thèse. Je suis très fière d'avoir travaillé à tes côtés. C'est rare de pouvoir dire qu'on travaille avec son chef et non pour. Que nous étions collègues avec un même but : décrypter les mystères de l'habénula. J'ai beaucoup apprécié ton optimisme : à trouver des résultats exaltants là où je ne voyais qu'un tas de données inutilisables. Je te remercie sincèrement pour m'avoir donné toute la liberté et l'autonomie de réaliser mes idées et de créer mes propres expériences qu'elles aient abouties ou non. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir trouvé des financements après mon pour pouvoir continuer en thèse. Tout n'a pas été rose. La thèse m'a éreinté à la fin. Et on s'est « un peu » pris la tête mais je suis contente que cela n'est pas entaché notre relation. Un jour, tu m'as demandé si tu étais un bon directeur. Sans hésiter je te dirai oui ! Rien que pour t'avoir remis en question. Peu le font. Ta porte était toujours ouverte pour nous, mais aussi pour les étudiants, chercheurs ou personnels d'autres équipes. J'ai beaucoup apprécié nos échanges qu'ils soient scientifiques (les expériences en cours, celles avenir, celles des publis...) ou non, que tu prennes des nouvelles de mes collègues du NBR, de l'INCI ou de ma promo de master. Cette liberté d'échange m'a été beaucoup jalosé par d'autres étudiants.

Merci également à David, Hervé et Marie-Paule qui ont été les premiers à m'initier aux rythmes, à l'habénula et à la bioluminescence. Finalement, pour moi, mon avenir s'est joué lorsque les groupes de projet tutoré ont été formés. Merci de m'avoir donné l'envie d'en savoir plus !

Merci à l'équipe rétine pour les discussions et les différents points de vue abordés en réunion : Marie-Paule, David, Michael, Frank, Virginie, Viviane, Cristina, Nadia, Bastien, Pépette, Aurea, Mili, Ana, Schumet, Nemanja, Udit, Guillaume (on est plutôt nombreux...).

Merci au chronobiotron pour le soin des animaux et de répondre aux mieux à mes demandes : Nico, Olivier, Bruno, Noémie, Sophie. Merci à Dom pour tes conseils techniques pour la chirurgie et plus généralement pour nos discussions tardives, un des avantages d'être proche de ton bureau.

Un énorme merci à mes collègues de bureau qui ont rendu la vie de thésard plus agréable : Aurea, Mili, Nandito, vous avez continué votre route à Amsterdam, mais heureusement d'autres sont arrivés pour combler le vide. Merci à choupi (aka Bastien) d'avoir toujours veiller à ce que la machine à café soit remplie ! Et de m'accompagner dans mes pérégrinations pour aller manger, voire de m'attendre après des heures de manip et aller manger à 16h de l'après-midi ! Je te souhaite de te débarrasser de ce trou noir à emmerdes qui te collent à la peau depuis si longtemps... Merci à Guillauminou pour m'avoir assisté à la caméra mais également lors de ma soirée d'impression fatidique où rien ne marche jamais comme prévu. Merci à Hélène pour ton temps et ton énergie durant tes stages pour

faire en sorte que mes expériences marchent. Merci à Pépette (aka notre Perrine du 1^{er}) pour les bons moments comme les mauvais, pour nous communiquer ta bonne humeur et ta force de travail. Je suis tellement contente que l'on ait fini nos contrats en même temps ! Merci à Seb d'avoir été là, surtout pendant la rédaction, avec qui j'ai pu râler en bonne française tout ce que je pouvais sur l'école doc, la rédaction, la soutenance... Et à toute la jeunesse du 1^{er} (il faut donc ajouter Clarisse, Eleni, Nadia, Marine) qui ont su mettre un peu de folie, à créer la guerre des bureaux avec des blagues plus débiles les unes que les autres, à mettre en marche le mouvement des licornes et du photo-montage dégueu. Et à tous ceux que j'ai oublié.

Merci à Hassan de nous avoir fait découvrir son pays avec la joyeuse bande (Seb, Pépette et Benoit). Ce fut un moment de détente appréciée en fin de rédaction et je conseillerai de faire un break avant le rendu juste pour avoir le recul nécessaire aux derniers détails, même si cela vous semble impossible. 24h avant le départ, je voulais encore laisser tomber le voyage pour finir mes figures mais finalement je ne le regrette pas car je suis revenue tellement à block que j'ai tout fini dans le temps imparti.

Merci à Edith, Catherine et Hanan pour m'avoir aidé dans divers domaines (surtout en master) et d'avoir été des modèles de persévérance.

Merci aussi aux autres étages, et je m'excuse par avance de ne pas faire de remerciements personnalisés à chacun : à Kevin qui a essayé de m'initier à l'électrophys sans trop de succès, à Ludo, Fernando, à Alvaro pour son expertise du vibratome, à Taddy, Charlotte et Yunuen pour les conseils sur l'injection de virus et les pipettes, à Zazou, Baptiste, Léa, Aline, Ben, Alessandro, Claire qui m'ont permis de mettre un pied au 3^e, à Lou dont j'espère aura son bureau redécorer par d'autres que moi, à Sylvain pour ses blagues d'un goût douteux parfois mais qui remontent le moral, à Perrine I pour sa connaissances des virus, à Géraldine, Damien et Ivan. Merci à tous ceux qui m'ont filé un peu de ci ou un peu de ça, aux différents conseils prodigués pour réussir au mieux mes expériences. Merci à la mafia latino qui est maintenant remplacée par la mafia italienne. Et merci aux rencontres du vendredi qui permettent de découvrir de nouvelles têtes au sein de l'institut ou de mieux connaître celles que l'on voit tous les jours. J'espère qu'elles perdureront.

Merci à Laurent de m'avoir permis de me replonger dans ma passion du théâtre. Merci aux comédiens des différentes pièces (même si des fois, l'envie d'en étrangler quelques uns s'est fait sentir). J'ai été ravie de vous avoir initié cet art que tout le monde peut aborder avec du travail et de la volonté. Laurent, j'espère que ton imagination et ta plume trouveront toujours les ressources nécessaires à une nouvelle œuvre de théâtre, de court métrage ou tout autre forme. J'aime à penser que grâce au théâtre des liens plus forts ce sont noués entre les étudiants en master et en thèse.

Merci aux amis hors labo : à Marion et nos soirées d'horreur, à Mylène (tu n'as pas besoin de remerciements spéciaux pour savoir que tu es spéciale), à Pantxo et Yannou qui m'ont agréablement surpris en assistant à ma soutenance, en la comprenant et en retenant même son titre (chapeau messieurs).

Merci à la famille pour votre soutien. Mais surtout, celui que je tiens à remercier plus que tout c'est Max sans qui j'aurai sûrement plus d'une fois défailli... qui m'a soutenu de bout en bout, qui m'a remonté le moral un nombre incalculable de fois, qui réussi à me destresser et à me faire retrouver le sourire. Merci t'être occupé de moi sachant que toi aussi tu traverses les galères de la thèse.

Communications & publications

Communications (Posters)

Salaberry NL, Hamm H, Mendoza J (2017) The habenula clock is set by catecholamines. **15ème Congrès de la société européenne des rythmes biologiques** (EBRS) à Amsterdam, Pays-Bas

Salaberry NL, Hamm H, Mendoza J (2016) Molecular and functional characterization of the circadian clock in the lateral habenula. **10^{ème} Forum de neurosciences de la FENS** (*Federation of European Neuroscience Societies*) à Copenhague, Danemark

Salaberry NL, Hamm H, Mendoza J (2016) Brain clocks: the circadian timing of the Lateral Habenula. A **l'école d'été ENCODS** (European Neuroscience Conference for Doctoral Students) à Helsingør, Danemark

Salaberry NL, Hamm H, Mendoza J (2016) Brain clocks: the circadian timing of the Lateral Habenula. **Symposium « Lateral Habenula under the Spotlight »** à Paris (75)

Salaberry NL, Hamm H, Mendoza J (2016) Brain clocks: the circadian timing of the Lateral Habenula. **Journées de l'École Doctorale Sciences & Vie** à Strasbourg (67)

Salaberry NL, Mendoza J (2015) Functional characterization of the circadian oscillator in the lateral habenula. A **l'école d'été « European Advanced School for Mouse Phenogenomics »** à Gøersdorf (67)

Communications (Orales)

Salaberry NL, Mendoza J (2017) Circadian timing of the Habenula. **Journée du Neuropôle** (Blitz étudiant) à Strasbourg (67)

Salaberry NL, Mendoza J (2016) Brain clocks: the circadian timing of the Habenula. **45^{ème} congrès de la société francophone de chronobiologie** (SFC) à Strasbourg (67)

Salaberry NL (2014, 2015, 2016) Bioluminescence (in rhythms). **Neurotech seminars** à Strasbourg (67)

Articles

Salaberry NL, Mendoza J (2018) Brain Tissue Culture of Per2::Luciferase Transgenic Mice for ex vivo Bioluminescence. *Bio protocol*. **Under revision**

Salaberry NL, Mendoza J (2018) The mouse circadian clock in the habenula is set by catecholamines. **In preparation**

Salaberry NL, Hamm H, Felder-Schmittbuhl MP, Mendoza J. (2018) A suprachiasmatic-independent circadian clock(s) in the habenula is affected by Per gene mutations and housing light conditions in mice. *Brain Struct. Funct.* **Under revision**

Salaberry NL, Mendoza J (2015) Insights into the Role of the Habenular Circadian Clock in Addiction. *Front Psychiatry* **6**:179. doi: 10.3389/fpsy.2015.00179

Articles (projets annexes)

Salaberry NL, Mateo M, Mendoza J (2017) The Clock Gene Rev-Erba Regulates Methamphetamine Actions on Circadian Timekeeping in the Mouse Brain. *Mol Neurobiol* **54**:5327–5334. doi: 10.1007/s12035-016-0076-z

Feillet CA, Bainier C, Mateo M, Blancas-Velazquez A, [Salaberry NL](#), Ripperger JA, Albrecht U, Mendoza J (2017) Rev-erb α modulates the hypothalamic orexinergic system to influence pleasurable feeding behaviour in mice. *Addict Biol* **22**:411–422. doi: 10.1111/adb.12339

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	I
COMMUNICATIONS & PUBLICATIONS	III
ABREVIATIONS	IX
INTRODUCTION.....	1
1. Rythmes circadiens.....	2
1 1. Petit lexique de chronobiologie	2
1 2. Une horloge dans la tête.....	3
2. Le SCN	3
2 1. Machine moléculaire	4
<i>a. Boucle principale : induction</i>	<i>4</i>
<i>b. Boucle secondaire : consolidation</i>	<i>5</i>
<i>c. Stabilisation et dégradation (autre mécanisme de régulation)</i>	<i>6</i>
<i>d. Décours temporel</i>	<i>7</i>
2 2. L'Horloge dans son ensemble	7
<i>a. Entrée de l'horloge</i>	<i>7</i>
<i>b. Différents oscillateurs à l'intérieur de l'horloge</i>	<i>8</i>
<i>c. Sortie de l'horloge.....</i>	<i>9</i>
3. Différentes horloges dans l'organisme	9
3 1. Horloge autonome	9
3 2. Horloge semi-autonome	11
3 3. Horloge "esclave".....	11
4. L'habénula, ses caractéristiques	12
4 1. Vue d'ensemble	12
4 2. Une structure hétérogène	12
<i>a. Morphologie</i>	<i>16</i>
<i>b. Activité électrique.....</i>	<i>16</i>
<i>c. Neurotransmission.....</i>	<i>17</i>
<i>d. Caractéristiques moléculaires.....</i>	<i>18</i>
<i>d i. Les monoamines.....</i>	<i>18</i>
<i>d ii. Autres neurotransmetteurs</i>	<i>21</i>
<i>d iii. Les neuropeptides & hormones</i>	<i>21</i>
<i>e. Corrélation entre espèces</i>	<i>22</i>
<i>f. Connectivité.....</i>	<i>22</i>
<i>f i. Connexion interne</i>	<i>22</i>
<i>f ii. Pré-synapses.....</i>	<i>23</i>
4 3. Afférences & efférences	23
<i>a. Système monoaminergique.....</i>	<i>23</i>
<i>a i. Innervation réciproque des noyaux dopaminergiques.....</i>	<i>23</i>
<i>a ii. Innervation réciproque des noyaux du Raphé (sérotonine).....</i>	<i>25</i>

a iii. Innervation par les noyaux noradrénergiques	26
a iv. Projection sur le noyau rostromédian du tegmentum (RMTg)	26
b. Système circadien	27
b i. Innervation directe ou indirecte par le SCN	27
b ii. Innervation par la rétine.....	27
c. Système métabolique.....	28
c i. Innervation réciproque de l'hypothalamus latérale.....	28
d. Autres afférences.....	28
e. Autres efférences.....	28
f. MHb.....	28
g. Macro-systèmes	29
4 1. Fonctions.....	29
a. Motivation & Aversion.....	31
b. Peur, stress et anxiété	32
c. Nociception	33
d. Mémoire	33
e. Intégration sensorielle	34
f. Réponse motrice.....	34
g. Implication dans d'autres comportements.....	34
h. Maladies psychiatriques	35
h i. La dépression.....	35
h ii. La schizophrénie	36
4 2. Propriétés circadiennes de l'habénula.....	36
a. Expression rythmique de gènes et de protéines horloges	36
b. Activité électrique & rythmique.....	36
c. Entrées potentielles de l'horloge.....	37
d. Sortie éventuelle de l'horloge	37
OBJECTIFS.....	39
MATERIELS & METHODES	41
1. Hybridation <i>in situ</i> – Article 1	41
1 1. Mutation <i>Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}</i>	41
1 2. Design expérimental	41
2. Bioluminescence – Article 1 & 2	42
2 1. Protéine de fusion PER2::LUC	42
2 2. Séparation rostro-caudale	42
2 3. Design expérimental	43
a. Article 1	43
b. Article 2	43
ARTICLE 1	45
ARTICLE 2	77

DISCUSSION.....	103
1. Considérations techniques	103
1 1. Bioluminescence	103
1 2. Hybridation vs. Culture tissulaire	103
1 3. Vibratome	104
2. Une horloge endogène dans l'habénula	104
2 1. Aspects moléculaires	104
2 2. Robustesse de l'horloge.....	105
2 3. Couplage des deux oscillateurs internes.....	105
3. Entrées multiples de l'horloge	106
3 1. Catécholamines.....	106
3 2. Neuropeptides	106
4. Intérêt d'une horloge dans l'habénula.....	107
4 1. Dysfonctionnement de l'horloge	108
5. Conclusion et perspectives	109
 ANNEXE	 115
 BIBLIOGRAPHIE	 129

Abréviations

A^{→B} : neurones du noyau A projetant sur ceux du noyau B

Aanat : arylalkylamine N-acétyltransférase

AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

AVP : arginine-vasopressine

Bmal1 : *brain and muscle arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNTL)-like 1*

BNST : *bed nucleus of the stria terminalis* / noyau du lit de la *stria terminalis*

CAMKII : Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante de type II

CKI : caséine kinase I

Clock : *circadian locomotor output cycles kaput*

CREB : *C-AMP Response Element-binding protein*

Cry : cryptochrome

CT : *Circadian time* / temps circadien

DBS : *Deep brain stimulation* / stimulation cérébrale profonde

DD : *dark dark* / obscurité constante

DRD1-5 : récepteur dopaminergique D1 à D5

DR : *dorsal Raphe nucleus* / noyau dorsal du Raphé

EPN : noyau entopédonculaire

GABA : *γ-aminobutyric acid* / acide γ-aminobutyrique

GABA_B R : récepteur GABAergique de type B

GAD : glutamate décarboxylase

GFP : *green fluorescent protein*

GLAST : *glutamate aspartate transporter* / transporteur du glutamate et de l'aspartate

GLT1 : *glutamate transporter 1* / transporteur glutamatergique 1

GRP : *gastrin release peptide*

Hbr : habénula rostrale

Hbc : habénula caudale

HCN : *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel*

ipRGC : *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells* / cellules ganglionnaires de la rétine particulièrement photosensible

IRM : imagerie à résonance magnétique

KCC2 : *potassium chloride cotransporter 2*

KI : knock-in

KO : knock-out

LD : *light dark* / lumière obscurité

LDTg : *laterodorsal tegmental nucleus* / noyau latérodorsal du tegmentum

LHb : *lateral habenula* / habénula latérale

LL : *light light* / lumière constante

Luc : luciférase

MDMA : 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine

mgluR : *metabotropic glutamate receptor* / récepteur métabotrope glutamatergique

MHb : *median habenula* / habénula médiane

MnR : *median Raphe nucleus* / noyau du Raphé médian

Nac : noyau accumbens

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NPAS2 : *neuronal PAS domain protein 2*

PAC : *PAS-associated C-terminal*

PACAP : *pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide*

PAG : *periaqueductal gray* / substance grise périaqueducule

PAS : Per-ARNT-Sim soit *Period – ArylHydrocarbon Receptor Nuclear Translocator – single-minded protein*

Per : période

PP : protéine phosphatase

PVN : *paraventricular nucleus* / noyau paraventriculaire

Rev-erb : *reverse viral erythroblastis oncogene product*

RGC : *retinal ganglion cells* / cellules ganglionnaires de la rétine

RMTg : *rostromedial tegmental nucleus* / noyau rostromédian du tegmentum

Ror : *retinoic acid-related orphan receptor*

SCN : *suprachiasmatic nucleus* / noyau suprachiasmatique

SNpc : Substance noire *pars compacta*

Vgat : *vesicular GABA transporter* / transporteur vésiculaire du GABA

Vglut : *vesicular glutamate transporter* / transporteur vésiculaire du glutamate

VIP : *vasoactive intestinal peptide* / peptide vasoactif intestinal

VMAT : *vesicular monoamine transporter* / transporteur vésiculaire des monoamines

VTA : *ventral tegmental area* / aire tegmentale ventrale

ZT : *zeitgeber time*

« On ne peut se soustraire à l'habénula comme on ne peut se soustraire au temps »

Jean-Christophe Cassel, soutenance de thèse de Victor Mathis (8 Décembre 2016)

Introduction

Sans montre au poignet, nous pouvons nous repérer dans le temps par un simple coup d’œil au dehors ou en nous fiant à notre estomac. Certains même arrivent à déterminer l’heure avec une telle précision, qu’on se demanderait s’ils n’ont pas une horloge dans leur tête.

Dès le XVIII^e siècle, des savants observèrent l’activité rythmique des plantes. La sensitive ou *mimosa pudica* referme ses feuilles lors d’un stimulus mécanique mais également durant la nuit, et ce même placée dans une cave sans possibilité de voir la lumière du jour (D’Ortous de Mairan, 1729). En 1751, Carl von Linné imagina une horloge végétale dans laquelle chacune des plantes fleurirait à un moment unique de la journée, permettant de déterminer l’heure en regardant les fleurs écloses du jardin (voir FIGURE 1; von Linné, 1751).

De l’organisme unicellulaire aux mammifères, tous les êtres vivants sur la Terre doivent s’adapter aux variations environnementales. Et à cette fin, les organismes ont su développer des mécanismes leur permettant de mesurer le temps qui passe (Bell-Pedersen et al., 2005). En effet notre corps est chaque jour le théâtre d’activités physiologiques qui se succèdent périodiquement : libération d’hormones (ex. mélatonine, cortisol, hormone de croissance), changement de température et d’activité (ex. cycle veille/sommeil), etc (voir FIGURE 2 ; Hastings et al., 2007). Ces exemples ont leur rythme synchronisé avec l’alternance du jour et de la nuit, sans que cela ne soit qu’une simple réponse passive aux changements environnementaux : en dehors de tout stimulus extérieur, ces cycles continueront d’une manière endogène (Hastings et al., 2007). Ces cycles d’environ 24h sont nommés rythmes circadiens¹ en référence au latin *circa* (proche) et *dies* (jour).

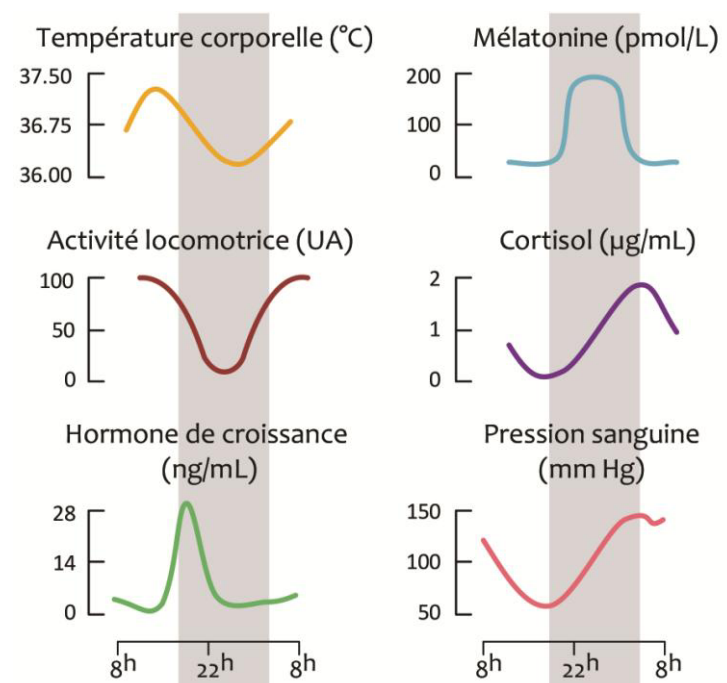


FIGURE 2 : DIFFERENTS RYTHMES CIRCADIENS CHEZ L’HUMAIN. L’activité locomotrice, la température corporelle, le niveau hormonal (mélatonine, hormone de croissance, cortisol), la pression sanguine sont des exemples de paramètres physiologiques et comportementaux présentant un rythme circadien. En effet, ces rythmes perdurent également en obscurité constante. La bande verticale grise représente la nuit. Adapté de Hastings et al., 2007.

¹ D’autres rythmes existent dans notre physiologie qui ne seront pas développés dans ce manuscrit : les rythmes ultradiens (période inférieure à 24h) et à l’inverse les rythmes infradiens (période supérieure à 24h).

1. Rythmes circadiens

1|1. Petit lexique de chronobiologie

Les jours et les nuits se succèdent. En laboratoire, on recrée cette alternance grâce à l'établissement d'un cycle dit LD¹ 12:12, soit 12h de lumière et 12h d'obscurité. En effet, la lumière est un puissant synchronisateur externe capable d'entraîner les sorties physiologiques ou comportementales de l'horloge (ex. l'activité locomotrice ; Pittendrigh, 1993; LeGates et al., 2014). Pour s'affranchir de l'heure astronomique, il a été convenu de se référer au temps par rapport à la lumière. De ce fait, ZT0 pour *Zeitgeber*² représente le début de la phase lumineuse. Mais la lumière n'est pas le seul synchronisateur. D'autres facteurs non photiques contribuent à l'ajustement de l'horloge biologique tels que la température ambiante, l'activité physique, la prise alimentaire ou la prise de drogue pour permettre à l'organisme d'être en phase avec l'environnement extérieur (Granados-Fuentes et al., 2004b; Honma & Honma, 2009; Challet & Mendoza, 2010; Schroder & Esser, 2013). On peut prendre le décalage horaire comme exemple de désynchronisation entre notre horloge interne et l'environnement (Reid & Abbott, 2015).

Lorsque l'on place un animal en condition constante (sans variation de luminosité ni de température : en DD³), la période de son activité locomotrice, également appelée τ , ne sera plus égale à 24h et présentera chaque jour un léger décalage (Pittendrigh & Daan, 1976). Ceci est également valable pour les autres sorties de l'horloge (voir partie 2|2.c). En condition constante, c'est l'expression de la période endogène de l'horloge qui prédomine, celle-ci est alors en libre cours (illustration en FIGURE 3). Puisque qu'il n'y a plus de repères temporels en condition constante, le temps est relativisé en fonction de l'activité locomotrice de l'individu. Par convention, CT0 pour *Circadian Time* représente le début de l'activité d'un animal diurne et CT12 celle d'un animal nocturne (Golombek & Rosenstein, 2010).

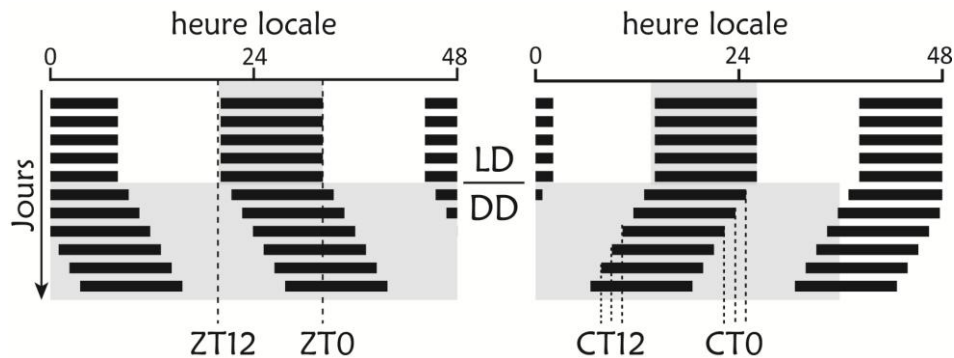


FIGURE 3 : ACTOGRAMME EN DOUBLE REPRESENTATION D'ANIMAUX NOCTURNES MAINTENUS EN LD PUIS EN DD. Un actogramme est la représentation de l'activité locomotrice, signalée par les bandes noires. Pour plus de visibilité, chaque ligne représente 2 jours consécutifs. La période d'obscurité est indiquée par les zones grises. En LD, ZT0 correspond au début du cycle de lumière et si celui-ci est un cycle 12:12, alors ZT12 correspond au début de la phase d'obscurité. Par convention, chez un animal nocturne maintenu en DD, CT12 correspond au début de son activité locomotrice. S'il maintient un cycle 12:12, alors CT0 correspond à la fin de cette activité. La période de l'activité locomotrice (τ) est en libre cours : elle est supérieure à 24h sur l'actogramme de gauche tandis qu'elle est inférieure à 24h sur celui de droite. CT : *Circadian time* ; ZT : *Zeitgeber time*.

¹ Light/Dark en anglais

² Signifie donneur de temps en allemand

³ De l'anglais, Dark/Dark

Dans le domaine de la chronobiologie, différents paramètres d'une oscillation sont étudiés (**voir FIGURE 4**). Pour cela, l'équation d'une courbe sinusoïdale est utilisée comme modèle mathématique pour extraire : 1) la période qui est le temps mis par la courbe pour revenir à son point d'origine, 2) le mésor ou la moyenne de tous les points d'une période donnée, 3) l'amplitude qui correspond à la valeur entre le maximum et le mésor et enfin 4) la phase qui indique à quel moment un point précis de la courbe arrive (l'acrophase représente la phase du pic de l'oscillation et son opposé, la bathyphase, celle du creux). Deux oscillations peuvent être en phase c'est-à-dire avoir leur acrophase au même moment, ou inversement être en anti-phase auquel cas l'acrophase de l'une correspondra à la bathyphase de l'autre. Si ces deux oscillations sont en phase, en anti-phase ou avec un même temps t de décalage, on dira qu'elles sont couplées. Elles oscillent de façon synchrone.

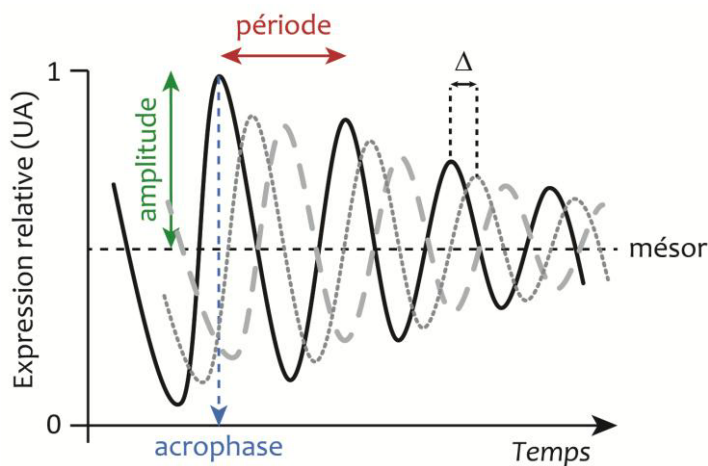


FIGURE 4 : DIFFERENTS PARAMETRES D'UNE OSCILLATION SUIVANT UNE COURBE SINUSOÏDALE. On caractérise une oscillation par sa période (en rouge), son amplitude (en vert) et sa phase. Dans cet exemple, la phase représentée est l'acrophase (en bleu). L'oscillation noire est couplée aux deux autres oscillations en pointillés. Plus précisément, elle se trouve en anti-phase avec l'oscillation grise en pointillé long. Il est possible de savoir le degré de décalage entre deux oscillations en calculant leur différence de phase (Δ).

1|2. Une horloge dans la tête

Le rythme circadien le plus évident est le cycle veille/sommeil contrôlé par un noyau de l'hypothalamus antérieur, le noyau suprachiasmatique (SCN), qui a été désigné comme principal pacemaker circadien (Reppert & Weaver, 2001). En effet, suite à sa lésion, la rythmicité des cycles veille/sommeil, de la libération de corticostérone ainsi que de la prise de boisson et de nourriture a été abolie chez les rongeurs (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972; Nagai et al., 1978). Afin de confirmer que le SCN initie ces activités rythmiques, il a été détruit par lésion électrolytique chez un hamster « sauvage ». A la place, le SCN d'un hamster ayant une mutation appelée *Tau* lui a été greffé. Ces hamsters mutés ont une période d'activité locomotrice plus courte ($\tau < 24h$) qui est le fruit d'une mutation de la caséine kinase ϵ (CKI_{ϵ} ; Vanselow & Kramer, 2007). Après récupération, le hamster sauvage greffé présentait une période d'activité semblable à ceux ayant une mutation *Tau*, et *vice versa* (Ralph et al., 1990). Ces résultats ont permis d'établir la théorie selon laquelle le SCN mettait en place les rythmes biologiques, et cela à partir d'une innervation directe des tissus centraux et périphériques mais également *via* des signaux diffusibles (Silver et al., 1996; Ueyama et al., 1999; Balsalobre et al., 2000).

2. Le SCN

Le SCN est une structure bipartite dont chacun des noyaux comportent 10 000 neurones chez la souris (Welsh et al., 2010). Il est situé près du 3^e ventricule ventral chez les mammifères, juste au-dessus du chiasma optique comme son nom l'indique. Le SCN est une horloge autonome : l'activité

INTRODUCTION

de ses cellules est synchronisée et est auto-entretenu (Welsh et al., 2010). Elles déchargent de façon rythmique avec une activité plus forte le jour que la nuit, même en étant dissociées les unes des autres. Cependant, cette dissociation entraîne une désynchronisation entre les cellules : la période et la phase diffèrent alors pour chacune d'entre elles (Welsh et al., 1995). La capacité du SCN à coordonner l'activité de ses cellules par un fort couplage lui permet d'avoir une précision d'horloge (Welsh et al., 1995; Herzog et al., 2004a). Et grâce à ce couplage, le SCN oscille de son propre chef sans avoir recours à d'autres impulsions.

2|1. Machine moléculaire¹

a. Boucle principale : induction

Les cellules du SCN ont la faculté de maintenir un rythme stable et endogène grâce à une machinerie moléculaire composée de boucles autorégulées de rétrocontrôle transcriptionnel (Takahashi et al., 2008; Takahashi, 2017; Welsh et al., 2010). Une vue simplifiée de cette horloge décrit les facteurs de transcription BMAL1:CLOCK comme un hétérodimère se fixant sur des sites E-box situés notamment sur le promoteur des gènes *Période* (*Per1-3*) et *Cryptochrome* (*Cry1-2*). Les protéines PER et CRY s'hétérodimérisent et se transloquent dans le noyau afin d'empêcher le complexe BMAL1:CLOCK de se fixer aux sites E-Box et donc d'activer la transcription de leurs gènes cibles. Ainsi PER et CRY entravent leur propre transcription jusqu'à ce qu'il n'y ait plus assez de dimères pour soutenir l'inhibition (voir la boucle rouge de la FIGURE 5 ; Takahashi et al., 2008; Takahashi, 2017; Welsh et al., 2010).

Des études se sont penchées plus en détails sur la boucle négative : les protéines PER et CRY n'ont pas tout à fait le même rôle. D'une part, CRY1 se fixe uniquement sur BMAL1 alors que PER2 peut se lier à CLOCK et à BMAL1 mais avec une moindre affinité pour cette dernière (Langmesser et al., 2008). Cette différence de fixation peut expliquer le fort impact inhibiteur des protéines CRY sur la transcription engendrée par BMAL1. En effet, CRY1 se lie à BMAL1 sur sa partie C-terminale non loin des sites de fixation de co-facteurs nécessaires à l'activation de la transcription (Langmesser et al., 2008). D'autre part, la protéine PER2 permet aux protéines CRY de mieux se fixer au complexe BMAL1:CLOCK en créant une sorte d'échafaudage protéique (Ripperger & Albrecht, 2012). Les protéines PER et CRY sont co-dépendantes pour la translocation nucléaire avec une plus grande importance pour les protéines PER puisqu'elles sont encore détectées dans le noyau chez les doubles mutants² *Cry1-2* mais en moindre quantité (Lee et al., 2001; Ye et al., 2014). De toutes les isoformes, la protéine PER3 est celle qui a le moins d'impact sur les boucles de régulation. En effet, sa mutation n'entraîne aucun phénotype particulier au niveau de l'horloge, même chez des doubles mutants² *Per1/Per3* ou *Per2/Per3* (Bae et al., 2001; Shearman et al., 2000a). Son rôle se situerait plus en aval en modulant les gènes qui constituent les sorties de l'horloge.

¹ L'horloge moléculaire se présente sous différentes formes chez d'autres espèces (ex. cyanobactéries, plantes, *Drosophila melanogaster*, *Neurospora crassa*) mais elles ne seront pas abordées dans ce manuscrit en se focalisant uniquement sur l'horloge des mammifères, la souris étant mon modèle animal

² Mutations entraînant des pertes de fonction

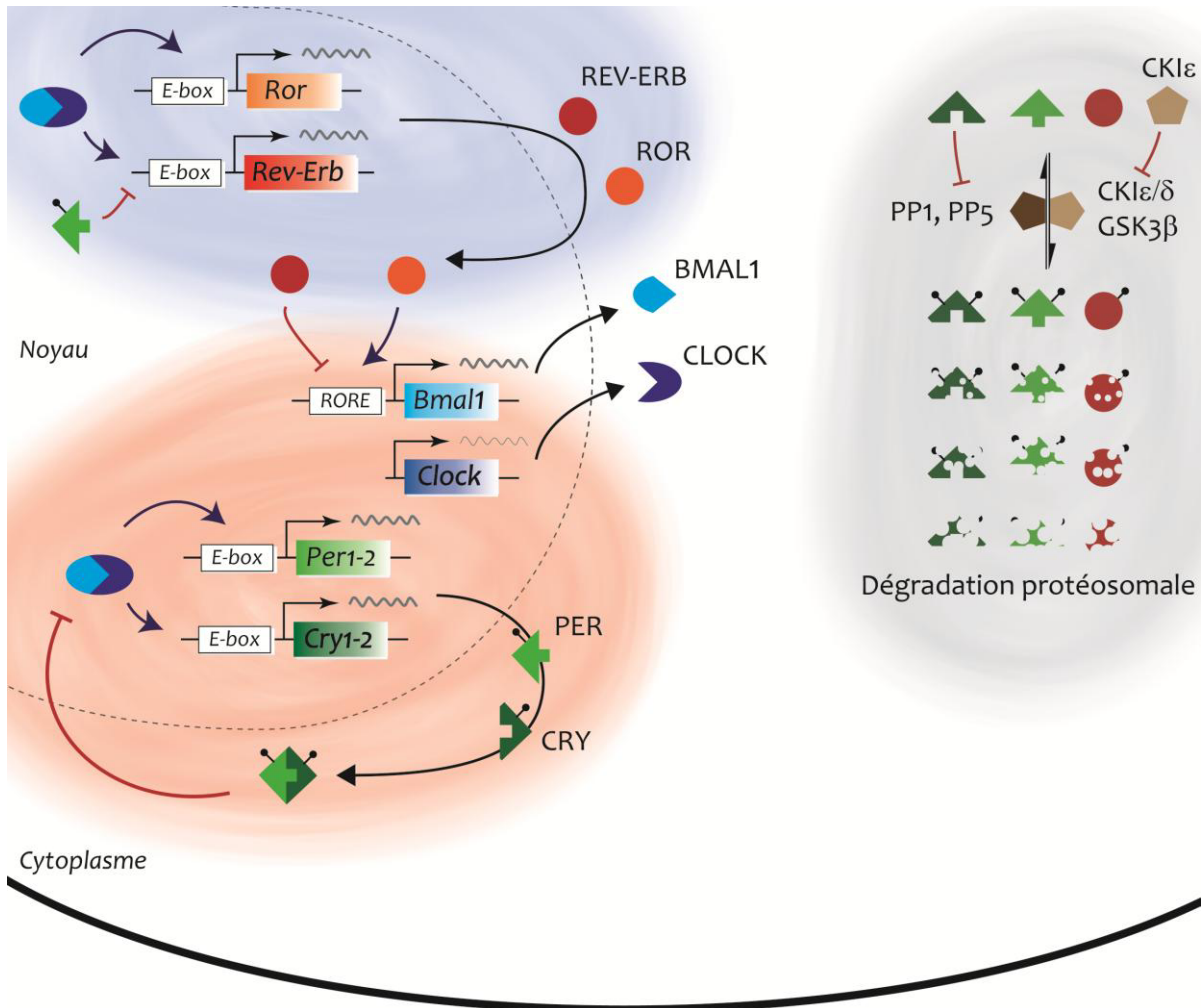


FIGURE 5 : L’HORLOGE MOLECULAIRE. La boucle rouge représente la boucle principale dans laquelle le complexe BMAL1:CLOCK active la transcription de *Per* et *Cry* dont les protéines inhibent leur propre transcription. La boucle bleue correspond à la boucle de consolidation dans laquelle ROR et REV-ERB activent et inhibent respectivement la transcription de *Bmal1*. La boucle noire représente la boucle de stabilisation et de dégradation dans laquelle CKIε/δ et GSK3β phosphorylent alors que PP1 et PP5 déphosphorylent les protéines CRY, PER et REV-ERB. Une trop grande phosphorylation conduit à une dégradation protéosomale. De plus, CKIε inhibe son activité en s’autophosphorylant et CRY inhibe l’activité de PP5. Adapté de Ko & Takahashi, 2006; Ripperger & Albrecht, 2012.

Mais quel est l’intérêt d’avoir de multiples formes d’une protéine dans l’horloge moléculaire ? Chaque isoforme a son propre rôle mais cette redondance partielle des protéines horloges permet de garder stable les oscillations si une mutation survient sur un gène horloge, en l’absence de tout *zeitgeber* (ex. en DD ; Vitaterna et al., 1994; Zheng et al., 1999; Bae et al., 2001; Zheng et al., 2001).

b. Boucle secondaire : consolidation

D’autres protéines entrent également en jeu rendant le système plus complexe. Les récepteurs nucléaires orphelins des familles ROR¹ (α-β) et REV-ERB² (α-β) sont également des facteurs de transcription régulés par un site E-Box et forment une deuxième boucle moléculaire qui va ainsi

¹ De l’anglais *retinoic acid-related orphan receptor*

² De l’anglais *reverse viral erythroblastis oncogene product*

INTRODUCTION

consolider la boucle principale (Triqueneaux et al., 2004). Les protéines ROR α et REV-ERB α entrent en compétition pour interagir avec l'élément ROR du promoteur de *Bmal1* afin de pouvoir respectivement activer ce gène ou l'inhiber (voir la boucle bleue de la FIGURE 5 ; Preitner et al., 2002; Sato et al., 2004; Akashi & Takumi, 2005; Guillaumond et al., 2005). En outre, la protéine PER2 participe également à cette deuxième boucle en régulant l'expression du gène *Rev-Erba* (Ripperger & Albrecht, 2012). De ce fait, la quantité d'ARN et de protéines issus des gènes *Bmal1*, *Cry1*, *Per1*, *Per2* se verra diminuée lorsque la protéine PER2 est mutée, entraînant la levée de l'inhibition du gène *Rev-Erba* (Zheng et al., 1999; Bae et al., 2001; Ripperger & Albrecht, 2012).

c. Stabilisation et dégradation (autre mécanisme de régulation)

Pour réussir à imposer un rythme de 24h, il est nécessaire qu'un délai suffisamment grand soit établi entre le moment de la production des protéines PER et CRY et leur action inhibitrice. Ceci sera possible grâce à l'action de différents facteurs qui moduleront l'abondance, la localisation sub-cellulaire et l'activation ou l'inactivation des protéines (Vanselow & Kramer, 2007).

Les protéines CLOCK, BMAL1, CRY et PER sont phosphorylées *in vivo* par l'action de caséines kinases (CKI ϵ , CKI δ , GSK3- β ¹) et déphosphorylées par des protéines phosphatases (PP1, PP5 ; voir la boucle noire de la FIGURE 5 ; Lee et al., 2001; Akashi et al., 2002; Eide et al., 2002; Harada et al., 2005; Gallego et al., 2006; Partch et al., 2006; Yin et al., 2006; Vanselow & Kramer, 2007). L'activité de PER2 est directement liée à son niveau de phosphorylation : la kinase GSK3- β favorise sa translocation nucléaire alors que la CKI ϵ démarre la signalétique permettant la dégradation protéasomale (Eide et al., 2005; Iitaka et al., 2005; Vanselow & Kramer, 2007). En effet, l'action des kinases CKI ϵ , CKI δ et GSK3- β déstabilisent les protéines PER, CRY2 et REV-ERB (selon leur affinité) qui seront par la suite reconnues puis poly-ubiquitinilées par l'ubiquitine ligase et donc amenées au protéasome (Eide et al., 2002, 2005; Harada et al., 2005; Yin et al., 2006; Virshup et al., 2007). A l'inverse, l'absence de phosphorylation sur BMAL1 induit une diminution de l'activité de transcription liée au complexe BMAL1:CLOCK (Eide et al., 2002; Virshup et al., 2007).

Pour résumer, les kinases ont une action en faveur de l'accélération de l'horloge et les phosphatases contrebalance cet effet en stabilisant les protéines, et de ce fait, ralentissent l'horloge. Il faut également prendre en compte que la CKI ϵ s'inactive en s'auto-phosphorylant, mais la PP5 permet de maintenir sa stabilité et son activité enzymatique. S'ajoutent les protéines CRY qui inhiberont l'activité de la PP5, ce qui aboutira finalement à la dégradation de la CKI ϵ (Partch et al., 2006).

Des mécanismes post-transcriptionnels comme la rétention nucléaire des ARN messagers par des corpuscules subnucléaires (paraspeckles) complexifient d'autant plus le système (Torres et al., 2018). En effet, les composants des paraspeckles et le nombre des paraspeckles suivent une expression circadienne dans les cellules hypophysaires. Ce mécanisme post-transcriptionnel permet donc de contrôler l'expression circadienne des ARN messagers (Torres et al., 2017). Finalement, c'est l'interaction de toutes ces protéines (de la boucle principale, secondaire et de régulation) qui induisent une horloge moléculaire dont la période est d'environ 24h. Ces gènes et leurs produits, faisant partie de cette machinerie moléculaire, sont qualifiés d'« horloges ».

¹ Glycogen synthase kinase 3- β

d. Décours temporel

Dans le SCN, la protéine CLOCK étant constitutive, le complexe suit la rythmicité de la protéine BMAL1 dont le gène est exprimé en plus grande quantité durant la nuit (Shearman et al., 2000b). Les gènes de la boucle d’inhibition rétroactive (*Per1-2*, *Cry1-2* et *Rev-Erba*) sont plus exprimés durant le début du jour (Guilding & Piggins, 2007; Takahashi et al., 2008). L’ajout de phosphate sur les différents résidus d’acides aminés va permettre aux protéines PER et CRY d’être transloquées dans le noyau en fin de journée (Vanselow & Kramer, 2007). PER2 permet à CRY de se lier sur le complexe BMAL1:CLOCK encore fixé à l’ADN afin d’empêcher le recrutement de facteurs de transcription (Langmesser et al., 2008; Ye et al., 2014). PER2 inhibe l’expression du gène *Rev-Erba* pour lever l’inhibition de *Bmal1* (Ripperger & Albrecht, 2012). En fin de nuit, suite à l’inhibition de leur propre transcription et à la dégradation protéasomique occasionnée par leur phosphorylation, il n’y a plus assez de protéines PER et CRY : l’inhibition est donc levée. REV-ERB α va pouvoir de nouveau entrer en compétition avec ROR pour inhiber l’expression de *Bmal1* (Guillaumond et al., 2005); PER et CRY commence à s’accumuler dans le cytoplasme. Et le cycle recommence (voir FIGURE 6).

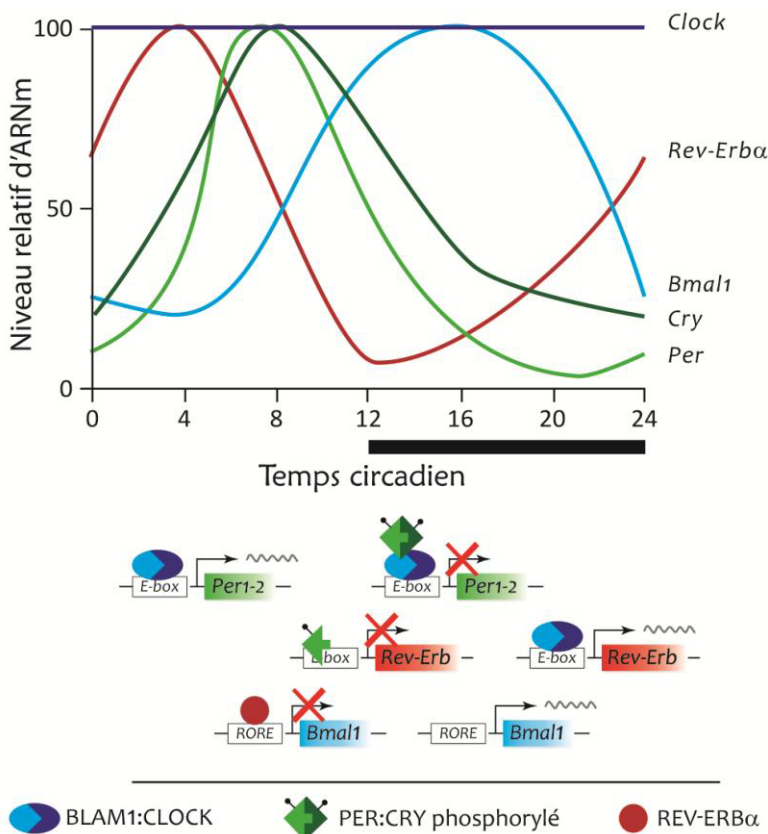


FIGURE 6 : PROFIL D’EXPRESSION DES GENES ET DES PROTEINES HORLOGES AU COURS DU TEMPS DANS LE SCN. En fin de nuit, les protéines BMAL1 et CLOCK sont abondantes et activent la transcription des gènes *Per*, *Cry* et *Rev-Erb*. En début de jour, le niveau des protéines PER, CRY et REV-ERB est augmenté. REV-ERB inhibe la transcription de *Bmal1* tandis que PER inhibe celle de *Rev-Erb*. En début de nuit, PER et CRY empêchent la transcription initiée par le complexe BMAL1:CLOCK et donc leur propre transcription. Adapté de Guilding & Piggins, 2007.

2|2. L’Horloge dans son ensemble

a. Entrée de l’horloge

L’horloge biologique est d’une grande régularité. Pour éviter toute dérive, il faut qu’elle puisse se resynchroniser avec le monde extérieur. Cependant, il n’est pas nécessaire de « voir » la lumière (perception consciente). Des aveugles étant atteints de rétinite pigmentaire arrivent à détecter à plus de 75% la lumière bleue lors d’une exposition prolongée (10 secondes). C’est une perception inconsciente de la lumière (Vandewalle et al., 2013). Malgré l’absence de cône et de bâtonnet, des

INTRODUCTION

sorties d'horloge persistent comme le rythme journalier de l'activité locomotrice et la suppression de la mélatonine par la lumière (Czeisler et al., 1995; Freedman et al., 1999; Lucas et al., 1999). La perception non visuelle de la lumière reste possible grâce à un photopigment, la mélanopsine, dont la sensibilité optimale est de l'ordre de la longueur d'onde du bleu (≈ 480 nm ; Hankins et al., 2008), et qui se situe dans certaines cellules ganglionnaires de la rétine (RGC¹, Provencio et al., 1998, 2000). Ces cellules intrinsèquement photosensibles (ipRGC) sont peu nombreuses (<5% des RGC) et ont été décrites pour la première fois en 2002 (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002). Elles sont activées directement par la lumière et intègrent également les informations des photorécepteurs ainsi que des autres cellules intermédiaires de la rétine (LeGates et al., 2014). Alors que les RGC jouent un rôle dans la formation et la perception des images, les ipRGC prennent part en plus, à la contraction pupillaire, au contraste, à la perception du mouvement, à la régulation du sommeil et à la modulation de l'horloge (Lucas et al., 2012; LeGates et al., 2014). En effet, il a été montré que des cellules de la rétine, plus précisément les ipRGC, projettent sur divers noyaux contenant une horloge et pour une grande partie sur le SCN (Hattar et al., 2002, 2006; Lucas, 2013).

D'autres facteurs comme les neurotransmetteurs peuvent influencer le SCN. Le neuropeptide Y provenant des feuilletts intergénéculés latéraux du thalamus resynchronise l'horloge tout comme la sérotonine provenant du noyau du Raphé (Huhman & Albers, 1994; Glass et al., 2000). La libération rythmique de dopamine, quant à elle, entraîne le SCN du fœtus en développement dans l'utérus de sa mère mais accélère aussi la resynchronisation lors d'un déphasage chez l'adulte (Viswanathan et al., 1994; Grippo et al., 2017).

b. Différents oscillateurs à l'intérieur de l'horloge

Chaque cellule² du SCN est capable d'osciller par elle-même après dissociation. Si elles sont transplantées dans un animal ayant une lésion du SCN, elles peuvent restaurer la rythmicité perdue par la création d'îlots de cellules (Silver et al., 1990).

Le SCN est composé de deux parties différentes en composition et en fonction (voir **FIGURE 7**). La région dorso-médiane appelée la coquille (ou *shell* en anglais) co-exprime l'arginine-vasopressine (AVP) et le GABA³ (Welsh et al., 2010). Les cellules observent une grande synchronie leur permettant de conserver un rythme très stable. Des projections vasopressinergiques et GABAergiques diffusent cette rythmicité à d'autres structures cérébrales. La région ventro-latérale appelée le noyau (ou *core* en anglais) co-exprime le GABA et le peptide vasoactif intestinal (VIP⁴) ou la GRP⁵ (Welsh et al., 2010). Les cellules de cette région montrent un rythme beaucoup plus instable, donc plus malléable, afin d'intégrer les nouveaux signaux photiques transmis par la rétine. Il existe une communication VIPergique du *core* vers le *shell* pour que l'ensemble du SCN se synchronise à l'environnement extérieur.

¹ De l'anglais *retinal ganglion cells*

² A noter : les cellules ne sont pas forcément neuronales. Les cellules gliales participent également au bon fonctionnement de l'horloge en tamponnant le glutamate extracellulaire (Brancaccio et al., 2017)

³ *γ-aminobutyric acid* / acide γ -aminobutyrique

⁴ De l'anglais *vasoactive intestinal peptide*

⁵ De l'anglais *gastrin-released peptide*

Différentes horloges dans l'organisme – Horloge autonome

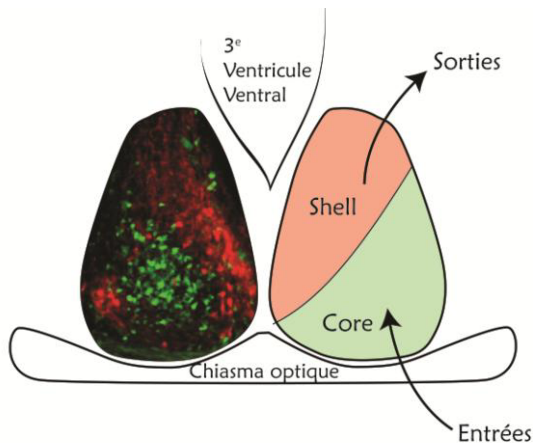


FIGURE 7 : LES DIVISIONS DU SCN. La partie ventrale (*core*) est délimitée par les neurones à GRP exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) et la partie dorsale (*shell*) est délimitée par les neurones marqués en rouge par un anticorps anti-AVP. Adapté de [Welsh et al., 2010](#).

Le SCN n'est pas seulement divisé dorso-ventralement mais également le long de l'axe rostro-caudal. L'activité électrique du SCN se compose en deux pics, uniquement visibles en coupe horizontale, encodant la photopériode ([Jagota et al., 2000](#)). Le premier pic correspondrait à l'activation de la partie caudale qui encoderait le début du jour tandis que le second, plus tardif, à l'activation de la partie rostrale qui encoderait la fin du jour ([Jagota et al., 2000](#); [Honma et al., 2012](#)).

c. Sortie de l'horloge

La sortie primaire de l'horloge se situe sur les gènes ayant un site E-box sur leur promoteur et étant donc régulés par l'hétérodimère BMAL1:CLOCK ([Takahashi, 2017](#)). Ces gènes nommés « gènes cibles de l'horloge » représentent le support moléculaire des fonctions cellulaires cycliques. Dans le SCN, l'AVP, la prokinétine 2 et la CLC¹ sont régulés par l'horloge circadienne ([Jin et al., 1999](#); [Cheng et al., 2002](#); [Kraves & Weitz, 2006](#)). Ces molécules ont également une expression rythmique de leur gène et sont chargées de transmettre l'information rythmique à d'autres structures ([Li et al., 2012](#)). Dans un second temps, le SCN module indirectement, *via* différents relais, la production de mélatonine et de corticostérone ([Ishida et al., 2005](#); [Pfeffer et al., 2018](#)). Enfin, l'activité du SCN entraîne la rythmicité de plusieurs comportements. Sa lésion induit une perte du rythme de la prise alimentaire, de boisson et de l'activité locomotrice ([Moore & Eichler, 1972](#); [Stephan & Zucker, 1972](#); [Nagai et al., 1978](#)).

3. Différentes horloges dans l'organisme

Le SCN, considéré comme l'unique horloge de l'organisme, est maintenant plus envisagé comme un « chef d'orchestre ». Son rôle est de donner le temps aux autres régions cérébrales et autres organes périphériques afin de synchroniser l'organisme entier avec l'environnement externe. En effet, d'autres horloges présentes dans divers tissus (foie, poumons, glande pinéale) oscillent par elles-mêmes *ex vivo* sans avoir besoin d'être directement entraînées par le SCN ([Abe et al., 2002](#)). Guilding et Piggins (2007) ont classifié les horloges cérébrales en 3 catégories (**voir FIGURE 8**).

3|1. Horloge autonome

Une horloge autonome est entraînable par un synchronisateur (ex. lumière, drogue, nourriture, exercice), oscille de façon auto-entretenu et transmet ses propriétés rythmiques à une sortie moléculaire, physiologique ou comportementale (ex. activité locomotrice, libération hormonale).

¹ De l'anglais *cardiotrophin-like cytokine*

INTRODUCTION

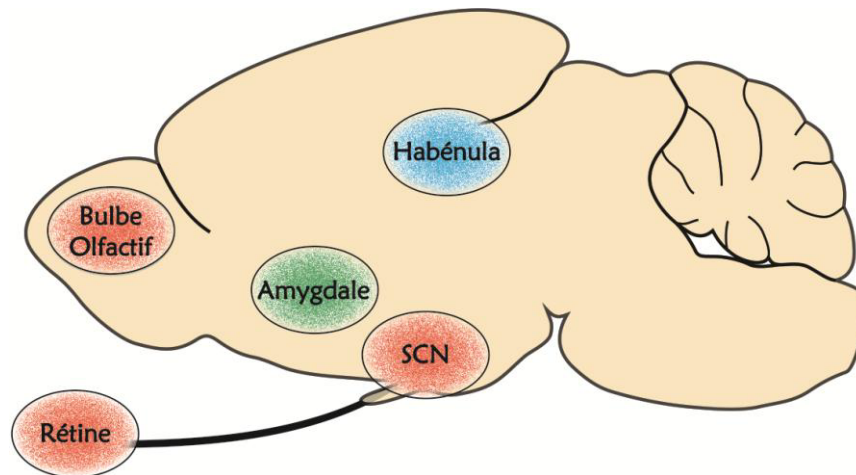


FIGURE 8 : CLASSIFICATION DES HORLOGES CÉRÉBRALES. En rouge : le SCN, la rétine et le bulbe olfactif, des horloges autonomes qui sont entraînés par un synchronisateur, oscillent de façon auto-entretenue et transmettent leurs propriétés rythmiques. En bleu : l'habénula, une horloge semi-autonome qui oscille par elle-même mais ses oscillateurs internes se désynchronisent en l'absence d'une horloge autonome. En vert : l'amygdale, une horloge dite « esclave » qui devient arythmique sans la présence d'un pacemaker autonome ou semi-autonome pour maintenir ses oscillations synchrones. Adapté de [Guilding & Piggins, 2007](#).

La rétine est connue pour être l'organe transmettant les informations lumineuses mais elle possède également une horloge circadienne qui permet d'adapter la fonction visuelle à l'alternance du jour et de la nuit ([McMahon et al., 2014](#)). Dans les années 90, Tosini et Menaker observent une libération rythmique de la mélatonine dans la rétine de hamsters en DD, qui est entraînée par la lumière et compensée en fonction de la température ([Tosini & Menaker, 1996, 1998](#)). De plus, la mutation *Tau* connue pour raccourcir la période de l'activité locomotrice, réduit également celle de la sécrétion de la mélatonine dans la rétine ([Tosini & Menaker, 1996, 1998](#)). En effet, le gène de l'arylalkylamine N-acétyltransférase (*Aanat*), codant pour une des deux enzymes impliquées dans la synthèse de mélatonine, est un gène cible de l'horloge. Il est plus fortement exprimé la nuit et est directement contrôlé par la lumière et par le complexe BMAL1:CLOCK *via* sa séquence E-Box ([Sakamoto & Ishida, 1998; Chen & Baler, 2000; Fukuhara et al., 2004; Sandu et al., 2011; Buonfiglio et al., 2014](#)). Différentes études rapportent également l'expression circadienne des gènes et des protéines horloges dans diverses populations cellulaires de la rétine sans pour autant que les résultats soient homogènes ([Peirson et al., 2006; Ruan et al., 2006; Dorenbos et al., 2007; Schneider et al., 2010; Sandu et al., 2011; Liu et al., 2012; Dkhissi-Benyahya et al., 2013; Buonfiglio et al., 2014; Lahouaoui et al., 2016; Wong et al., 2018](#)). En fait, il existe plusieurs oscillateurs, au moins un dans chaque couche de la rétine, qui sont couplés les uns aux autres et permettent le bon fonctionnement du pacemaker ([Jaeger et al., 2015](#)).

Le bulbe olfactif est une autre aire sensitive possédant une horloge. Elle a surtout été étudiée par la technique de bioluminescence. Cette technique repose sur l'utilisation d'une protéine rapportrice, la luciférase, une enzyme capable d'émettre un photon en présence de son substrat, la luciférine, qui est exogène aux mammifères ([voir FIGURE 9; Gould & Subramani, 1988](#)). Sous le contrôle du promoteur *Per1* ou en étant fusionnée à la protéine PER2, elle permet de suivre respectivement l'expression du gène ou de la protéine. *In vivo*, l'expression de *Per1* dans le bulbe olfactif augmente à la fin de la nuit, en antiphase avec celle de *Bmal1* ([Abraham et al., 2005; Hamada et al., 2016](#)). Elle est conservée en DD même lorsque le SCN est lésé ([Abraham et al., 2005](#)). Contrairement à

Différentes horloges dans l'organisme – Horloge semi-autonome

l'expression du gène *Per1*, la protéine PER2 continue d'osciller après une lésion du SCN *ex vivo* mais perd sa rythmicité *in vivo* (Granados-Fuentes et al., 2004a; Ono et al., 2015). Il est important de noter que toutes les cellules du bulbe olfactif ne présentent pas un profil circadien ; seules les cellules à panache et mitrales (non les cellules en grain) déchargent leurs potentiels d'action de façon circadienne *ex vivo* (Granados-Fuentes et al., 2004b, 2006). Cette horloge pourrait servir au traitement de l'information olfactive. En effet, une odeur va entraîner le recrutement de plus de cellules du bulbe olfactif si elle est présentée en début de nuit (CT15-16) que le jour (Amir et al., 1999; Granados-Fuentes et al., 2006). Tout comme le bulbe olfactif, le cortex piriforme recrute spontanément plus de neurones en fin de nuit (plus de cellules expriment cFOS). Le bulbe olfactif envoie au cortex des informations olfactives et lui transmet également sa rythmicité puisqu'une bulbectomie abolit son expression rythmique (Granados-Fuentes et al., 2006).

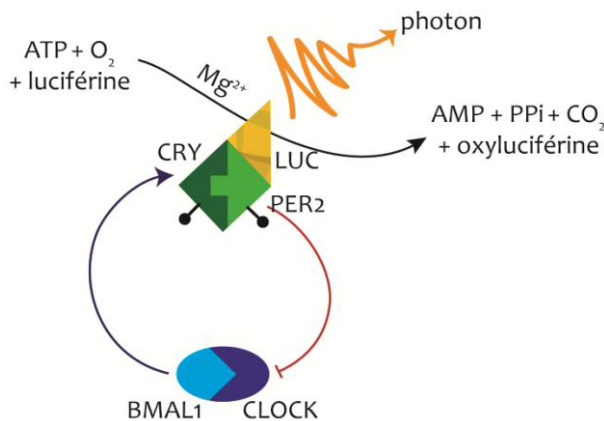


FIGURE 9 : LA BIOLUMINESCENCE COMME RAPPEUR DE L'HORLOGE MOLECULAIRE. La luciférase est une enzyme oxydant la luciférine, ce qui a pour effet de libérer un photon. L'activité de la luciférase couplée à la protéine PER2 permet de suivre le niveau de PER2 en mesurant le nombre de photons émis. Ainsi, il est possible d'avoir un aperçu de l'état de l'horloge moléculaire.

3|2. Horloge semi-autonome

Une horloge semi-autonome a la faculté d'osciller par elle-même mais ses oscillateurs internes (ex. chaque cellule du tissu) se désynchronisent en l'absence d'une horloge autonome, ce qui à terme la rend arythmique.

L'habénula, la structure d'intérêt de mon étude, a été classée dans cette catégorie. Ses propriétés circadiennes sont répertoriées dans la **partie 4|2**.

3|3. Horloge "esclave"

Ces horloges sont qualifiées d'esclaves car elles sont soumises au rythme d'un pacemaker autonome ou semi-autonome. Sans lui, elles demeurent arythmiques.

L'amygdale est impliquée dans les émotions négatives (anxiété, peur, stress), la mémoire et l'apprentissage (Phelps & LeDoux, 2005). On retrouve une expression circadienne de PER2 dans différentes régions de l'amygdale, mais celle-ci disparaît lorsque le SCN de l'animal est désynchronisé en étant exposé à une lumière constante (LL) ou détruit par lésion électrolytique (Amir et al., 2004; Lamont et al., 2005a, 2005b; Harbour et al., 2013). Le SCN contrôle la libération de corticostérone dont les récepteurs sont exprimés dans l'amygdale (Arriza et al., 1988; Morimoto et al., 1996; Ishida et al., 2005; Pfeiffer et al., 2018). L'ablation des glandes surrénales qui produisent les corticostéroïdes entraîne un aplatissement du rythme de PER2 (Amir et al., 2004; Lamont et al., 2005b). Les corticostéroïdes dont la libération rythmique est contrôlée par le SCN, sembleraient donc être un synchronisateur endogène de l'amygdale.

4. L'habénula, ses caractéristiques

L'habénula, du latin *habena* signifiant « les rênes », est une petite structure, pas plus grande qu'un petit pois chez l'Homme ($\approx 72 \text{ mm}^3$ soit 0.005% du volume cérébral¹ ; Gaffiot, 1934; Lüders et al., 2002; Ahumada-Galleguillos et al., 2017). L'habénula est apparue au sein du taxon des vertébrés et reste toujours conservée phylogénétiquement depuis les agnathes jusqu'aux primates (voir **FIGURE 10A** ; Iwahori, 1977; Distel & Ebbesson, 1981; Bianco & Wilson, 2009; Amo et al., 2010; Díaz et al., 2011; Wagner et al., 2014; Grillner et al., 2017). De ce fait, elle est étudiée à travers différents modèles animaux tels que les rongeurs (souris, rats, hamster, gerbille, *Arvicanthis*), le poisson zèbre, les primates (singes, humains) mais également, plus éloignée phylogénétiquement, la lamproie (Ellison et al., 1996; Tavakoli-Nezhad & Schwartz, 2006; Matsumoto & Hikosaka, 2007; Shumake et al., 2010; Lammel et al., 2012; Stephenson-Jones et al., 2012; Hennigan et al., 2015; Shuboni et al., 2015; Chou et al., 2016).

4|1. Vue d'ensemble

L'habénula et la glande pinéale forment un ensemble appelé l'épithalamus. L'habénula se situe près du 3^e ventricule dorsal ; chez les rongeurs elle s'étend sur le plancher dudit ventricule (Aizawa et al., 2011). Elle se divise en deux grands noyaux : l'habénula latérale (LHb) et l'habénula médiane (MHb ; Ramón y Cajal, 1911). La MHb diffère de sa consœur par sa forme allongée et sa forte densité en petites cellules. En revanche, la LHb est plus large avec une répartition moins compacte de larges neurones (illustration en **FIGURE 10B** ; Andres et al., 1999). La *stria medullaris* dont on remarque les fibres sur la partie dorsale de l'habénula regroupe les fibres afférentes alors que le *fasciculus retroflexus* réunit les efférences dont on remarque la sortie vers la partie caudale de l'habénula (Ramón y Cajal, 1911; Herkenham & Nauta, 1977, 1979).

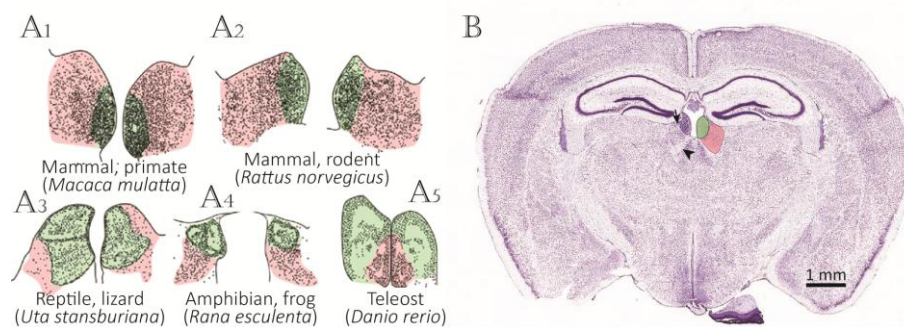


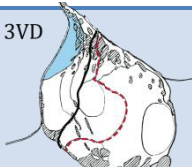
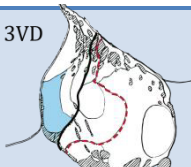
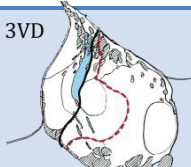
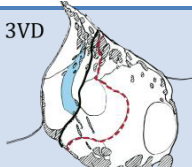
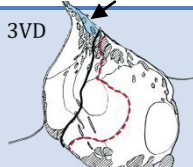
FIGURE 10 : L'HABENULA. L'habénula est présente dans de nombreux vertébrés comme les primates (A1), les rongeurs (A2), le lézard (A3), la grenouille (A4) et le poisson zèbre (A5). (B) Une coupe de cerveau de souris au niveau de l'habénula, colorée au crésyl violet. La MHb est représentée en vert et la LHb en rose. La petite flèche pointe sur la stria medullaris et la tête de flèche sur le fasciculus retroflexus. Adapté de Aizawa et al., 2011; Allen Institute.

4|2. Une structure hétérogène

Voici un noyau bien obscur et complexe qu'est l'habénula. Différentes études ont essayé de mettre de l'ordre dans son hétérogénéité en la morcelant en plusieurs sous-noyaux allant jusqu'à 15 aires différentes : 5 dans la médiane et 10 dans la latérale (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003; Díaz et al., 2011; Weiss & Veh, 2011; Aizawa et al., 2012). Quelques-unes de ses caractéristiques ont été résumées dans les **TABLEAUX 1 à 3**.

¹ En prenant en compte l'habénula des deux hémisphères cérébraux

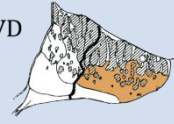
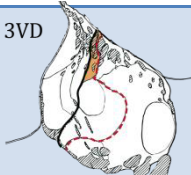
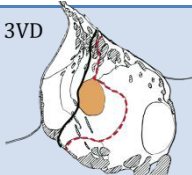
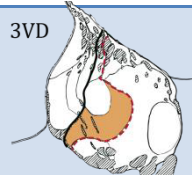

TABEAU 1 : POSITION ET CRITERES DELIMITANT LES DIFFERENTS SOUS-NOYAUX COMPOSANT LA MHB

		MHbS S : supérieur	MHbI I : inférieur	MHbL L : latérale	MHbC C : centrale	MHbCo Co : commissure
Position¹	Bregma -1.70	3VD 	3VD 	3VD 	3VD 	3VD 
Structurale²	Neurones	Paquets de petites cellules Noyaux triangulaires avec invagination	Paquets de petites cellules Noyaux ronds	Paquets de petites cellules Noyaux ovales dans lequel des plaques de chromatine bordent la membrane	Petites cellules Noyaux ronds/ovales	Les plus grandes cellules de la MHb Noyaux en demi-lune
(coupe semi-fine et microscopie électronique)	Neuropile	Neuropile dense Dendrites fines Présynapses homogènes : vésicules claires	Neuropile irrégulier Larges dendrites Présynapses hétérogènes : vésicules claires & denses	Neuropile irrégulier Prolongements astrocytaires entourant les synapses	Neuropile irrégulier traversé par des paquets de petits axones myélinisés Prolongements astrocytaires entourant les synapses	Neuropile traversé par des fibres astrogliales et de la commissure Hb Présence de cellules de la microglie
Morphologie³ (Golgi)	Forme des cellules	Petits neurones avec un soma piriforme et des dendrites épineuses ou un soma fusiforme et des dendrites lisses				
Activité électrique⁴	Motif des PA	Silencieux, tonique et dépolarisation de faibles amplitudes				
Innervations spécifiques⁵	Projections	IPN latéral	IPN central	nd	nd	nd
Profil cytochimique⁶ (expression génique et protéique)	<i>Vglut1/2</i>	++/+++	++/++	-/++	++/++	nd
	<i>Gad67</i>	+	-	-	-	-
	<i>Tac1</i>	+	-	-	-	nd
	<i>Htr_{5b}</i>	-	++	+++	+	nd
	<i>Htr_{2c}</i>	-	-	-	-	+
	<i>Oprm</i>	-	-	++	-	nd
	<i>Kiss R</i>	-	-	++	-	-
	NF	++	+	+	+	++
	ChAT	-	++	++	++	nd
	GABA _B -R	+++	+++	-	+++	++
IL-18	++	-	-	-	nd	

3VD : 3^e ventricule dorsal ; ChAT : choline acétyl-transférase ; GABA_B-R : récepteur GABAergique de type B ; Gad67 : glutamate décarboxylase 67 ; Htr_{5b/2c} : récepteur sérotoninergique de type 5b/2c ; IL-18 : interleukine 18 ; IPN : noyau interpédonculaire ; Kiss R : récepteur de la kisspeptine ; nd : non déterminé ; NF : neurofilament ; PA : potentiel d'action ; Oprm : récepteur μ opioïde ; Tac1 : tachykinine 1 (Précurseur de la substance P) ; Vglut 1/2 : transporteur vésiculaire du glutamate de type 1/2

¹ (Andres et al., 1999) ; ² (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003) ; ³ (Iwahori, 1977) ; ⁴ (Sakhi et al., 2014) ; ⁵ (Andres et al., 1999) ; ⁶ (Geisler et al., 2003; Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2016)

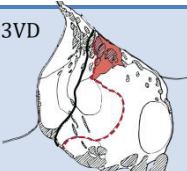
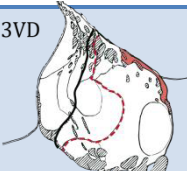
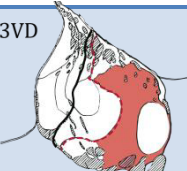
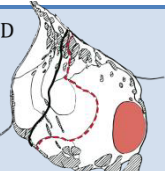
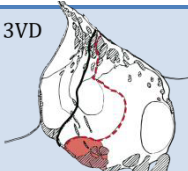
TABEAU 2 : POSITION ET CRITERES DELIMITANT LES DIFFERENTS SOUS-NOYAUX COMPOSANT LA PARTIE MEDIANE DE LA LHB (LHBM)

		LHbMA A : antérieure	LHbMS S : supérieure	LHbMPc Pc : parvocellulaire	LHbMC C : centrale	LHbMMg Mg : marginale
Position¹	(a) Bregma -1.22 (b) Bregma -1.70	(a) 3VD 	(b) 3VD 	(b) 3VD 	(b) 3VD 	(a) 3VD 
Structurale²	Neurones	Petites et moyennes cellules, multipolaires, éparpillées	Paquets de petites cellules avec de gros noyaux ovales	Paquets de petites cellules avec des petits noyaux ronds plusieurs fois invaginés	Moyennes cellules dont le noyau est souvent invaginé	Petites et moyennes cellules, multipolaires, éparpillées
(coupe semi-fine et microscopie électronique)	Neuropile	Neuropile clair traversé par des agrégats de fibres myélinisées	Neuropile traversé par peu de fibres myélinisées Larges dendrites obliques	Neuropile spongiforme et régulier traversé par de petites dendrites	Neuropile régulier traversé par de larges dendrites et des fibres myélinisées	Neuropile irrégulier traversé par de petites dendrites et largement par des paquets de petits axones myélinisés
Morphologie³ (Neurobiotine)	Forme des cellules	Sphérique/fusifforme/polymorphique	Sphérique/fusifforme	Sphérique/fusifforme/verticale/neurogliale	Sphérique/fusifforme/verticale	Sphérique/fusifforme
Activité électrique⁴	Motif des PA	Silencieux/tonique régulier et irrégulier	nd	Silencieux/tonique régulier et irrégulier/en bouffée	Silencieux/tonique régulier et irrégulier/en bouffée	nd
Innervations spécifiques⁵	Afférences	Fibres AVP	Fibres AVP	Fibres AVP	Fibres AVP	Fibres AVP
	Efférences	nd	LH/MnR/RMTg/VTA	LDTg/LH/MnR/RMTg/VTA	LH/MnR/RMTg/VTA	LDTg/MnR/RMTg
Profil cytochimique⁶ (expression génique et protéique)	<i>Vglut2</i>	nd	-	++	+	+
	<i>Gad65</i>	+	-	+	-	-
	<i>Htr5b</i>	-	-	-	-	-
	<i>Htr2c</i>	nd	++	+	++	-
	<i>Drd2</i>	nd	-	-	-	+
	<i>Kcnab2</i>	+	+	+	+	+
	<i>Pcdh10</i>	nd	++	++	++	-
	NF	++	-	-	-	++
	KIR 3.2	+++	+	+	+	+++
	GABA _B R	nd	+++	+++	++	+
TH	nd	+	++	+	-	

3VD : 3^e ventricule dorsal ; AVP : arginine-vasopressine ; Drd2 : récepteur dopaminergique D2 ; GABA_B-R : récepteur GABAergique de type B ; Gad65 : glutamate décarboxylase 65 ; Htr_{5b/2c} : récepteur sérotoninergique de type 5b/2c ; Kcnab2 : *Voltage-gated potassium channel subunit β2* ; KIR 3.2 : *Inward-rectifier potassium channel* ; LDTg : noyau latérodorsal du tegmentum ; LH : hypothalamus latéral ; MnR : noyau médian du Raphé ; nd: non déterminé ; NF : neurofilament ; PA : potentiel d'action ; Pcdh10 : protocadhérine 10 ; RMTg : noyau rostromédian du tegmentum ; TH : tyrosine hydroxylase ; Vglut 2 : transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 ; VTA : aire tegmentale ventrale

¹ (Andres et al., 1999) ; ² (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003) ; ^{3,4} (Weiss and Veh, 2011) ; ⁵ (Díaz et al., 2011; Zhang et al., 2016, 2018) ; ⁶ (Geisler et al., 2003; Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2016)

TABEAU 3 : POSITION ET CRITERES DELIMITANT LES DIFFERENTS SOUS-NOYAUX COMPOSANT LA PARTIE LATERALE DE LA LHB (LHBL)

		LHbLPc Pc : parvocellulaire	LHbLMg Mg : marginale	LHbLMc Mc : magnocellulaire	LHbLO O : ovale	LHbLB B : basale
Position	Bregma -1.70					
Structurale	Neurones	Petites cellules à peine visible	Peu de petites et moyennes cellules	Larges cellules	Larges cellules	Larges cellules
(coupe semi-fine et microscopie électronique)	Neuropile	Neuropile homogène traversé par des petites dendrites obliques et des paquets d'axones	Neuropile homogène traversé largement par de petites fibres myélinisées Cellules gliales séparant le neuropile de l'épendyme	Neuropile irrégulier traversé par de petites et grosses fibres myélinisées Dendrites longues et épaisses, obliques	Neuropile homogène traversé par de petits axones myélinisés Dendrites fines et petites	Neuropile irrégulier traversé par de petites et grosses fibres myélinisées Dendrites longues et épaisses
	Morphologie (Neurobiotine)	Forme des cellules	Sphérique	nd	Sphérique/fusiforme/ polymorphique/neurogliale	Sphérique/fusiforme/ polymorphique/verticale
Activité électrique	Motif des PA	Tonique régulier	nd	Silencieux/tonique régulier et irrégulier/en bouffée	Tonique régulier et irrégulier	Tonique régulier et irrégulier
Innervations spécifiques	Afférences				EPN (somatostatine)	
	Efférences	MnR/RMTg	MnR/RMTg/VTA	LH/MnR/RMTg/VTA	LH/RMTg/VTA	RMTg/VTA
Profil cytochimique (expression génique et protéique)	<i>Vglut2</i>	+	nd	++	++	nd
	<i>Gad65</i>	-	-	-	-	-
	<i>Htr5b</i>		nd	++	++	nd
	<i>Htr2c</i>	++	nd	++	++	nd
	<i>Drd2</i>	-	nd	++	++	nd
	<i>Kcnab2</i>	+	+	+	+++	+
	<i>Pcdh10</i>	++	nd	+	-	nd
	NF	-	+	++	+++	+
	KIR 3.2	-	+	++	+++	-
	GABA _B R	+++	+	+	-	-
TH	+	+	+	-	-	

3VD : 3^e ventricule dorsal ; Drd2 : récepteur dopaminergique D2 ; EPN : noyau entopédonculaire ; GABA_B-R : récepteur GABAergique de type B ; Gad65 : glutamate décarboxylase 65 ; Htr_{5b/2c} : récepteur sérotoninergique de type 5b/2c ; Kcnab2 : *Voltage-gated potassium channel subunit β2* ; KIR 3.2 : *Inward-rectifier potassium channel* ; LH : hypothalamus latéral ; MnR : noyau médian du Raphé ; nd: non déterminé ; NF : neurofilament ; PA : potentiel d'action ; Pcdh10 : protocadhérine 10 ; RMTg : noyau rostromédian du tegmentum ; TH : tyrosine hydroxylase ; Vglut 2 : transporteur vésiculaire du glutamate de type 2 ; VTA : aire tegmentale ventrale

¹ (Andres et al., 1999) ; ² (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003) ; ^{3,4} (Weiss and Veh, 2011) ; ⁵ (Andres et al., 1999; Díaz et al., 2011) ; ⁶ (Geisler et al., 2003; Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2016)

INTRODUCTION

a. Morphologie

Une coloration de Golgi appliquée sur des coupes cérébrales de chat fait apparaître des petits neurones (\varnothing 6 à 10 μm) dont le corps cellulaire est en forme de poire avec des dendrites épineuses ou en forme allongé avec des dendrites lisses dans la MHb (Iwahori, 1977). En revanche, dans la LHb de chat ou de rat, les cellules sont souvent de taille moyenne à large (\varnothing 15 à 25 μm) et de formes diverses (voir **FIGURE 11** ; Iwahori, 1977; Weiss & Veh, 2011) :

- Les cellules sphériques représentent la grande majorité des neurones de la LHb (40 %). Elles possèdent un soma rond ($\approx 15 \mu\text{m}$) duquel partent trois dendrites primaires lisses qui restent confinées dans une petite zone sphérique proche du soma.
- Les cellules fusiformes représentent $\frac{1}{3}$ des neurones de la LHb. Elles possèdent un soma allongé ($\approx 18 \mu\text{m}$) duquel partent deux à trois dendrites lisses qui s'étendent largement des deux côtés mais restent à l'intérieur de l'habénula.
- Les cellules verticales possèdent un soma en forme de sphère ou de poire ($\approx 17 \mu\text{m}$) duquel partent les dendrites épineuses qui s'étirent verticalement sur plus de 300 μm sans quitter l'habénula.
- Les cellules polymorphiques possèdent un corps cellulaire de forme ronde à triangulaire ($\approx 25 \mu\text{m}$), dont les ramifications de dendrites épineuses (4 à 7 primaires) atteignent les aires thalamiques adjacentes.
- Les cellules de forme neurogliale possèdent un corps cellulaire irrégulier ($\approx 13 \mu\text{m}$) duquel part une dense arborisation de dendrites lisses et fines limitée à une zone proche du soma.

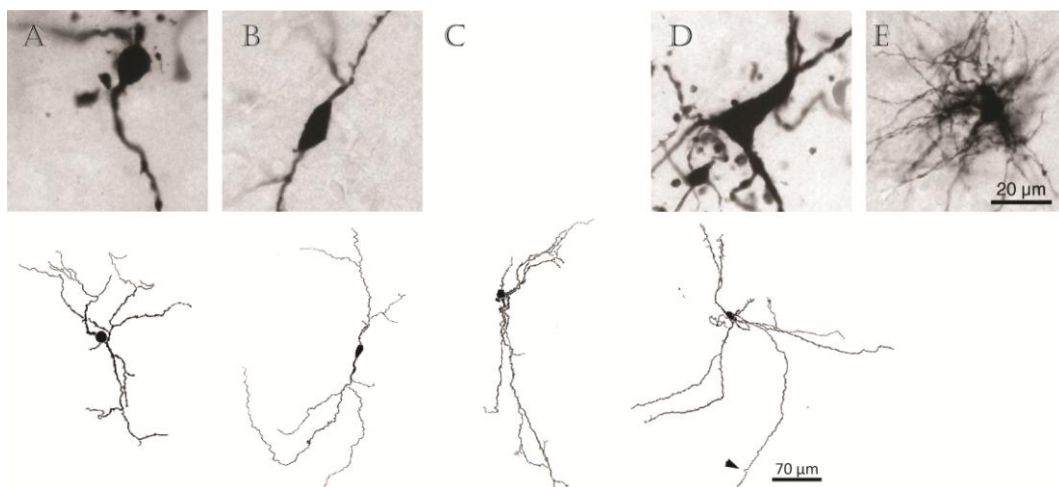


FIGURE 11 : DIFFÉRENTES MORPHOLOGIES DES CELLULES DE LA LHb. Les corps cellulaires et leurs prolongements des neurones de la LHb ont été marqués à la neurobiotine (photo du haut) puis reconstruit à l'aide d'une caméra lucida. Différents types de neurone de forme sphérique (A), fusiforme (B), verticale (C), polymorphique (D) et neurogliale (E) peuvent ainsi être observés. Adapté de Weiss & Veh, 2011.

b. Activité électrique

Ces mêmes travaux répertorient différents motifs de décharges spontanées de potentiels d'action (silencieuses, toniques régulières, toniques irrégulières et en bouffée), les plus grosses populations de la LHb étant silencieuses et toniques (voir **FIGURE 12**). Les cellules de la MHb, par contre, présente une activité tonique ou silencieuse avec des dépolarisations de faibles amplitudes qui n'aboutissent

L'habénula, ses caractéristiques – Une structure hétérogène

pas à un potentiel d'action (Kim & Chang, 2005; Kowski et al., 2009; Weiss & Veh, 2011; Sakhi et al., 2014a, 2014b). Les canaux HCN¹ présents à la surface des cellules de la LHb lui confèrent une activité intrinsèque de pacemaker qui régulerait constamment les noyaux monoaminergiques (Poller et al., 2011). Chez le poisson zèbre, les neurones de l'habénula dorsale déchargent spontanément selon un motif particulier, qui a permis de les regrouper en clusters (Jetti et al., 2014; Fore et al., 2017). Il est possible que l'habénula des mammifères ait gardé ces groupes mais ils ne correspondent pas aux noyaux décrits structurellement (Wagner et al., 2017).

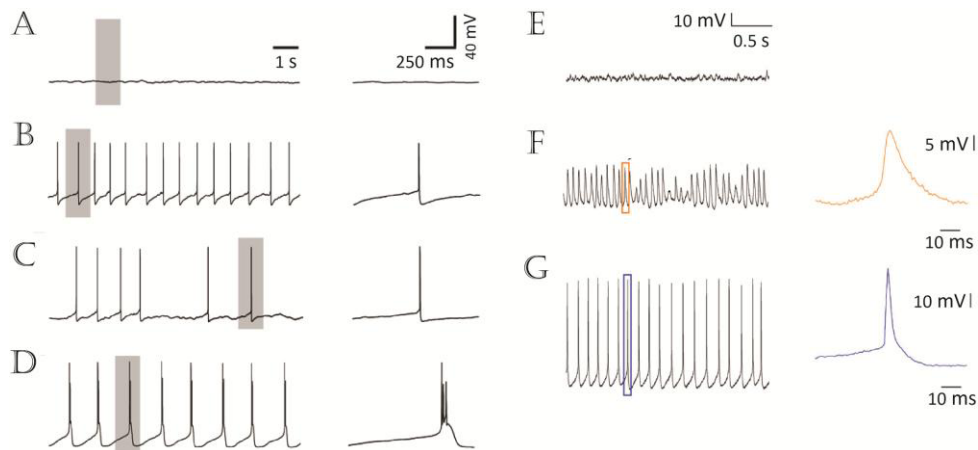


FIGURE 12 : DIFFERENTS MOTIFS DE DECHARGES SPONTANÉES DE L'HABENULA. Les neurones de la LHb présentent un profil silencieux (A), tonique régulier (B), tonique irrégulier (C) ou en bouffée (D). Ceux de la MHb présentent une activité électrique spontanée silencieuse (E), des dépolarisations de faibles amplitudes qui n'aboutissent pas à un potentiel d'action (F) ou un profil tonique régulier (G). Un agrandissement des potentiels d'action des zones grisées ou colorées est observable à droite de leur enregistrement respectif. Adapté de Weiss & Veh, 2011; Sakhi et al., 2014a.

c. Neurotransmission

Dans la MHb, la transmission est avant tout glutamatergique et cholinergique. La partie supérieure se distingue en exprimant préférentiellement le gène du transporteur vésiculaire du glutamate 1 (*Vglut1*) ainsi que celui de la substance P (Brinchwitz et al., 2010; Aizawa et al., 2012). Les neurones de la partie inférieure sont majoritairement cholinergiques et certains co-libèrent du glutamate alors que ceux de la partie latérale et centrale sont essentiellement glutamatergiques dont certains co-transmettent de l'acétylcholine (Aizawa et al., 2012).

Dans la LHb, la transmission est exclusivement glutamatergique mais à la différence de la MHb les cellules n'expriment que les transporteurs vésiculaires glutamatergiques *Vglut2* et *Vglut3* (Herzog et al., 2004b; Brinchwitz et al., 2010; Aizawa et al., 2012).

Un sous-groupe de neurones très localisé dans la MHb médiane et la LHb exprime l'enzyme permettant de synthétiser le GABA, la glutamate décarboxylase (GAD) 65 ou 67 (voir les TABLEAUX 1 et 2; Belin et al., 1982; Brinchwitz et al., 2010; Wagner et al., 2016). Néanmoins comme le soulignent les auteurs D.S. Zahm & D.H. Root, il faut que l'habénula possède les transporteurs vésiculaires du GABA (*vGAT*) nécessaires à son empaquetage pour une libération synaptique (Zahm &

¹ De l'anglais *hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated cation channel*

INTRODUCTION

Root, 2017). Récemment, Zhang *et al.* viennent de prouver dans leur nouvelle publication l'existence de ces interneurons GABAergiques. Ils sont situés dans la division médiane de la Lhb et envoient plusieurs collatérales faire synapses sur d'autres neurones dans la Lhb, ce qui impliquerait une suppression globale de l'activité de la Lhb. Certains rejoignent également le *fasciculus retroflexus* afin d'inhiber d'autres structures (Zhang *et al.*, 2016, 2018).

d. Caractéristiques moléculaires

L'habénula, en tant que centre intégrateur, reçoit énormément d'informations de diverses origines. De ce fait, une grande variété de récepteurs est observée (voir FIGURE 13).

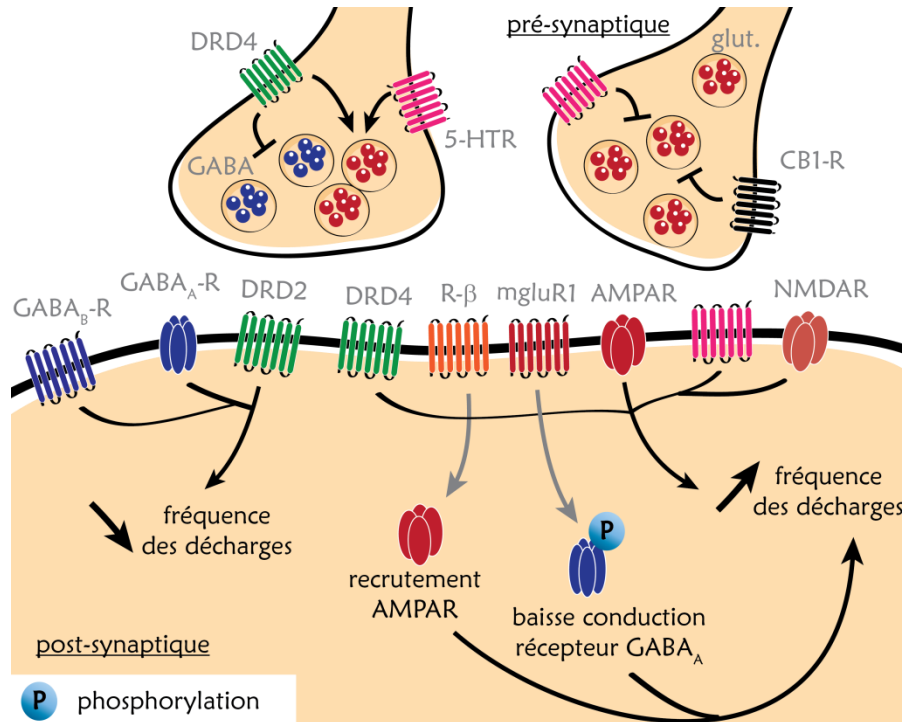


FIGURE 13 : EXPRESSION DES DIFFERENTS RECEPTEURS AU SEIN DE LA LHB. Les neurones de la Lhb peuvent être soit glutamatergiques soit GABAergiques (interneurones). Différents types de récepteur sont exprimés à leur surface afin de moduler leur fréquence de décharge. Les récepteurs GABA_A (GABA_A-R), GABA_B (GABA_B-R) et dopaminergiques D2 (DRD2) entraînent une diminution du potentiel de membrane et ainsi, de la fréquence des décharges. Au contraire, les récepteurs dopaminergiques (DRD4), sérotoninergiques (5-HTR) et glutamatergiques (AMPA, NMDAR) entraînent l'augmentation de la fréquence des décharges. De plus, les récepteurs noradrénergiques (R-β) et glutamatergiques (mgluR1) augmentent indirectement la fréquence des décharges en recrutant des AMPAR et en abaissant la conduction des GABA_A-R par phosphorylation respectivement. En pré-synaptique, les récepteurs modulent la libération des neurotransmetteurs. D'un côté, le DRD4, les 5-HTR et le récepteur endocannabinoïde (CB1-R) inhibent la libération des vésicules GABAergiques ou glutamatergiques. D'un autre côté, le DRD4 et les 5-HTR favorisent la libération des vésicules glutamatergiques.

dji. Les monoamines

- Modulation dopaminergique

La transmission dopaminergique repose sur des récepteurs couplés à des protéines G. Il est généralement admis que les récepteurs dopaminergiques de type 1 (D1 et D5) activent la production

L'habénula, ses caractéristiques – Une structure hétérogène

d'AMP¹ cyclique *via* la protéine $G\alpha_s$, et de ce fait activent la protéine kinase A. *A contrario*, les récepteurs dopaminergiques de type 2 (D2, D3 et D4) régulent négativement la production d'AMP cyclique en activant la protéine $G\alpha_{i/o}$ (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). L'habénula exprime tous les types de récepteur, de D1 à D5 (Dawson et al., 1988; Bouthenet et al., 1991; Aizawa et al., 2012; Good et al., 2013; Khaled et al., 2014; Root et al., 2015; Zhang et al., 2018), mais le type 2 est plus largement représenté que le type 1 (Dubois et al., 1986; Savasta et al., 1986; Mansour et al., 1992).

La dopamine a un rôle ambivalent. D'une part, elle inhibe l'activité des neurones de l'habénula *via* les récepteurs D2 (Good et al., 2013; Jhou et al., 2013). D'autre part, elle dépolarise les neurones situés majoritairement dans la division médiane de la LHB (Kowski et al., 2009; Good et al., 2013), tout comme les amphétamines, la cocaïne ou tout autre substance augmentant le niveau dopaminergique dans la synapse. Cette activation est dépendante de canaux potassiques et des récepteurs post-synaptiques D4. La dopamine facilite la libération glutamatergique en activant des récepteurs pré-synaptiques D4 couplés à des canaux ioniques non sélectifs situés sur des afférences glutamatergiques (Good et al., 2013). De même, elle permet la levée de l'inhibition GABAergique par l'activation de ces mêmes récepteurs D4 couplés cette fois-ci aux protéines $G\alpha_{i/o}$ (Good et al., 2013).

- Modulation noradrénergique

Les récepteurs adrénergiques sont divisés en deux familles. Les récepteurs α sont considérés inhibiteurs à cause de leur couplage aux protéines $G\alpha_{i/o}$, et les récepteurs β excitateurs car ils sont couplés aux protéines $G\alpha_s$ (O'Dell et al., 2015). L'expression des ARN messagers codant pour les récepteurs β_1 et β_2 est observée dans la MHB ; ces messagers sont aussi exprimés dans la LHB mais dans une moindre mesure (Nicholas et al., 1993). Les récepteurs β permettent le recrutement de récepteurs glutamatergiques AMPA² et favorisent la perméabilité aux ions calciques des récepteurs glutamatergiques NMDA³ par la cascade de phosphorylation initiée par la protéine $G\alpha_s$ (Raman et al., 1996; O'Dell et al., 2015). De ce fait, ils augmentent la sensibilité des neurones à la transmission glutamatergique. Une particularité de la noradrénaline est à noter : elle a la capacité d'interagir avec le récepteur dopaminergique D4, et ainsi entraîner la dépolarisation des neurones de la LHB (Root et al., 2015).

- Modulation sérotoninergique

Les récepteurs sérotoninergiques représentent une vaste famille. Au moins 20 récepteurs ont été clonés lesquels sont répartis dans 7 catégories (5-HT₁₋₇) selon leurs propriétés moléculaires et pharmacologiques. Tous sont couplés à une protéine G excepté le type 3 qui dépolarise la membrane cellulaire par l'ouverture d'un canal cationique ligand-dépendant. Les types 1 et 5 sont généralement inhibiteurs et les types 5, 6 et 7 excitateurs en diminuant ou augmentant respectivement la concentration d'AMP cyclique. Le type 2 est également excitateur avec pour second messager l'inositol-3-phosphate (Pytliak et al., 2011; Tchenio et al., 2016).

Des études d'hybridation *in situ*, utilisant un ligand radioactif ou par microarray, ont révélé que la MHB et la LHB expriment plus ou moins intensément une grande variété de récepteurs sérotoninergiques de type 1, 2, 3, 5 et 7 (Mitchell & Pratt, 1991; Matthes et al., 1993; Wright et al.,

¹ Adénosine monophosphate

² α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate

³ N-méthyl-D-aspartate

INTRODUCTION

1995; Vizuite et al., 1997; Bonnin et al., 2006; Bull et al., 2006; Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2016). Des études électrophysiologiques *in vitro* démontrent que les récepteurs pré-synaptiques 5-HT₂ et 5-HT₃ facilitent les courants glutamatergiques (Xie et al., 2016). De même, l'activation de ces récepteurs en post-synaptique entraîne l'activation des neurones de la Lhb avec une augmentation du nombre de potentiels d'action (Zuo et al., 2016). Cependant, une sous-population de neurones de la Lhb voit sa transmission glutamatergique abaissée lorsque les récepteurs pré-synaptiques 5-HT₂ et 5-HT₃ ainsi que 5-HT_{1b} sont activés, empêchant de libérer leurs vésicules glutamatergiques (Shabel et al., 2012; Hwang & Chung, 2014; Xie et al., 2016). Ainsi, les récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃ ont un rôle différent selon leur position pré- ou post-synaptique et selon la sous-population de cellules de la Lhb dans laquelle ils sont exprimés, qui reste encore à caractériser.

- Transmission excitatrice

La transmission rapide et excitatrice dans la Lhb est majoritairement conduite par des récepteurs glutamatergiques (Maroteaux & Mameli, 2012; Meye et al., 2015). Quatre sous-unités forment le pore transmembranaire qui sera perméable aux ions en fonction des différentes sous-unités qui le composent. Selon leur affinité à des agonistes, on distingue différents groupes de récepteurs : AMPA, NMDA et kaïnate (Traynelis et al., 2010). L'activation des récepteurs AMPA entraîne une dépolarisation des neurones par simple fixation du ligand alors que les récepteurs NMDA ont besoin pour être fonctionnel que la cellule atteigne un certain potentiel membranaire afin de libérer le magnésium entravant leurs canaux (Dingledine et al., 1999). Dans la Lhb, on retrouve une plus large proportion de récepteurs AMPA que NMDA (Maroteaux & Mameli, 2012).

Une transmission plus lente résulte de l'activation de récepteurs métabotropiques (mGluR) qui se traduit par une activation ou une inhibition selon la cascade protéique engendrée par la protéine G associée q, s ou i (Zou et al., 2017). L'habénula exprime les trois types de récepteurs (Valentinova & Mameli, 2016; Wagner et al., 2017). Ils sont généralement impliqués dans l'internalisation de certains récepteurs AMPA (ceux perméables aux ions calciques ; Meye et al., 2013). Au sein de la Lhb, il a été démontré que l'activation de mGluR1 déclenche une dépression à long terme aux niveaux des synapses excitatrices et inhibitrices. Au niveau des synapses excitatrice, la voie de signalisation de la protéine kinase C entraîne l'activation d'un récepteur endocannabinoïde localisé pré-synaptiquement, ce qui diminuera les courants excitateurs. Par la même voie de signalisation, la conduction des récepteurs post-synaptiques GABA_A est réduite par la phosphorylation de leur sous-unité, ce qui réduit les courants inhibiteurs (Valentinova & Mameli, 2016). De plus, mGluR1 est retrouvé sur les dendrites d'interneurones GABAergiques, suggérant un rôle dans la modulation de leur activation (Zhang et al., 2016, 2018).

- Transmission inhibitrice

La première source d'inhibition vient du GABA qui peut se fixer à deux grands types de récepteur, tous les deux exprimés dans l'habénula (Liang et al., 2000; Geisler et al., 2003; Allen Institute). Le récepteur ionotrope de type A (GABA_A) est un pentamère constitué des sous unités α , β et γ qui sont spécifiques à l'espèce (Meye et al., 2013). Son pouvoir inhibiteur vient du gradient imposé par le transporteur KCC2¹ qui est la principale voie d'expulsion des ions chlorures (Rivera et al., 1999). L'absence de ce transporteur dans la Mhb rend le GABA non plus inhibiteur mais excitateur chez la

¹ De l'anglais *potassium (K+) chloride (Cl-) cotransporter-2*

L'habénula, ses caractéristiques – Une structure hétérogène

souris (Kim & Chung, 2007; Choi et al., 2016; Wagner et al., 2016). Le récepteur métabotrope de type B (GABA_B) est couplé à une protéine G_{i/o} responsable d'un signal inhibiteur lent et plus tardif (Meyer et al., 2013). Bien que la MHb et le cervelet aient la plus forte expression de GABA_B en comparaison aux autres aires cérébrales, on en retrouve également dans la LHb (Liang et al., 2000).

d/ii. Autres neurotransmetteurs

Le marquage de l'acétylcholine estérase, l'enzyme permettant la dégradation de l'acétylcholine dans la fente synaptique, montre une innervation cholinergique des deux parties de l'habénula (Geisler et al., 2003; Wagner et al., 2014). Toutefois, les récepteurs nicotiques sont particulièrement localisés dans la MHb. Plus de 95% de ses neurones expriment les sous-unités α_3 , α_4 , α_5 , β_2 et β_4 , et 40% expriment en plus les sous-unités β_3 , α_6 , α_7 (Sheffield et al., 2000). Bien que les fonctions de ces récepteurs et leur voie de signalisation moléculaire dans l'habénula soient peu étudiées, il est intéressant de noter que ces différentes sous-unités sont impliquées notamment dans l'addiction de plusieurs drogues (tabac, cocaïne) et dans le sevrage à la nicotine ainsi qu'à la morphine (Viswanath et al., 2013; Velasquez et al., 2014).

d/iii. Les neuropeptides & hormones

- AVP

Il a été montré chez les rats que la LHb exprime les récepteurs vasopressinergiques 1a et b alors que seul le récepteur AVP 1b a été reporté pour la MHb (Hernando et al., 2001; Zhang et al., 2018). Ces récepteurs sont des protéines à 7 domaines transmembranaires qui activent la phospholipase C par l'intermédiaire d'une protéine G α_q (Birnbaumer, 2000; Orcel et al., 2009). Le récepteur AVP 1b a la particularité d'activer également la voie de l'AMP cyclase (protéine G α_s) en fonction de la concentration de son ligand (Orcel et al., 2009). L'ocytocine dont la structure est très proche de l'AVP, peut se lier également aux deux récepteurs V1 de l'AVP (Stoop, 2012).

- Orexines

Les récepteurs orexinergiques 1 et 2 sont exprimés au niveau de la LHb (Marcus et al., 2001; Ch'ng & Lawrence, 2015; Zhang et al., 2018). La voie de signalisation est plus complexe pour ces récepteurs localisés aussi bien en pré-synaptique qu'en post-synaptique. Bien qu'une dépolarisation soit observée dans la majorité des cas lors de l'ajout d'orexine dans le milieu, celle-ci peut aussi entraîner un effet hyperpolarisant. En effet, les deux récepteurs peuvent être reliés aux différentes protéines G α_q , G α_i ou G α_s voire directement commander l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs (Leonard & Kukkonen, 2014). Il n'y a pas encore d'études décryptant les voies de signalisation utilisées par l'orexine dans la LHb.

- Autres

Pour finir, l'habénula synthétise encore une multitude de récepteurs dont le récepteur à la prokinétine 2 (Cheng et al., 2002), au VIP (Vertongen et al., 1997), au neuropeptide Y (Kopp et al., 2002), aux opioïdes (Pert et al., 1976; Atweh & Kuhar, 1977; Aizawa et al., 2012), aux œstrogènes (Zhang et al., 2018), à la neurotensine (Jennes et al., 1982; Ray & Price, 1990), à la somatostatine (Vincent et al., 1985; Hervieu & Emson, 1998), à la kisséptine (Wagner et al., 2016), à la mélatonine (Ng et al., 2017) et aux glucocorticoïdes (Arriza et al., 1988; Morimoto et al., 1996).

INTRODUCTION

e. Corrélation entre espèces

L'habénula est une structure très conservée. L'habénula dorsale du poisson zèbre équivaldrait à l'homologue de la MHb des mammifères selon des critères moléculaires (neurones cholinergiques et/ou glutamatergiques ou exprimant la substance P) et ses connexions (projections sur le noyau interpedonculaire) alors que la partie ventrale correspondrait à la LHb (expression du gène codant pour la protocadhérine 10 ; projections sur les noyaux monoaminergiques ; [Amo et al., 2010](#); [Stephenson-Jones et al., 2012](#); [Fore et al., 2017](#); [Grillner et al., 2017](#); [Loonen & Ivanova, 2017](#)). De plus, on discrimine l'habénula dorsale de la ventrale avec une asymétrie très marquée entre les deux hémisphères chez les espèces éloignées phylogénétiquement ([Bianco & Wilson, 2009](#); [Aizawa, 2013](#); [Dreosti et al., 2014](#); [Loonen & Ivanova, 2017](#)). Par exemple, on observe une latéralisation des fonctions chez le poisson zèbre : la lumière et les odeurs activant respectivement l'habénula gauche et droite ([Dreosti et al., 2014](#)). Bien que cette asymétrie tende à disparaître chez les mammifères, il a été récemment observé une asymétrie de forme entre l'habénula droite et gauche chez l'humain par imagerie à résonance magnétique (IRM ; [Concha & Wilson, 2001](#); [Ahumada-Galleguillos et al., 2017](#)). De plus, l'IRM fonctionnelle montre une activation asymétrique de l'habénula lors de tâches aversives ou dans un contexte de punition ([Lawson et al., 2014](#); [Hennigan et al., 2015](#)).

Plusieurs études se sont arrêtées sur la caractérisation des noyaux intrinsèques de l'habénula chez le rat sans trouver de corrélation entre la localisation des cellules, leur morphologie, leur profil électrique ou leur marqueur moléculaire ([Andres et al., 1999](#); [Geisler et al., 2003](#); [Kim & Chang, 2005](#); [Kowski et al., 2009](#); [Weiss & Veh, 2011](#); [Aizawa et al., 2012](#)). Des noyaux homologues ont été retrouvés dans l'habénula de souris en gardant les critères structuraux et cytochimiques ([Wagner et al., 2014](#)). Néanmoins, on observe quelques différences entre espèces. Le récepteur GABA_A active les neurones de la MHb chez la souris alors qu'il n'est pas exprimé chez le rat ([Wang et al., 2006](#); [Choi et al., 2016](#)). Chez l'Homme, cinq sous-noyaux ont été décrits jusqu'à présent dans la LHb. La LHb apparaît moins fragmentée, puisque les données ultra-structurales ou morphologiques ne sont pas encore autant abouties que chez les rongeurs ([Díaz et al., 2011](#)). La MHb de l'Homme est beaucoup plus étroite : elle occupe 9% de la surface de l'habénula contre 24% chez les rongeurs ([Díaz et al., 2011](#)). L'hypothèse serait qu'au cours de l'évolution, de plus en plus d'informations en réponse aux pressions environnementales exercées sur le cerveau furent transmises à la LHb, nécessitant donc une augmentation de son volume ([Aizawa et al., 2011](#)).

f. Connectivité

f.i. Connexion interne

La LHb reçoit des informations internes par des boutons synaptiques provenant d'axones « de passages » (pas de formation de « vraies » terminaisons proprement dites) projetant vers une autre structure. Ces connexions viennent soit de la MHb soit de la LHb elle-même pour s'adresser à d'autres réseaux neuronaux ([Andres et al., 1999](#); [Geisler et al., 2003](#); [Kim & Chang, 2005](#); [Omelchenko et al., 2009](#)). Parmi les cellules de la LHb, des interneurons GABAergiques présentant la capacité « d'éteindre » des réseaux spécifiques de la LHb ont été découverts (se reporter à la **partie 4|2.c**). Cependant, il n'a pas encore été reporté de neurones de la LHb communiquant avec ceux de la MHb ([Kim & Chang, 2005](#)).

f)ii. Pré-synapses

On peut imaginer plusieurs théories en ce qui concerne la modulation de l'habénula : (1) Elle peut être monosynaptique et deux axones de deux neurones distincts terminent donc sur l'habénula. (2) Ou bien elle est bisynaptique auquel cas un interneurone entre en jeu. (3) Il se peut qu'un même neurone envoie deux collatérales dont l'une est excitatrice et l'autre inhibitrice. (4) A moins que dans une terminaison il y ait différentes vésicules remplies de différents neuromodulateurs, voire que ces derniers partagent la même vésicule (Malinow, 2016).

En ce qui concerne la voie projetant de l'aire tegmentale ventrale vers la LHb (VTA^{-LHb}), les études menées par le laboratoire du Dr Marisela Morales démontrent qu'une large majorité de ces neurones co-libère du glutamate et du GABA dans des vésicules séparées (Root et al., 2014b). Contrairement aux terminaisons de neurones de la voie VTA^{-NAC} qui accumulent des vésicules de dopamine et de glutamate dans des zones bien distinctes, celles de la VTA^{-LHb} sont multi-synaptiques et partagent la même zone. Une même terminaison créera des synapses excitatrices ou inhibitrices sur des épines dendritiques, une même dendrite voire différentes dendrites, ce qui reste à déterminer (Root et al., 2014b; Barker et al., 2016). De plus, selon la fréquence de décharges (une pulsation vs décharge tétanique) et le potentiel membranaire des neurones de la VTA, la libération sera en faveur du glutamate ou du GABA qui respectivement exciteront ou inhiberont les neurones de la LHb (Root et al., 2014b). Ainsi, la LHb montrera des réponses multimodales après la stimulation de la voie VTA^{-LHb} en réponse à l'activation différentielle des récepteurs post-synaptiques. Il faut ajouter également le fait que d'autres neurotransmetteurs comme la dopamine ou la sérotonine voire des hormones comme la mélatonine peuvent potentialiser la transmission glutamatergique ou la réduire (Shabel et al., 2012; Good et al., 2013; Zuo et al., 2013; Hwang & Chung, 2014; Evely et al., 2016; Xie et al., 2016). Ce type de modulation par co-libération permettrait de contrôler plus finement les comportements (Malinow, 2016). Cependant, une perturbation de la balance glutamate/GABA serait une cause de maladie psychiatrique comme l'addiction ou la dépression (se référer aux parties respectives 4|1.a et 4|1.h|i).

4|3. Afférences & efférences

Tout comme l'était l'expression de ses récepteurs, le réseau de la LHb est vaste. La majorité de ses connexions provient de l'aire préoptique, de l'hypothalamus latérale, du septum ainsi que du cortex préfrontal et elle-même projette massivement sur les noyaux monoaminergiques (voir FIGURE 14B ET C ; Herkenham & Nauta, 1977, 1979; Sutherland, 1982; Lecourtier & Kelly, 2007; Zahm & Root, 2017). Mais elle a surtout été étudiée pour ses connexions réciproques avec la VTA. Dans cette partie, certaines des connexions de la LHb ont été détaillées notamment avec les noyaux monoaminergiques parmi lesquels certains ont une libération rythmique de leur neurotransmetteur (ex. VTA, noyaux du Raphé ; Semba et al., 1984; Hood et al., 2010). La MHb quant à elle n'a pas cette même diversité d'afférences et d'efférences et sera détaillée dans la partie 4|3.f (voir FIGURE 14A).

a. Système monoaminergique

a)i. Innervation réciproque des noyaux dopaminergiques

Il existe une forte relation entre la LHb et la VTA. En effet, la VTA a besoin des projections du *fasciculus retroflexus* comme faisceau guide afin d'envoyer ses propres fibres innover la LHb, tandis que cette dernière a besoin de la production de molécules d'adhésion cellulaire venant des efférences de la VTA pour la bonne organisation de ses fibres sortantes (Schmidt et al., 2014).

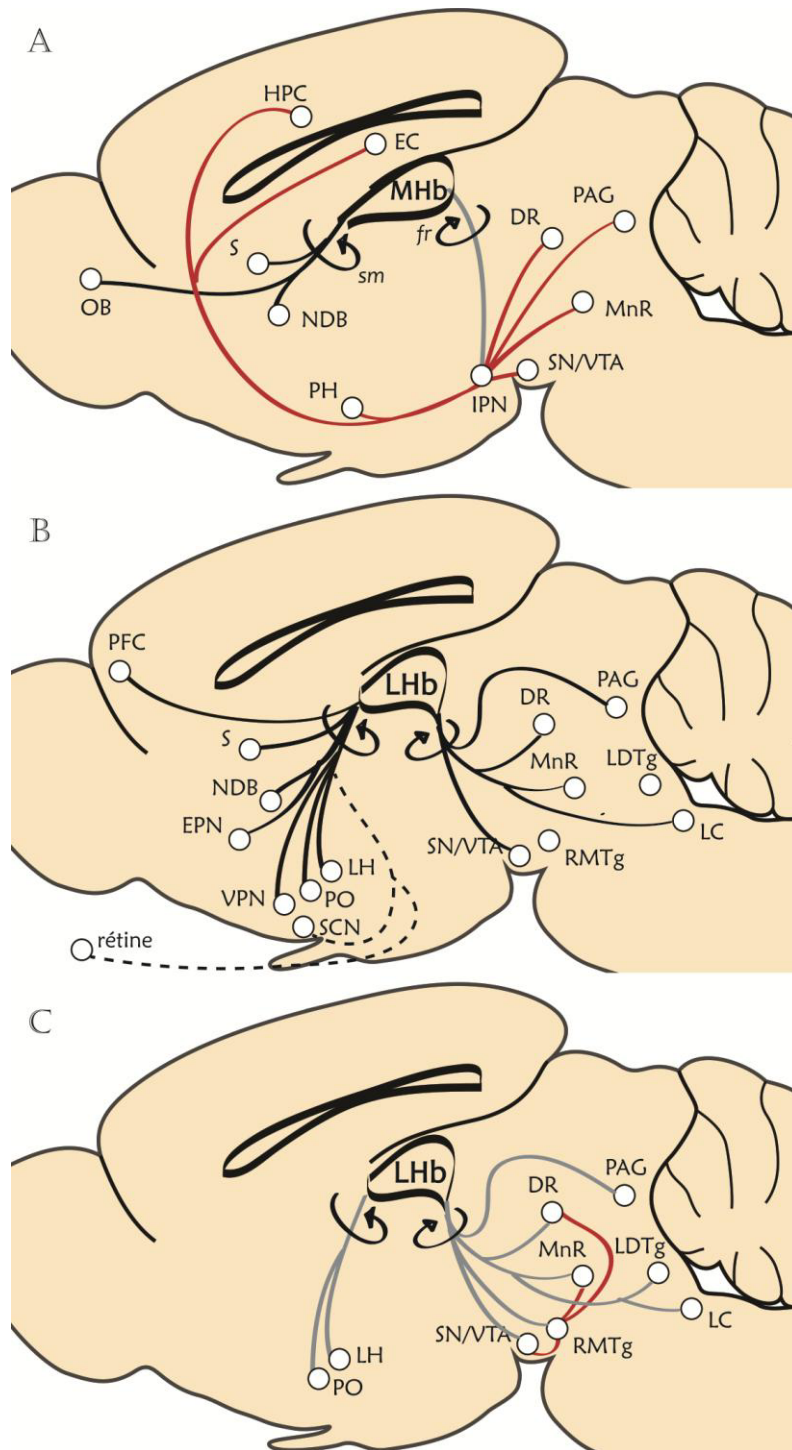


FIGURE 14 : AFFERENCES ET EFFERENCES DE L'HABENULA. (A) Afférences (en noir) et efférences (en gris) de la MHb. Les projections secondaires provenant de l'IPN sont représentées en rouge. (B) Les afférences (en noir) de la LHb. Les pointillés indiquent que la connexion est indéterminée ou qu'un relais est nécessaire. (C) Les efférences (en gris) de la LHb. Les projections secondaires provenant du RMTg sont représentées en rouge. DR : noyau dorsal du Raphé ; EC : cortex enthorinal ; EPN : noyau entopédonculaire ; *fr* : *fasciculus retroflexus* ; HPC : hippocampe ; IPN : noyau interpédonculaire ; LC : *locus caeruleus* ; LDTg : noyau latérodorsal du tegmentum ; LH : hypothalamus latéral ; MnR : noyau médian du Raphé ; NDB : noyau de la bande diagonale de Broca ; OB : bulbe olfactif ; PAG : substance grise périaqueducale ; PFC : cortex préfrontal ; PH : hypothalamus postérieur ; PO : aire préoptique ; RMTg : noyau rostromédian du tegmentum ; S : septum ; SCN : noyau suprachiasmatique ; *sm* : *stria medullaris* ; SN : substance noire ; VPN : noyau paraventriculaire ; VTA : aire tegmentale ventrale. Adapté de Klemm, 2004.

L'habénula, ses caractéristiques – Afférences & efférences

Nous avons longtemps pensé que la LHb recevait une innervation dopaminergique de la VTA à cause du marquage immunohistochimique contre la tyrosine hydroxylase (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003; Gruber et al., 2007; Kowski et al., 2009; Aizawa, 2013; Good et al., 2013; Jhou et al., 2013; Baker et al., 2015). Seulement, pour obtenir de la noradrénaline, la tyrosine hydroxylase est également nécessaire, ce qui signifie que cet immunomarquage pourrait être le reflet de l'innervation noradrénergique (Fernstrom & Fernstrom, 2007 ; voir partie suivante a|iii). Il se trouve que la VTA est également hétérogène. En effet, elle est composée de différentes populations de neurones glutamatergiques, GABAergiques et dopaminergiques (Barker et al., 2016). La voie VTA^{-LHb} ne peut pas être dopaminergique car la protéine responsable de la vésiculation de la dopamine (VMAT) est absente malgré l'expression de la tyrosine hydroxylase (Hnasko et al., 2012; Stamatakis et al., 2013; Root et al., 2014a, 2014b; Taylor et al., 2014). De plus, aucune libération de dopamine n'a été détectée par voltamétrie après stimulation de la VTA (Stamatakis et al., 2013; Root et al., 2015). Chez les rongeurs, au moins 95% des neurones de la voie VTA^{-LHb} sont glutamatergiques et 50 à 80% des neurones (respectivement chez le rat et la souris) co-expriment également du GABA (Hnasko et al., 2012; Stamatakis et al., 2013; Root et al., 2014a, 2014b; Taylor et al., 2014; Lammel et al., 2015). Cette hétérogénéité permet aux réseaux VTA-LHb de réguler plus finement les comportements. Dans un test de préférence de place, l'animal injecté avec une drogue (ex. cocaïne) dans un espace X aura tendance à y rester plus longtemps que dans un espace Y dans lequel aucune substance récompensante (ex. solution saline) ne lui a été injectée, et inversement dans un test d'aversion de place (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006). Ainsi, la stimulation optogénétique des neurones glutamatergiques de la voie VTA^{-LHb} entraîne une aversion de place tandis que la stimulation des neurones GABAergiques promeut au contraire une préférence de place (Stamatakis et al., 2013; Root et al., 2014a).

La LHb répond à la dopamine ou à l'apomorphine, un agoniste des récepteurs de type 2 (Kowski et al., 2009; Good et al., 2013). Cependant, la dopamine peut provenir d'un noyau autre que la VTA comme la substance noire *pars compacta* (SNpc), l'aire préoptique médiane ou d'autres noyaux hypothalamiques synthétisant de la dopamine et innervant la LHb (Li et al., 1993).

La voie LHb^{-VTA} se compose de neurones glutamatergiques de la LHb faisant directement synapse sur les cellules dopaminergiques de la VTA médiane ou les interneurons GABAergiques de la VTA (Omelchenko et al., 2009; Brown & Shepard, 2016). Cette voie n'utilise pas la transmission dopaminergique puisque 73% des neurones de la LHb la composant sont insensibles à l'administration de dopamine (Good et al., 2013). Elle est plutôt hyperactivée chez les animaux modèles de dépression à cause de la potentialisation de la transmission glutamatergique au niveau des récepteurs présynaptiques de la LHb (Li et al., 2011). Selon le modèle de Lammel *et al.*, la voie LHb^{-VTA} cible des neurones connectés à des structures impliquées dans l'aversion (Lammel et al., 2012 ; voir partie 4|1.a). Une autre hypothèse suggère que les neurones dopaminergiques de la VTA reçoivent sur leurs dendrites distales l'excitation directe de la LHb et sur leurs dendrites proximales les signaux inhibiteurs du noyau rostromédian du tegmentum (RMTg; Christoph et al., 1986; Ji & Shepard, 2007; Omelchenko et al., 2009; Brown & Shepard, 2016). De ce fait, les signaux excitateurs sont court-circuités.

a|ii. Innervation réciproque des noyaux du Raphé (sérotonine)

La stimulation électrique ou pharmacologique de la LHb conduit à une diminution de la libération des monoamines (dopamine et sérotonine) dans différentes aires cérébrales (Kalén et al., 1989; Han et

INTRODUCTION

al., 2016). La division médiane de la Lhb envoie des efférences vers les neurones sérotoninergiques du noyau médian du Raphé (MnR), de la partie caudale du noyau du Raphé et du noyau dorsal du Raphé (DR) ainsi que vers des interneurons GABAergiques du DR (Vertes & Linley, 2008; Quina et al., 2015; Tchenio et al., 2016; Metzger et al., 2017). La division latérale de la Lhb, quant à elle, atteint d'abord le RMTg qui inhibe les neurones glutamatergiques du DR (**voir partie suivante a|iv**; Metzger et al., 2017). Ainsi, différents réseaux de connexion permettent d'inhiber ou d'activer les noyaux sérotoninergiques. La lésion de l'habénula entraîne également une baisse dans la quantité de substance P libérée au niveau du DR, ce qui suggère une possible modulation directe de la MHb (Zhao et al., 2015a).

Comme pour la VTA, la projection de l'habénula sur les noyaux du Raphé est réciproque. Le MnR innerve majoritairement la division médiane de la Lhb (Vertes & Linley, 2008; Metzger et al., 2017). Finalement, une grande partie des neurones du Raphé ne sont pas exclusivement sérotoninergiques mais peuvent exprimer du glutamate, du GABA ou co-exprimer du glutamate et de la sérotonine (Metzger et al., 2017). Mais le type de neurones du Raphé projetant sur l'habénula n'est pas encore déterminé. A ce jour, seule la voie sérotoninergique du DR innervant la Lhb a été mise en évidence (Tchenio et al., 2016).

a|iii. Innervation par les noyaux noradrénergiques

La tyrosine hydroxylase permet de visualiser les fibres dopaminergiques ainsi que noradrénergiques. En revanche, la dopamine β -hydroxylase est l'enzyme spécifique de synthèse de la noradrénaline dont on observe l'immunoréactivité des fibres dans la Lhb et la MHb (Gruber et al., 2007; Aizawa et al., 2012). De plus, des études par traçage autoradiographique et des lésions des voies efférentes démontrent une innervation de l'habénula par le *locus caeruleus*, le noyau principal du cerveau produisant la noradrénaline (Kobayashi et al., 1975; Jones & Moore, 1977; Gottesfeld, 1983). Plus précisément, les fibres noradrénergiques provenant du *locus caeruleus* et des ganglions cervicaux supérieurs innervent particulièrement la partie rostrale de la MHb alors que seul le *locus caeruleus* innerve la Lhb (Gottesfeld, 1983).

a|iv. Projection sur le noyau rostromédian du tegmentum (RMTg)

La Lhb inhibe l'activité électrique des neurones de la VTA et de la SNpc (Christoph et al., 1986; Matsumoto & Hikosaka, 2007). Cependant, la quasi-totalité des neurones de la Lhb sont glutamatergiques. Un intermédiaire est donc nécessaire. En 2007, Ji et Shepard donnent la première évidence d'un intermédiaire GABAergique en utilisant des antagonistes GABA sur la VTA pour lever l'inhibition (Ji & Shepard, 2007). Des études de traçages et de microscopie électronique ont pu confirmer la projection de la Lhb sur les neurones GABAergiques du RMTg qui, à son tour, régule négativement les noyaux monoaminergiques comme la VTA, la SNpc ou le DR (Jhou et al., 2009a, 2009b; Kaufling et al., 2009; Brinschwitz et al., 2010; Balcita-Pedicino et al., 2011; Bernard & Veh, 2012; Lavezzi et al., 2012). Malgré ses multiples projections dans le mésencéphale, seule une sous-population de neurones de la Lhb innerve spécifiquement les noyaux du Raphé, la VTA ou le RMTg. En effet, très peu de neurones de la Lhb projettent des collatérales sur ces différentes structures, ce qui permet à la Lhb d'utiliser différents circuits pour moduler indépendamment les noyaux monoaminergiques (Bernard & Veh, 2012; Gonçalves et al., 2012; Petzel et al., 2017).

Selon le modèle de Lammel *et al.*, la voie Lhb^{→RMTg} cible des neurones de la VTA latérale qui projettent à leur tour sur le noyau accumbens (NAC) connu pour son implication dans les effets

récompensants (Lammel et al., 2012; Russo & Nestler, 2013 ; voir partie 4|1.a). La stimulation (optogénétique ou pharmacologique) de la LHb ou du RMTg provoque un comportement d'aversion : dans une boîte à deux compartiments, l'animal ira se réfugier dans le compartiment non associé à la stimulation (Stamatakis & Stuber, 2012; Jhou et al., 2013).

b. Système circadien

b/i. Innervation directe ou indirecte par le SCN

Plusieurs études immunohistochimiques montrent l'existence de fibres AVP innervant l'habénula suggérant un possible lien entre celle-ci et le SCN (Buijs, 1978; de Vries et al., 1981; Zhang et al., 2016). Néanmoins, une lésion de l'horloge principale n'entraîne aucune modification du marquage AVP environnant l'habénula (Hoorneman & Buijs, 1982; Rood et al., 2013). De même, la LHb exprime fortement le récepteur à la prokinétine 2, laquelle est une sortie neuronale de l'horloge du SCN entraînée par la lumière (Cheng et al., 2002, 2005). L'expression d'une protéine fluorescence verte (GFP) sous le contrôle du promoteur de la prokinétine 2 a permis la mise en évidence de l'innervation prokinétinergique du SCN (Zhang et al., 2009). Cependant, les auteurs ne mentionnent qu'une faible présence voire une absence de marquage fluorescent dans la LHb. Il se trouve que les régions de l'aire préoptique médiane, de l'hypothalamus latéral, du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus et du septum latéral (toutes les quatre projetant sur la LHb), sont également innervées par le SCN *via* des fibres prokinétinergiques (Zhang et al., 2009; Hernández et al., 2015; Zahm & Root, 2017). Sans oublier que la prokinétine 2 est aussi un des facteurs diffusibles du SCN ce qui implique que ce dernier peut moduler à distance l'activité d'autres horloges (Silver et al., 1996; Cheng et al., 2002). D'autres voies intermédiaires sont envisageables comme la voie des glucocorticoïdes, la voie vasopressinergique *via* le noyau du lit de la *stria terminalis* (BNST) ou le PVN et la voie sérotoninergique *via* le noyau du Raphé cependant elles doivent encore être confirmées fonctionnellement (Semba et al., 1984; Balsalobre et al., 2000; Glass et al., 2000; Vertes & Linley, 2008; Rood et al., 2013; Zhang et al., 2013; Hernández et al., 2015).

b/ii. Innervation par la rétine

Une autre afférence du système circadien est celle de la rétine par qui les informations lumineuses arrivent au reste du système nerveux central. Une connexion directe a été observée chez des rats par injection de toxine cholérique marquée dans la rétine (et inversement) mais les ipRGC, dont le rôle est de transmettre des informations non photiques, s'arrêtent à la limite dorsale de la LHb (Qu et al., 1996; Reuss & Decker, 1997; Hattar et al., 2006). Plusieurs évidences attestent la connexion entre ces deux structures. Tout d'abord, la protéine C-FOS est exprimé durant la nuit ou la nuit subjective dans la LHb d'animaux nocturnes tandis qu'un flash lumineux augmente la quantité de cellules exprimant ce facteur de transcription, chez un rongeur diurne (Tavakoli-Nezhad & Schwartz, 2005, 2006; Shuboni et al., 2015). De plus, une stimulation photique de la rétine entraîne une augmentation, une réduction ou une inhibition complète de l'activité des cellules de la LHb chez le rat et de l'habénula dorsale gauche chez le poisson zèbre (Zhao & Rusak, 2005; Dreosti et al., 2014; Cheng et al., 2017). Il serait possible que l'effet d'une stimulation lumineuse diffère selon le type cellulaire de la LHb. De plus, cette réponse à la lumière est différente si le stimulus arrive durant le jour ou la nuit subjectif de l'animal (Zhao & Rusak, 2005). Mais cette réponse arrive tardivement, laissant supposer l'implication d'un relais. Chez le poisson zèbre, un noyau dans le thalamus antérieur dont les fibres innervent l'habénula reçoit des projections de la rétine et répond également aux stimulations lumineuses (Cheng et al., 2017). Cette voie thalamo-habénulaire est impliquée lors de la modulation

INTRODUCTION

de l'activité locomotrice par la lumière bleue (Lin & Jesuthasan, 2017). Si un tel relais a été conservé à travers l'évolution, divers noyaux thalamiques et hypothalamiques chez les mammifères représentent de possibles candidats. En effet, l'hypothalamus latéral, l'aire préoptique et la région péri-habénulaire sont innervés par les ipRGC et la projection des deux premiers sur la LHb a déjà été démontrée (Hattar et al., 2006; Zahm & Root, 2017).

c. Système métabolique

cji. Innervation réciproque de l'hypothalamus latérale

Les neurones glutamatergiques provenant de l'hypothalamus latéral ciblent en particulier la division médiane de la LHb, en formant des boutons en passant (Poller et al., 2013; Stamatakis et al., 2016). Les neurones ciblés projettent ensuite sur la VTA ou le RMTg dont la proportion n'a pas encore été analysée (Poller et al., 2013; Lecca et al., 2017b). Ces neurones glutamatergiques de l'hypothalamus latéral sont importants pour moduler les comportements alimentaires, notamment ceux impliquant une nourriture plaisante, mais aussi dans l'aversion ou dans l'évitement de chocs électriques (Stamatakis et al., 2016; Lecca et al., 2017b). La LHb est également innervée par des fibres orexinergiques mais aucune étude sur une éventuelle co-libération avec le glutamate n'a été encore réalisée (Peyron et al., 1998; Baldo et al., 2003; Zhang et al., 2018). Comme une grande partie de ses afférences, il existe une projection réciproque provenant de la LHb (Zahm & Root, 2017).

d. Autres afférences

Les ganglions de la base (dont le *globus pallidus* interne ou le noyau entopédonculaire [EPN] chez les rongeurs et le pallidum ventral) projettent sur la LHb des fibres co-libérant du GABA et du glutamate (Shabel et al., 2012, 2014; Stephenson-Jones et al., 2016).

Des fibres marquées par l'AVP sont observées dans la LHb qui proviennent du PVN et possiblement du BNST ou de l'amygdale médiane (Buijs, 1978; Rood et al., 2013; Hernández et al., 2015; Zhang et al., 2016). Des fibres contenant du PACAP¹ innervent également l'habénula mais leur origine reste pour l'instant inconnue (Hannibal, 2002).

Parmi les autres afférences de la LHb, on peut citer également le septum latéral, l'aire préoptique, le cortex préfrontale, la bande diagonale de Broca, la substance grise périaqueducule (PAG) et l'hypothalamus antérieur (liste non exhaustive ; Herkenham & Nauta, 1977; Sutherland, 1982; Lecourtier & Kelly, 2007; Bianco & Wilson, 2009).

e. Autres efférences

Parmi les autres efférences de la LHb, on retrouve le noyau dorsolatéral du tegmentum (noyau cholinergique), la PAG, le noyau de la *zona incerta* et l'aire préoptique (liste non exhaustive ; Sutherland, 1982; Satoh & Fibiger, 1986; Herkenham & Nauta, 1979; Lecourtier & Kelly, 2007; Bianco & Wilson, 2009).

f. MHb

La MHb est innervée par le septum, par les fibres GABAergiques et cholinergiques de la bande diagonale de Broca, mais également par des structures sensorielles selon les espèces (le bulbe olfactif, la rétine, l'organe parapyramidal, la ligne latérale sur laquelle les électrorécepteurs détectent les

¹ De l'anglais *pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide*

champs électriques chez la lamproie ; **voir partie 4|1.e**) et projettent massivement sur le noyau interpédonculaire qui fait synapse sur les noyaux dopaminergiques, les noyaux du Raphé, le septum, l'hypothalamus postérieur, l'hippocampe et le cortex enthorinal (Klemm, 2004; Stephenson-Jones et al., 2012).

g. Macro-systèmes

Cette toute petite structure qu'est l'habénula se présente comme un relais entre les informations provenant des ganglions de la base et du système limbique (des émotions), et les noyaux monoaminergiques. Cependant elle ne fait pas office de simple relais. Elle intègre diverses informations émergeant de différentes parties du cerveau desquelles se dessinent des macro-systèmes (**voir FIGURE 15A** ; Heimer & Van Hoesen, 2006; Zahm, 2006; Geisler & Trimble, 2008). On distingue plusieurs macro-systèmes qui rassemblent des structures impliquées dans la même fonction cognitive ou comportementale :

- Complexe striatopallidum ventral impliqué dans le circuit de la récompense, les fonctions motivationnelles et émotionnelles (**voir partie 4|1.a**)
- Complexe striatopallidum dorsal impliqué dans l'exécution de comportements motivés par un but et le renforcement des comportements (**voir partie 4|1.a**)
- Complexe amygdale étendue impliqué dans les comportements de peur/menace/anxiété (**voir partie 4|1.b**)
- Complexe hippocampo-septal préoptique impliqué dans la mémoire et l'apprentissage (**voir partie 4|1.d**)
- Complexe rétine-SCN impliqué dans le système circadien (**voir partie 4|3.b et partie 4|2**)

De plus, le réseau se complexifie lorsque l'on ajoute les interconnexions entre les macro-systèmes. Ils finissent par converger vers l'habénula afin d'intégrer rapidement des informations corticales apparentées à l'état interne de l'animal et aux signaux environnementaux qui l'entourent, pour adopter le meilleur comportement à une situation donnée (Baker et al., 2015). Ainsi, la capacité de l'habénula à contrôler de différentes manières les monoamines lui confère une flexibilité aussi bien pour les fonctions cognitives que motrices.

4|1. Fonctions

Chez la lamproie et le poisson zèbre, les connexions sont simples car ils n'ont besoin que d'installations innées de comportements : un stimulus entraîne une réponse. Par exemple, la détection d'un stress ou d'un élément aversif comme un prédateur résultera à la fuite de l'animal ou à son immobilité (Stephenson-Jones et al., 2012; Lecca et al., 2017a; Lin & Jesuthasan, 2017). Plusieurs fonctions comme l'aversion, le stress ou l'activité circadienne auraient comme retombée comportementale une suppression de la locomotion (Hikosaka, 2010). Mais n'y a-t-il que cela ? Au cours de l'évolution, le système a nécessité de plus en plus de souplesse, d'apprentissage et d'anticipation sur les événements futurs (bons comme mauvais). Si on considère l'habénula comme un aiguilleur, soit elle renforcera le comportement en cours soit elle le changera en un autre comportement mieux adapté à la situation (Baker et al., 2015; Mizumori & Baker, 2017). Imaginons une proie comme une souris dont le but est de récupérer de la nourriture. Elle sait quel comportement adopter pour achever son but mais son état interne (faim vs satiété), l'éventualité de rencontrer un prédateur (jour vs nuit), son état de stress et la valeur motivationnelle et émotionnelle

INTRODUCTION

de son but, vont entrer en compétition pour décider si le jeu en vaut la chandelle (**voir FIGURE 15B**). Autrement dit si le but a assez de valeur pour prendre la peine de s’y risquer (Mizumori & Baker, 2017).

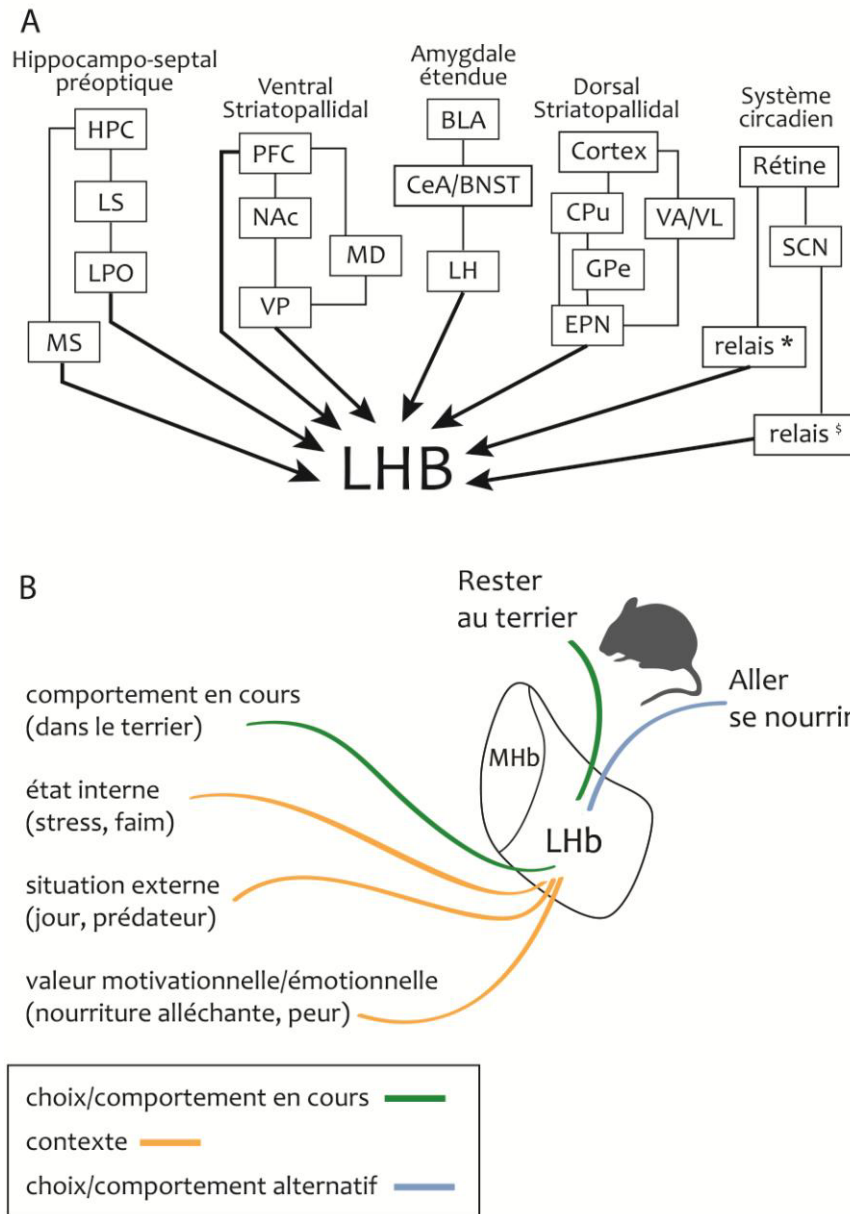


FIGURE 15 : MACRO-SYSTEMES CONVERGEANT VERS LA LHB ET LEUR INTEGRATION. (A) Différents macrosystèmes convergent vers la LHb. En ce qui concerne la rétine, plusieurs relais* potentiels existent comme la zone péri-habénulaire, l’aire préoptique et l’hypothalamus latéral. En ce qui concerne le SCN, plusieurs relais[§] potentiels existent comme l’aire préoptique médiane, l’hypothalamus latéral, le noyau paraventriculaire, le septum latéral, le BNST et les noyaux du Raphé. (B) La LHb intègre les informations provenant des macrosystèmes qui décrivent le contexte actuel (état interne de l’organisme, environnement externe, valeur émotionnelle/motivationnelle du but) pour décider du comportement à adopter (le renforcer ou en changer). BLA : amygdale basolatérale ; BNST : noyau du lit de la *stria terminalis* ; CeA : amygdale centrale ; CPU : caudé/putamen ; EPN : noyau entopédonculaire ; GPe : globus pallidus externe ; HPC : hippocampe ; MD : noyau médiodorsal du thalamus ; MS : septum médian ; LH : hypothalamus latéral ; LPO : aire préoptique latérale ; LS : septum latéral ; NAc : noyau accumbens ; PFC : cortex préfrontal ; SCN : noyau suprachiasmatique ; VA : noyau antérieur du thalamus ; VL : noyau latéral du thalamus ; VP : pallidum ventral. Adapté de Geisler & Trimble, 2008; Mathis, 2016; Mizumori & Baker, 2017.

Cette partie détaillera les différentes fonctions auxquelles l'habénula participe et les conséquences de sa défaillance.

a. Motivation & Aversion

Le système de la récompense est un réseau complexe composé de diverses structures cérébrales. Cependant, la communication entre la VTA et le NAc est la pierre angulaire de ce circuit (Russo & Nestler, 2013). La LHb entre dans ce réseau en inhibant les neurones de la VTA et de la SNpc, et reçoit des informations directes de la VTA ou indirectes du NAc (Christoph et al., 1986; Zahm, 2006; Ji & Shepard, 2007; Geisler & Trimble, 2008; Hnasko et al., 2012; Root et al., 2014b; Taylor et al., 2014). La LHb est notamment activée lors d'un événement aversif, d'une tâche sans récompense ou lors d'une erreur de prédiction comme l'absence d'une récompense attendue chez les rongeurs et les primates (Matsumoto & Hikosaka, 2007; Salas et al., 2010; Shabel et al., 2012; Lawson et al., 2014; Lecca et al., 2017a). L'IRM fonctionnelle cérébrale a permis de corrélérer le fonctionnement entre la VTA et la LHb à l'état de repos ainsi que lors d'évènements aversifs, ce qui a permis de confirmer chez les humains le fort couplage entre ces deux structures (Ely et al., 2016; Hennigan et al., 2015). Cependant, contrairement au NAc qui perçoit des afférences dopaminergiques de la VTA, la LHb n'est régulée que par le glutamate et le GABA libérés par la VTA (les différentes connexions entre la VTA et la LHb ont été détaillées précédemment dans la **partie 4|3.a|i**). La transmission GABAergique $VTA \rightarrow LHb$ promeut la préférence alors que la transmission glutamatergique $VTA \rightarrow LHb$ conduit à une aversion (Lammel et al., 2012; Stamatakis et al., 2013; Root et al., 2014a). La VTA n'est pas un simple composant dans le circuit de la récompense. Elle encode la valeur des événements qu'ils soient positifs ou négatifs (Berridge, 2007).

La LHb est une structure sensible aux drogues. Une dose de cocaïne ou de d-amphétamine, deux psychostimulants, baisse le métabolisme de la LHb, suggérant une moindre activation de ses neurones (Wechsler et al., 1979; London et al., 1986). La cocaïne, la d-amphétamine, la méthamphétamine, la MDMA¹ tout comme la nicotine engendrent une neurodégénérescence au niveau du *fasciculus retroflexus* (Carlson et al., 2000; Ellison, 2002; Lax et al., 2013). En raison du lien étroit entre la LHb et la VTA, les études se sont penchées sur son rôle dans la prise de drogue. La lésion de la LHb augmente la consommation d'éthanol comparée à celle des animaux contrôles « sham » mais ne perturbe pas la prise volontaire de cocaïne (Friedman et al., 2010; Haack et al., 2014). En revanche, l'animal continuera à rechercher sa dose même si celle-ci a été remplacée par du salin, ce qui suggère un déficit dans la reconnaissance de la récompense (Friedman et al., 2010). Comment déterminer alors si une action est bonne en l'absence de référence ? La LHb apparaît ici comme un frein pour retrouver son état basal, après l'arrivée d'une récompense. C'est à partir de ce constat que s'est développé la stimulation profonde du cerveau (DBS pour *Deep brain stimulation*) comme solution potentielle à l'addiction (Yadid et al., 2013). Les rats traités par DBS présentent une diminution de leur consommation de cocaïne ou de sucrose en auto-administration², l'extinction du comportement est plus rapidement mis en place et la rechute est moindre. Cependant tout ceci est possible tant que le *fasciculus retroflexus*, la voie de sortie de la LHb, reste intact (Friedman et al., 2010, 2011; Lax et al., 2013).

¹ 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine

² L'animal choisit de lui-même de s'auto-administrer ou non une solution (cocaïne, sucrose, amphétamine...) en faisant une action spécifique (appuyer sur un levier, mettre son museau dans un trou)

INTRODUCTION

Cette neurodégénérescence liée aux drogues précédemment observée par G. Ellison amena la théorie qu'elle serait la conséquence d'un déséquilibre entre le glutamate et le GABA : la prise de drogue lèverait l'inhibition de la LHb, ce qui provoquerait son hyperactivité (Ellison et al., 1996; Ellison, 2002). En effet, la cocaïne augmente le nombre de récepteurs AMPA au niveau de la LHb, ce qui augmente l'amplitude des courants excitateurs des neurones de la LHb et potentialise le signal glutamatergique (Maroteaux & Mameli, 2012; Meye et al., 2015). De plus, cette excitabilité est maintenue pendant plusieurs jours après l'administration de cocaïne (Zuo et al., 2013; Neumann et al., 2015). Bien que la cocaïne ait un effet récompensant et promeut une préférence de place, cet effet ne dure que durant les 15 minutes suivant l'injection. Plus tard, l'animal développe une aversion de place (Jhou et al., 2013). La cocaïne a donc un effet récompensant puis aversif. L'hyperactivité de la LHb peut venir de différentes afférences glutamatergiques (hypothalamus latéral, VTA, EPN) dont la stimulation entraîne aussi une aversion de place (Shabel et al., 2012; Root et al., 2014a; Stamatakis et al., 2016; Lecca et al., 2017a). La LHb activée recrute les neurones GABAergique du RMTg et de la VTA afin d'inhiber les cellules dopaminergiques de la VTA (Jhou et al., 2009b; Lammel et al., 2012; Tan et al., 2012). Ainsi lors du sevrage, l'augmentation des récepteurs GABA_A à la surface de la LHb pourrait indiquer un effet de compensation de l'hyperexcitabilité induite par la prise de drogues (Keys & Ellison, 1999).

Il ne faut pas croire que la LHb participe seulement aux tâches aversives ou ne délivrant pas de récompenses. En plus d'agir comme frein, elle permet l'évaluation entre deux récompenses dont la valeur et les risques n'ont pas le même poids. Un individu optera pour l'option qui comporte un risque minimum et une récompense maximum. Lors du choix d'une petite récompense toujours délivrée contre une plus grosse récompense dont l'obtention est variable, l'inactivation pharmacologique de la LHb ou du RMTg montre que les rats choisissent l'une ou l'autre option sans préférence réelle, bien qu'à risque égal ils préféreront la grosse récompense. Les rats distinguent bien la différence entre une petite et une grande récompense, cependant ils présentent un déficit de décision dans les choix biaisés (Stopper & Floresco, 2014). Encore faut-il se rappeler des options qui s'offrent à nous (voir partie 4|1.d sur la mémoire).

La MHb semble également participer à la régulation des comportements liés à l'addiction. Les études se sont plus focalisées sur le rôle qu'elle joue dans l'addiction à la nicotine au vue de la grande concentration des récepteurs nicotiques qu'elle exprime (Viswanath et al., 2013 ; voir partie 4|2.d|ii). Toutefois, la lésion de la MHb altère la préférence au sucrose et la locomotion motivée comme courir dans une roue, bien que l'activité basale reste identique aux animaux contrôles (Hsu et al., 2014). De plus, l'auto-administration de cocaïne, de morphine ou d'alcool est diminuée lorsque des antagonistes nicotiques sont diffusés dans la MHb (Viswanath et al., 2013). Malgré des résultats impliquant la MHb dans la prise de drogues, elle reste peu étudiée comparée à sa voisine.

b. Peur, stress et anxiété

Le stress est un facteur qui perturbe fortement l'équilibre psychique et/ou physiologique d'un individu. Il peut être associé à des pathologies telles que la dépression, l'anxiété ou le stress post-traumatique (Franklin et al., 2012).

On distingue la peur de l'anxiété. La première est la conséquence d'une menace directe dont on peut s'échapper et qui se dissipe rapidement lorsque le danger est écarté. L'anxiété est quant à elle due à

la perspective d'une menace ou d'un stress moins spécifique et moins prédictible qu'une peur (Davis et al., 2010; Okamoto & Aizawa, 2013).

Lors d'un stress pharmacologique ou physique, qu'il soit évitable ou inéluctable, une augmentation du marquage C-FOS est observée dans les neurones de la LHb projetant sur la VTA, le RMTg et le DR chez les rats (Chastrette et al., 1991; Kurumaji et al., 2003; Dolzani et al., 2016; Park et al., 2017). Si ce stress devient chronique, on constate une réduction de volume de la LHb et de la MHb chez les rats, réduction retrouvée également chez les patients dépressifs, mais pas chez ceux atteints de stress post-traumatique (Savitz et al., 2011a, 2011b; Jacinto et al., 2017). En ce qui concerne les rongeurs, ce changement morphologique est dû à une diminution du nombre de cellules neuronales et gliales ; ces dernières sont importantes pour la recapture du glutamate afin d'éviter une hyperactivation de la LHb (Cui et al., 2014; Jacinto et al., 2017). Il est possible de diminuer les comportements de type anxieux chez le rat si la LHb est lésée ou inhibée optogénétiquement lors d'un stress (Dolzani et al., 2016; Jacinto et al., 2017). On observe le même résultat lorsqu'on renforce la transmission GABAergique en distillant des agonistes dans la LHb, tandis que des antagonistes produiront des effets de type anxieux comme une diminution des visites des bras ouverts et du temps passés dans ceux-ci dans le labyrinthe en croix surélevé (Gill et al., 2013; Mathis et al., 2015). De plus, l'activation optogénétique des voies du septum et du BNST projetant sur la MHb induit l'apparition de comportements de peur ou de type anxieux chez les rats (Yamaguchi et al., 2013a).

c. Nociception

La nociception est un mécanisme permettant de détecter les stimuli potentiellement dangereux dans la nature (Julius & Basbaum, 2001).

Lors d'un pincement de la queue chez les rats, les neurones de la LHb répondent à la stimulation nociceptive par une augmentation ou une réduction de leur activité électrique (Zhang et al., 2013; Li et al., 2016). La stimulation de la LHb augmente la latence de retrait de la queue lorsqu'un stimulus nociceptif thermique au chaud est appliqué et augmente le seuil de réponse lors d'un stimulus nociceptif mécanique (Terenzi et al., 1990; Terenzi & Prado, 1990). De plus, la diffusion de glutamate ou de morphine dans la LHb mime cet effet analgésique alors qu'un prétraitement au naloxone (antagoniste des récepteurs opioïdes) l'atténue, suggérant l'activation d'une voie anti-nociceptive par la LHb (Terenzi & Prado, 1990). En effet des données immunohistochimiques, radiographiques et d'hybridation *in situ* montrent l'expression de récepteurs opioïdes dans la LHb et la MHb et leur innervation par des fibres produisant des enképhalines (Pert et al., 1976; Atweh & Kuhar, 1977; Shinoda & Tohyama, 1987; Aizawa et al., 2012). La LHb projette également sur la PAG qui prend part à la voie descendante en inhibant la nociception (Li et al., 1993; Behbehani, 1995)

d. Mémoire

Lors d'une tâche accompagnée d'une récompense, la LHb présente un grand pic d'activation lorsque la prédiction d'une récompense est erronée, autrement dit on s'attend à une récompense qui n'est pas venue (Matsumoto & Hikosaka, 2007, 2009). Néanmoins, on peut supposer que cette prédiction n'est possible que si l'individu se souvient à quoi est associée la cible (récompense ou non).

La piscine de Morris est une tâche conçue pour tester la mémoire spatiale. Elle consiste à retrouver une plateforme cachée sous l'eau à l'aide d'indices environnementaux. La mémorisation de la localisation est testée en enlevant la plateforme lors du test de rappel (Morris et al., 1982; D'Hooge

INTRODUCTION

& De Deyn, 2001). Les rats ayant une lésion de l'habénula présentent un déficit de mémoire. Ils ont besoin de plus de temps pour retrouver la plateforme cachée et pour se souvenir de son emplacement lors du test de rappel comparés aux animaux contrôles « sham » (Lecourtier et al., 2004). Plus précisément, l'habénula intervient dans l'encodage et le rappel de la mémoire spatiale lorsque ces processus sont engendrés en temps réel, ce qui nécessite une mémoire de travail fonctionnelle (Mathis et al., 2015, 2017; Baker et al., 2017). La formation hippocampique et le cortex préfrontal jouent un grand rôle dans la mémoire de travail et spatiale. L'habénula est ancrée dans ce réseau avec la MHb qui reçoit des afférences de l'hippocampe par l'intermédiaire du septum (Bianco & Wilson, 2009). De plus, la LHb, le cortex préfrontal et l'hippocampe présentent une synchronisation de leurs oscillations thêta durant l'apprentissage et les processus mnésiques (Aizawa et al., 2013b; Goutagny et al., 2013). Cette activité coordonnée permet la mise en place d'une plasticité entre ces structures et d'une flexibilité comportementale si les indices environnementaux changent (Mathis & Lecourtier, 2017; Mizumori & Baker, 2017). Ainsi, la déconnexion pharmacologique de la LHb et du cortex préfrontal diminue les performances de l'animal lors d'une tâche qui requière un effort cognitif important et entraîne un déficit dans la mémoire de travail (Mathis et al., 2017).

En résumé, l'habénula intègre le ressenti (émotions), l'environnement (indices lumineux, sonores ; danger immédiat), la stratégie en cours et l'expectation de son résultat afin de répondre par un comportement moteur adapté (Mathis & Lecourtier, 2017; Mizumori & Baker, 2017).

e. Intégration sensorielle

Dans les organismes moins complexes, l'habénula (l'équivalent de la MHb) reçoit des connexions des systèmes sensoriels (visuel, olfactif, champs électrique) afin de détecter d'éventuels prédateurs et d'amorcer une fuite ou une immobilité (Dreosti et al., 2014; Jetty et al., 2014; Stephenson-Jones et al., 2012). Cependant, il semblerait que ces afférences directes soient perdues chez les mammifères (Sutherland, 1982; Stephenson-Jones et al., 2012). Il est possible qu'ils intègrent les informations provenant de macro-systèmes pour ne plus avoir une simple réponse innée à un stimulus mais pour y associer un apprentissage.

f. Réponse motrice

L'hyperactivité de la LHb augmente l'immobilité tandis que la stimulation de la MHb ou l'inhibition de la LHb augmente l'activité locomotrice de l'animal, sans que le système moteur ne soit atteint (Li et al., 2011; Cui et al., 2014; Malinow, 2016; Otsu et al., 2018). De plus, le sectionnement du *fasciculus retroflexus* abolit l'activité de course dans la roue dont la valeur de récompense est élevée chez les hamsters (Paul et al., 2011). Bien que l'activité locomotrice soit régulée temporellement par le SCN, l'habénula y joue également un rôle. Un hamster aura une phase active en début de nuit et diminuera peu à peu son activité en fin de nuit jusqu'à ce que celle-ci soit totalement absente au début du jour. Cependant, lors de la section des afférences de la LHb, cette diminution en fin de nuit disparaît (Paul et al., 2011). L'habénula prend part à la locomotion motivationnelle mais également à la régulation basale de la locomotion.

g. Implication dans d'autres comportements

Il a été reporté dans la littérature d'autres comportements impliquant l'habénula. Les femelles ayant une lésion de la LHb présentent un sévère déficit dans leur comportement maternel qui inclut la

construction d'un nid, le soin aux petits et leur récupération si ils sont placés en dehors du nid pour les mettre à l'abri (Corodimas et al., 1993; Matthews-Felton et al., 1995). De plus, des récepteurs à l'œstrogène ont été observés sur les neurones de la LHb, suggérant une possible modulation de l'activité des neurones de la LHb par les hormones sexuelles (Zhang et al., 2018).

Quelques études se sont penchées sur l'implication de l'habénula dans l'agressivité. Chez les poissons zèbres par exemple, deux mâles sur un même territoire s'affronteront pour installer une hiérarchie sociale et partager les ressources selon le résultat. Le fait de réduire au silence l'habénula dorsale médiane¹ augmente le nombre de morsures, la durée des combats et leur initiation est plus rapide alors que réduire au silence l'habénula dorsale latérale¹ aura l'effet contraire (Chou et al., 2016). Chez les rats, la LHb n'initie pas les attaques mais module la sévérité de l'agression en renforçant *via* le système de la récompense le comportement agressif (Golden et al., 2016).

h. Maladies psychiatriques

h/ji. La dépression

La dépression est le plus commun des désordres psychiatriques. Elle est caractérisée par une baisse ou une absence de plaisir dans des tâches normalement plaisantes (anhédonie) et par une baisse de motivation (apathie), accompagnée par d'autres symptômes dont la présence d'idées noires voire suicidaires, une perturbation du sommeil, des fonctions cognitives et du comportement alimentaire. Elle est également associée à une diminution globale du niveau de monoamines dans le cerveau (Willner et al., 2013; Yang et al., 2018). Par sa capacité à moduler les centres monoaminergiques, l'habénula est une structure intéressante à étudier dans le cadre de la dépression. Des rats de différents modèles de dépression présentent une augmentation du métabolisme de l'habénula, suggérant une augmentation de son activité qui est corrigée par des antidépresseurs (Caldecott-Hazard et al., 1988; Shumake et al., 2003). De plus, l'augmentation de la transmission glutamatergique entraîne une hyperactivation de la LHb ainsi qu'une exacerbation des comportements de type dépressifs chez le rat et la souris (Cui et al., 2014; Han et al., 2016). La lésion de la LHb en revanche améliore le phénotype de type dépressif comme la baisse de l'immobilité dans le test de la nage forcée, en augmentant la sérotonine libérée par les noyaux du Raphé (Yang et al., 2008). L'hyperactivité de la LHb peut être due à une baisse de la quantité des transporteurs de la recapture glutamatergique (GLT1² et GLAST³) situés essentiellement sur les astrocytes ou à une forte expression de la β -CaMKII⁴ qui induit une augmentation des récepteurs AMPA au niveau post-synaptique. Les deux cas de figure engendrent un état de type dépressif avec une anhédonie et une immobilité plus prononcée qui est restaurée si l'activité des récepteurs AMPA ou celle de la β -CaMKII est inhibée (Cui et al., 2014; Li et al., 2011, 2013, 2017).

La dépression tout comme l'addiction entraîne une modification de la balance glutamate/GABA (se référer à la **partie 4|1.a**). Des rats au « profil dépressif » montrent une disparition de courant inhibiteur des neurones de la LHb comparés aux rats « normaux », tandis que ceux traités avec un antidépresseur (citalopram, un inhibiteur de la recapture sérotoninergique) montrent une augmentation de la transmission GABAergique. En d'autres termes, la LHb des rats au « profil

¹ N'est pas l'exact équivalent de la MHb des mammifères

² De l'anglais *glutamate transporter 1*

³ De l'anglais *glutamate aspartate transporter*

⁴ Protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante de type II

INTRODUCTION

dépressif » est plus excitable alors que la LHb des rats traités avec un antidépresseur l'est beaucoup moins (Li et al., 2011; Shabel et al., 2014). Si on augmente la transmission GABAergique dans la LHb à l'aide d'agoniste, il est possible d'améliorer le comportement de « type dépressif » (Winter et al., 2011; Lecca et al., 2016). Le même résultat est obtenu si le transporteur de la recapture glutamatergique est surexprimé (Kang et al., 2018). Bien que cette hyperactivation soit vérifiée chez les animaux modèles, il manque encore des preuves de celle-ci chez les patients dépressifs (Benarroch, 2015). En attendant, il est possible d'agir sur l'habénula pour traiter la dépression. La stimulation par DBS corrige les symptômes de « type dépressif » chez les rats en diminuant l'activité de la LHb mais également chez les patients réfractaires ne répondant plus aux traitements médicamenteux (Sartorius & Henn, 2007; Sartorius et al., 2010; Meng et al., 2011; Kim et al., 2016).

h/ii. La schizophrénie

La schizophrénie est une maladie psychiatrique qui se caractérise par des symptômes positifs (hallucinations, pensées désorganisées) et négatifs (retrait social, apathie). Certains symptômes, comme l'apathie, seraient la conséquence d'un dysfonctionnement dopaminergique dont le contrôle est normalement assuré par l'habénula (Ellison, 1994; Stopper & Floresco, 2015). De plus, les anti-psychotiques augmentent le métabolisme de l'habénula ce qui, contrairement à la dépression, indiquerait une hypoactivité de l'habénula à l'origine du désordre dopaminergique (Fakhoury, 2017). Les patients schizophrènes présentent également des déficits cognitifs impliquant la mémoire de travail, l'apprentissage (des erreurs), les fonctions exécutives, l'attention et les décisions biaisées (petit vs grand risque ou petite vs grande récompense) dans lesquels la LHb joue à chaque fois un rôle (Lecourtier et al., 2004; Hikosaka, 2010; Stopper & Floresco, 2014, 2015; Mathis et al., 2017).

4|2. Propriétés circadiennes de l'habénula

L'habénula contient une horloge : non seulement elle possède une machinerie moléculaire, mais elle reçoit également des informations provenant de l'environnement externe et régule les noyaux monoaminergiques afin de moduler les comportements aux meilleurs moments de la journée (sommeil, locomotion).

a. Expression rythmique de gènes et de protéines horloges

Contrairement au SCN, l'horloge moléculaire de la LHb n'est pas totalement élucidée. L'expression de quelques gènes et protéines horloges ont été reportés dans la LHb chez les rongeurs (Shieh, 2003; Christiansen et al., 2016). Les protéines BMAL1, CLOCK et PER2 montrent une expression rythmique et journalière par immunohistochimie et western-blot chez des souris élevées en cycle LD 12:12. De plus, la LHb conserve pendant quelques jours ses oscillations de PER2 lors de sa mise en culture *ex vivo*, dont le rythme disparaît chez les souris doublement mutées *Cry1-2* (Guilding et al., 2010; Sakhi et al., 2014b).

b. Activité électrique & rythmique

La MHb a différents profils de décharge (se référer à **la partie 4|2.b**). La proportion des différents profils change au cours du temps : à ZT0 (transition nuit/jour) la quasi-totalité des cellules a un profil tonique contrairement à ZT12 (transition jour/nuit) où 50 % de la population des cellules est soit silencieuse soit dépolarisée à faible amplitude (Sakhi et al., 2014a). La LHb et la MHb déchargent plus fréquemment (≈ 8 Hz vs. ≈ 2 Hz) à ZT8 qu'à ZT20. Une altération de l'horloge moléculaire (double

L'habénula, ses caractéristiques – Propriétés circadiennes de l'habénula

mutation¹ *Cry1-2*) entraîne une baisse de la fréquence dans la LHb, tandis qu'elle entraîne une augmentation de la fréquence dans la MHb. De plus, les deux structures perdent leur profil journalier (Sakhi et al., 2014a, 2014b).

c. Entrées potentielles de l'horloge

Le SCN peut potentiellement influencer l'habénula par des voies intermédiaires mais son implication reste encore à démontrer (**voir partie 4|3.b|i**). Plusieurs évidences montrent une connexion entre l'habénula et la rétine. Si cette connectivité est préservée entre les espèces, on peut s'attendre à trouver un relais thalamique qui transmettrait les informations lumineuses de la rétine (**voir partie 4|3.b|ii**). De plus, la LHb répond par des dépolarisations ou hyperpolarisations lors de stimulations lumineuses de la rétine dont l'activation est plus forte lors de la nuit subjective, et module des comportements locomoteurs (Zhao & Rusak, 2005; Dreosti et al., 2014; Cheng et al., 2017; Lin & Jesuthasan, 2017).

d. Sortie éventuelle de l'horloge

La sérotonine est reconnue pour promouvoir l'éveil et inhiber le sommeil paradoxal. La lésion du *fasciculus retroflexus* ou de la LHb contribue à une diminution du sommeil paradoxal, alors que l'hyperactivation de l'habénula va plutôt l'augmenter (Valjakka et al., 1998; Aizawa et al., 2013a; Cui et al., 2014). De plus, il apparaît que lors du sommeil paradoxal l'habénula et l'hippocampe observent des décharges synchrones dans les ondes thêta (Aizawa et al., 2013b; Goutagny et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la LHb promeut le maintien du sommeil paradoxal en inhibant les noyaux du Raphé.

¹ Mutation entraînant une perte de fonction

Objectifs

Ce travail de thèse a pour objectif de caractériser l'horloge présente dans l'habénula.

Premièrement, il nous a paru nécessaire de caractériser quels gènes horloges sont exprimés dans l'habénula, s'ils sont rythmiques et quel est leur déroulement temporel. Bien que d'autres études aient déjà rapporté ces faits, elles ont toujours été menées en cycle LD. Il reste donc à déterminer si l'expression de ces gènes est bien endogène (circadienne) à l'habénula en maintenant les animaux en DD. De plus, nous ne savons pas jusqu'à quel point les gènes horloges sont nécessaires aux oscillations circadiennes dans la LHb. Une altération de l'horloge moléculaire, comme une double mutation (perte de fonction) des gènes *Per*, nous a permis d'éclaircir sur ce point.

Deuxièmement, la LHb reçoit des afférences directes ou indirectes du système circadien (rétine, SCN). Malgré sa capacité d'osciller *ex vivo*, la LHb pourrait conserver en mémoire le rythme imposé *in vivo*. De ce fait, nous nous sommes interrogés sur le degré d'indépendance de la LHb vis-à-vis du SCN. En utilisant des souris transgéniques *Per2::luciférase* (*Per2^{Luc}*) nous permettant d'analyser l'horloge moléculaire, nous avons étudié différents paramètres (période, amplitude, phase) sur des explants d'habénula provenant d'animaux dont le SCN a été lésé électrolytiquement et bilatéralement, ou de leur contrôle « sham ».

Troisièmement, plusieurs évidences montrent une connexion entre la perception de la lumière et l'habénula (marquage C-FOS, activité électrique). La lumière étant le plus puissant des *zeitgebers*, nous avons joué sur son absence (DD) ou sa présence constante (LL) pour comprendre ses effets sur l'horloge de la LHb en utilisant notre modèle transgénique *Per2^{Luc}*.

Enfin, il a déjà été observé une modification de l'horloge dans le striatum et le SCN par la dopamine et la sérotonine respectivement (Glass et al., 2000; Hood et al., 2010). La LHb reçoit diverses informations par de multiples neurotransmetteurs et neuropeptides. Il apparaît essentiel d'étudier quelles molécules peuvent altérer l'horloge pour ensuite remonter à quelles structures peuvent modifier l'horloge de la LHb, selon les informations qu'elles lui transmettent. Par exemple, la LHb et les systèmes monoaminergiques sont étroitement liés. De ce fait, nous voulons examiner l'impact d'une concentration croissante de dopamine ou de sérotonine sur les différents paramètres de l'horloge de l'habénula provenant de souris *Per2^{Luc}*, ainsi que d'autres molécules comme la noradrénaline, l'orexine A et la vasopressine.

Matériels & Méthodes

Les techniques utilisées ainsi que les résultats des expériences menées sont décrites dans les articles soumis à publication et associés à ce manuscrit, et n'ont donc pas de partie propre. Ici, seront donc développés les design des expériences ainsi que les différents modèles utilisés.

1. Hybridation *in situ* – Article 1

1|1. Mutation *Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}*

Ces deux lignées de souris transgéniques ont été créées par le même laboratoire, dans l'équipe du Dr Allan Bradley¹. La recombinaison homologue a permis de supprimer 4.3 kb entre les exons 4 et 18 du gène *Per1* et d'y placer une cassette comportant le gène de l'hypoxanthine phosphoribosyl transférase. En ce qui concerne la mutation du gène *Per2*, 2.1 kb contenant la moitié du domaine PAS² B et le motif PAC³ (soit deux exons) ont été remplacés par une cassette néomycine (Zheng et al., 1999, 2001). Ces mutations entraînent un raccourcissement de la période de l'activité locomotrice lorsque les animaux sont placés en DD (en moyenne *Per1*, 22.6h; *Per2*, 22.1h; WT, 23.7h) avec une perte de la persistance du rythme pour la mutation *Per2* au bout d'une à trois semaines en DD. La double mutation *Per1-2* résulte en une arythmicité de l'activité locomotrice dès le placement de l'animal en DD.

Les protéines PER1-2 sont essentielles au bon fonctionnement de l'horloge circadienne. Leur absence n'aboutit plus à l'entraînement de l'horloge sur 24h, ce qui engendrera un libre ajustement aux signaux environnementaux (Albrecht et al., 2001; Zheng et al., 2001).

1|2. Design expérimental

Les souris knockout (KO) entraînant une perte de fonction des protéines PER1 et 2 ainsi que leur contrôle, ont été sacrifiées toutes les 3h en obscurité constante. Si le rythme est gardé dans des conditions gardées constantes, alors nous avons une expression circadienne des gènes étudiés. L'activité locomotrice n'a pas été enregistrée ce qui ne permet pas de calculer le temps circadien de chaque animal. De ce fait, nous avons projeté le ZT du jour précédent qui s'approche théoriquement du temps circadien (voir FIGURE 16).

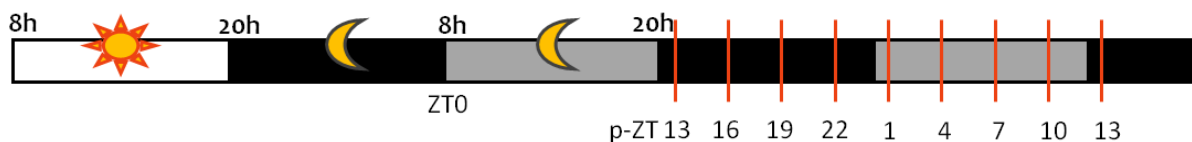


FIGURE 16 : DESIGN EXPERIMENTAL DE L'HYBRIDATION *IN SITU*. Les souris (groupe KO et contrôle) ont été hébergées selon un cycle LD12:12 puis ont été transférées en DD 24h avant le début du premier sacrifice à p-ZT13. Puis les animaux ont été sacrifiés toutes les 3h. Barre blanche : jour ; barre grise : jour subjectif ; barre noire : nuit subjective. p-ZT : *zeitgeber* projeté ; ZT : *zeitgeber*.

¹ *brdm* vient de « bradley mutation »

² *Per-Arnt-Sim* l'abréviation de *Period – ArylHydrocarbon Receptor Nuclear Translocator – single-minded protein*

³ De l'anglais *PAS-associated C-terminal*

2. Bioluminescence – Article 1 & 2

En annexe, le protocole de bioluminescence que nous avons publié chez bio-protocole recense les produits, les outils et les solutions que l'on a utilisé lors de la microdissection des échantillons. Dans ce protocole, la technique utilisant la matrice est détaillée et non pas le vibratome que j'ai utilisé pour ces travaux de thèse.

2|1. Protéine de fusion PER2::LUC

Au laboratoire, nous avons entretenu la lignée PER2::LUC générée par knock-in (KI) sur fond C57BL/6J. Le transgène *Per2^{LUC}* est la fusion entre le gène *Per2* et celui de la luciférase (*Luc*) : le gène *Luc* est inséré entre le dernier exon de *Per2* et sa séquence régulatrice 3'UTR (Yoo et al., 2004). Ainsi, la protéine de fusion ne reflète pas seulement l'expression génique de *Per2* mais également toutes les régulations que subit la protéine PER2.

Il existe d'autres animaux modèles exprimant la luciférase comme gène rapporteur : *Per1-luciférase* ou *Bmal1-Eluciférase*. Les rats *Per1-luciférase* possèdent la luciférase, provenant de la luciole, sous le contrôle du promoteur du gène *Per1* ; la bioluminescence émise reflète donc l'activité des facteurs de transcription BMAL1:CLOCK (Yamazaki et al., 2000). Les souris exprimant le transgène *Bmal1-Eluciférase*¹ ont le gène de la luciférase issue d'un scarabée *Pyrearinus termitilluminans* sous le contrôle du promoteur du gène *Bmal1* (Nakajima et al., 2010). Cette luciférase particulière émet un signal lumineux 10 fois plus fort que celle de la luciole. Ainsi elle permet une meilleure résolution spatiale et temporelle lors d'acquisition en imagerie.

Les expériences de bioluminescence issues de ses travaux de thèse sont réalisées chez des souris transgénique PER2::LUC. D'une part, les oscillations des explants PER2::LUC reflètent la vie de la protéine PER2 avec toutes les régulations post-traductionnelles qu'elles pourraient subir. D'autre part, ces oscillations sont plus stables, robustes et pour certains tissus (ex. SCN, rétine) une plus grande amplitude que celles provenant de tissus *Per1-luciférase* (Jaeger, 2014).

2|2. Séparation rostro-caudale

L'habénula est une structure longue et étroite : sa largeur est aux alentours de 700 µm à son niveau le plus bombé et atteinte près 1.2 mm de longueur chez la souris. De plus, il existe des différences structurales et moléculaires le long de l'axe rostro-caudal. La division antérieure de la partie médiane de la LHb n'existe que dans la partie rostrale dans laquelle la MHb est présente en majorité (**voir le TABLEAUX 2 ; Andres et al., 1999**). Le marquage des fibres vasopressinergiques et orexinergiques dépend également de l'axe rostro-caudal (Zhang et al., 2016, 2018). Par exemple, un plus fort marquage vasopressinergique est observé dans la partie centrale de l'habénula. De ce fait, nous nous sommes demandés si les oscillations différaient entre l'habénula rostrale (Hbr) et caudale (Hbc).

Pour pouvoir récupérer des échantillons d'une épaisseur constante avec peu de variabilité anatomique, nous avons utilisé le vibratome afin de découper des tranches coronales de 500 µm d'épaisseur (**voir FIGURE 17**). Nous nous sommes basés sur la commissure habénulaire pour repérer le début de la Hbc et nous sommes remontés rostralement. Le bloc de cerveau était inclus dans le

¹ Le E signifiant augmenté de l'anglais *enhanced*

gélatine et des glaçons de milieu HBSS étaient placés dans la cuve remplie de HBSS afin de palier à l'augmentation de température due aux vibrations du milieu.

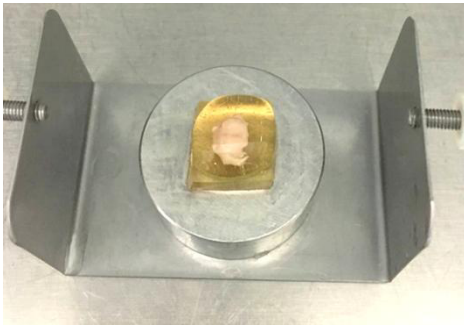


FIGURE 17 : PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON. Avant d'utiliser le vibratome, l'échantillon contenant l'habénula est inclus (face rostral) dans de la gélatine à 5%. Le tout repose sur un bloc de gélatine à 20% collé au support mobile du vibratome.

2|3. Design expérimental

a. Article 1

Pour éclaircir si l'horloge circadienne de l'habénula est indépendante ou non vis-à-vis du SCN, nous sommes partis du postulat que le SCN, en tant qu'horloge principale, donnait le temps à l'habénula. Pour tester cette hypothèse, des souris transgéniques exprimant la PER2::LUC ont été opérées afin d'effectuer une lésion électrolytique bilatérale du SCN. Une des conséquences de cette opération est d'altérer l'activité locomotrice qui a été monitorée afin de s'assurer de la bonne lésion du noyau. Après deux semaines en DD pour éviter tout effet synchronisateur de la lumière, les souris ont été sacrifiées (CT6-9) et les échantillons microdisséqués (Hbr et Hbc) afin de les mettre en culture dans le LumiCycle.

Nous nous sommes également intéressés à l'influence de la lumière ou son absence sur les oscillations de l'habénula. En effet, l'habénula reçoit également des connexions provenant de la rétine, bien qu'indirecte, qui pourraient affecter ses oscillations. Nous avons donc générés trois groupes : les animaux sont restés en cycle LD12:12, en DD ou en LL. Cette dernière condition perturbe également l'activité locomotrice tout comme l'avait fait la lésion du SCN et a également été monitorée. Pour réduire le nombre d'animaux, les résultats du groupe contrôle « sham » de l'expérience précédente en obscurité constante ont été repris. Après 6 semaines en LL, les souris ont été sacrifiées (13h-16h) et les échantillons microdisséqués (Hbr et Hbc) afin de les mettre en culture dans le LumiCycle.

b. Article 2

Afin d'étudier comment les monoamines ou d'autres neuropeptides altèrent le fonctionnement de l'horloge de l'habénula, des explants de souris transgéniques PER2::LUC ont été récupérés (Hbr et Hbc) et ont été mis en culture dans le LumiCycle. Le milieu de culture a été ensuite changé tous les trois jours, après cinq jours de baseline, en y augmentant à chaque fois la concentration des molécules cibles (dopamine, noradrénaline, sérotonine, AVP, oréxine).

Article 1

A suprachiasmatic-independent circadian clock(s) in the habenula is affected by *Per* gene mutations and housing light conditions in mice

Nora L. Salaberry, Hélène Hamm, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl and Jorge Mendoza
Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, CNRS UPR-3212, 5 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France

Short title: Circadian self-timing in the habenula

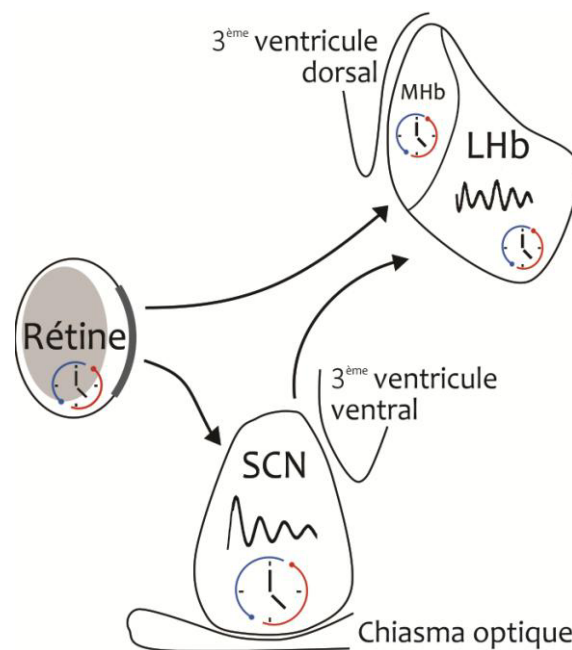


FIGURE 18 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ETUDE. Dans cette partie, nous avons voulu étudier l'expression endogène des gènes horloges de l'habénula, mais également ses liens avec le système circadien (SCN, rétine)

Dans ce premier article, nous avons accompli les 3 premiers objectifs de ce travail de thèse – c'est-à-dire i) la caractérisation moléculaire de l'horloge située dans l'habénula, ii) son indépendance ou non vis-à-vis du SCN et iii) les effets de la lumière sur cette horloge (**voir FIGURE 18**).

Dans cette étude, nous avons pu démontrer par la technique d'hybridation *in situ* que les gènes *Clock*, *Cry2* et *Rev-erba* ont un profil d'expression, circadien puisque leur expression garde une rythmicité lorsque les conditions sont maintenues constantes (DD). De plus, ce rythme perd sa stabilité sans les deux protéines PER1 et PER2.

Nous avons également montré en analysant la bioluminescence  mise par des explants provenant de souris PER2::LUC, la robustesse de l'horloge circadienne de l'habénula qui garde une p eriod et une amplitude constante quelque soit les conditions lumineuses (LD, DD ou LL). En outre, l'horloge est indépendante du SCN bien qu'elle nécessite la lumière pour garder ces oscillateurs coupl es (rostral et caudal)..

Abstract

For many years, the suprachiasmatic nucleus (SCN) was considered as the unique circadian pacemaker in the mammalian brain. Currently, it is known that other brain areas are able to oscillate in a circadian manner. However, many of them are dependent on, or synchronized by, the SCN. The Habenula (Hb), localized in the epithalamus, is a key nucleus for the regulation of monoamine activity (dopamine, serotonin) and presents circadian activity; nonetheless, the clock properties of the Hb are not fully described. Here we report, first, circadian expression of clock genes in the lateral habenula (LHb) under constant darkness (DD) condition in wild-type mice which is disturbed in double *Per1^{-/-}-Per2^{Brdm1}* clock mutant mice. Second, using *Per2::luciferase* transgenic mice we observed a self-sustained oscillatory ability (PER2::LUCIFERASE bioluminescence rhythmicity) in the rostral and caudal part of the Hb of arrhythmic SCN-ablated animals. Finally, in *Per2::luciferase* mice exposed to different lighting regimens (light-dark, constant darkness or constant light), the period or amplitude of PER2 oscillations, in both the rostral and caudal Hb, were similar. However, under DD condition or from SCN-lesioned mice, these two Hb regions were out of phase, suggesting an uncoupling of two putative Hb oscillators. Altogether, these results suggest that an autonomous clock in the rostral and caudal part of the Hb requires integrity of circadian genes to tick, and light information or SCN innervation to keep synchrony. The relevance of the Hb timing might reside in the regulation of circadian functions linked to motivational (reward) and emotional (mood) processes.

Keywords

circadian; habenula; Per2 luciferase; suprachiasmatic; clock genes

Introduction

In humans, and in other species, circadian rhythms consist of behavioral, physiological and molecular changes that follow a roughly 24h-period and are sustained in constant environmental conditions (Mohawk et al. 2012). Most, if not all, of these rhythms are under the control of the principal clock localized in the hypothalamus: the suprachiasmatic nucleus (SCN; Welsh et al. 2010). The ability of the SCN circadian clock to maintain a rhythmic self-sustained activity bases on a molecular clockwork involving clock genes such as *Clock*, *Bmal1*, *Per1-3*, *Cry1-2*, and *Rev-Erb α* , regulating each other in the form of positive and negative loops (Takahashi et al. 2008). Clock gene expression is not limited to the SCN and has been described in other extra-SCN circadian pacemakers such as the olfactory bulb, the retina or the lateral habenula (Granados-Fuentes et al. 2004; Guilding and Piggins 2007; Ruan et al. 2008).

The Habenula (Hb) is a small brain structure localized in the epithalamus (formed by the Hb and the pineal gland) and conserved amongst vertebrates (Concha and Wilson 2001). Its lateral part emerged as a key nucleus for dopamine and serotonin control (Christoph et al. 1986; Lecourtier and Kelly 2007; Matsumoto and Hikosaka 2007). The lateral Hb (LHb) receives various inputs from the forebrain such as the lateral septum, preoptic area, entopeduncular nucleus and prefrontal cortex (Zahm and Root 2017). It projects directly and indirectly, *via* the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), to monoaminergic nuclei like the ventral tegmental area (VTA), the *substantia nigra pars compacta* and the raphe nuclei (Sutherland 1982; Lecourtier and Kelly 2007; Brinschwitz et al. 2010; Lammel et al. 2012). Due to its diverse connections, the LHb is involved in many brain processes such as reward, aversion, maternal behavior, pain, anxiety, memory and sleep (Sutherland 1982; Bianco and Wilson 2009; Hikosaka 2010; Aizawa et al. 2013; Mathis et al. 2015). Hence, the LHb acts as a relay which integrates an extensive amount of information from various areas linked to behavior or cognitive functions, to define the most appropriate behavioral strategy.

LHb neurons fire rhythmically and show circadian rhythms in the expression of the PER2 clock protein *ex vivo* (Zhao and Rusak 2005; Guilding et al. 2010). Unlike the SCN, the molecular machinery in the Hb is not totally characterized. The expression of some clock genes and proteins has been reported in the LHb in rats and mice (Shieh 2003; Christiansen et al. 2016); but, only the expression of BMAL1, CLOCK and PER2 proteins showed daily rhythms in the mouse LHb in a light-dark cycle (Wyse and Coogan 2010; Zhao et al. 2015). However, to what

ARTICLE 1

extend clock genes are necessary to keep circadian oscillations in the LHb remains to be determined to our knowledge. The LHb receives direct or indirect inputs from structures involved in circadian regulation such as the retina and SCN (Qu et al. 1996; Zhao and Rusak 2005; Zhang et al. 2009). Despite good evidence for circadian activity in the LHb (Guilding et al. 2010), its degree of SCN-dependence is still unknown. Hints for direct SCN projection to the LHb can be seen through the presence of prokineticine 2 fibers (Zhang et al. 2009). The SCN might also project to the LHb indirectly *via* the lateral hypothalamus, lateral septum and ventral posterior nucleus, but these connections remain to be confirmed (Guilding and Piggins 2007; Poller et al. 2013; Hernández et al. 2015). In addition, the rat and mouse LHb responds to retinal photo-stimulation, and in *zebrafish* circadian behavior is driven by blue light, a signal transmitted by the retina through a thalamo-Hb pathway (Zhao and Rusak 2005; Dreosti et al. 2014; Sakhi et al. 2014b; Shuboni et al. 2015; Cheng et al. 2017; Lin and Jesuthasan 2017); hence, LHb cells may be synchronized by the solar day and use this light information to regulate behavior. In mammals the anatomical link between the retina and the LHb has been reported to be in an indirect way since retina fibers do not arrive specifically to the LHb but rather to the peri-habenular zone in the brain of different rodent species (Qu et al., 1996; Reuss and Decker, 1997; Hattar et al., 2006). However, other putative nuclei such as the lateral preoptical area and lateral hypothalamus might be involved (Hattar et al., 2006; Zahm and Root, 2017).

In the present study, we first investigated the circadian pattern of clock gene expression by *in situ* hybridization (mRNA) in the LHb of wild-type (WT) and arrhythmic double *Per1^{-/-}-Per2^{Brdm1}* mutant mice housed under constant darkness condition. Then, to decipher whether the Hb contains a clock independent from the master SCN pacemaker, we used a luciferase reporter to follow PER2 protein expression in Hb explants of intact or SCN-lesioned animals. Finally, the effects of different lighting conditions (light-dark, constant darkness and constant light) on the Hb clockwork were investigated.

Materials and methods

Animals and housing

WT and double *Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}* mutant (Zheng et al. 1999, 2001) male mice on a mixed C57BL/6JxSV129 background (n=70; 12-16 weeks-old) used for the first experiment were housed in groups of 3 or 4 individuals per cage. C57BL/6J homozygous *Period2::luciferase* (*Per2^{Luc}* or PER2::LUC) knock-in mice (initially from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; Yoo et al. 2004; n=52; 10-13 weeks old at the end of the studies) were obtained from

our breeding colony in Strasbourg (Chronobiotron platform, UMS3415, CNRS, University of Strasbourg, France). All mice had access to *ad libitum* food (UAR, Epinay sur Orge, France) and water, and were housed in light-proof ventilated rooms, under 12h white light (150 lux) and 12h of darkness cycle (LD12:12; lights on at 8:00 A.M.). Dim red light was permanently on (<5 lux at cage level in the dark). Experiments were performed in accordance with rules from the French National Law and the European Committee Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE). Experimental protocols were approved by the Regional Ethical Committee of Strasbourg for Animal Experimentation (CREMEAS), and the French Ministry of Higher Education and Research (approval #2015021811138196).

Experimental design

Experiment 1: Circadian clock gene expression in the LHb of WT and double $Per1^{-/-}Per2^{Brdm1}$ mutant mice

To evaluate whether clock genes are expressed in the LHb in a circadian manner, both WT (n=35) and double $Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}$ mutant (n=35) mice were killed under a constant and complete darkness (DD) condition by using night vision goggles (ATN NVG-7, ATN-Optics, Charges, France) at 8 temporal points: every 3 hours from the projected-*Zeitgeber* Time 13 (p-ZT13; ZT13 represents one hour after lights off (ZT12) of the last day on LD condition as a phase reference time point) until p-ZT10 of the next day. Therefore, animals were first housed in a LD cycle (12h-12h), then transferred to DD condition 24h before the beginning of the sacrifice (n=3-5 per time point). Brains were rapidly removed, frozen on dry ice and stored at -80°C until use for hybridization.

Experiment 2: Circadian rhythms in $PER2::LUC$ bioluminescence in the Hb of SCN-lesioned mice

To investigate the self-sustainability of the Hb clock, we performed bilateral electrolytic SCN lesions on $Per2^{Luc}$ transgenic mice (SCNX; n=14). Mice were placed for one week in LD condition to recover from surgery. Then, to avoid any masking effect by light, animals were placed in DD condition for 2 to 3 weeks under dim red light (5 lux). Locomotor activity was recorded to evaluate SCN lesions. Intact mice (SHAM, n=9) were killed during the subjective day (around CT6-9), and SCNX animals at the geographical time 13-16h. Brains were rapidly removed and dissected at the level of the Hb. Explants were prepared for bioluminescence recordings.

ARTICLE 1

Experiment 3: Circadian rhythms in PER2::LUC bioluminescence in the mouse Hb under different lighting conditions

To unravel the possible effects of lighting conditions on the Hb clock, *Per2^{Luc}* mice were divided into 3 different lighting groups: LD12:12 (control animals; n=14), DD (n=11) and constant light condition (LL, 150-200 lux at the level of the cage, n=12). All animals were in individual cages, and locomotor activity was recorded. For the DD group, we analyzed data from mice of the SHAM group of experiment 2 in order to reduce the number of animals used in the whole study. For the LL group, after 1 to 2 weeks in LD condition, mice were exposed for 5 to 6 weeks to constant white light. Animals were killed during the day for LD (around ZT6-9), subjective day for DD (CT6-9) or at the geographical time 13-16h for LL groups, and brain explants were prepared for bioluminescence recordings.

Non-radioactive in Situ Hybridization

Eighteen-micrometer coronal sections containing the Hb were cut with cryostat at -20°C according to mouse brain stereotaxic atlas (Paxinos and Franklin 2001), and directly mounted on slides. Digoxigenin labeled RNA probes were synthesized from linearized plasmids according to the protocol of the manufacturer, using specific RNA labeling mix (11277073910, Roche, Bâle, Switzerland). *mClock* plasmid was a gift of Prof. J. S. Takahashi (Northwestern University, Evanston, USA; Tournier et al. 2003). *mPer2* and *mCry2* probes were generated from plasmids kindly provided by Dr. H. Okamura (University of Kobe, Kobe, Japan). *rRev-Erba* probe was kindly provided by Dr H. Dardente (University of Tours, France). *In situ* hybridization was performed according to previous studies (Talbi et al. 2016). Sections were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA) for 10 min, rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and then acetylated twice for 10 min in 1.2% triethanolamine, 0.25% acetic anhydride. Sections were then rinsed in PBS and equilibrated in 5X sodium saline citrate (SSC), 0.05% Tween-20 (Tw) before hybridization. The sections were incubated for 40h at 62°C with 100 ng/mL (*rRev-Erba*) or 200 ng/mL (*mClock*, *mCry2*, *mPer2*) labeled anti-sense probes in the hybridization buffer (50% formamide, 5X SSC, 5X Denhardt's, 1mg/mL denatured salmon sperm DNA, 0.1% Tw and 0.04% diethylpyrocarbonate). After hybridization, the probe was washed off in 5X SSC + 0.05% Tw at room temperature. Stringency rinses were performed for 6x10 min in 0.1X SSC at 72°C. Sections were then blocked for 1h in blocking buffer (0.5% Blocking Reagent [Roche], 100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.05% Tw, 0.02% NaN₃, pH 7.5). Sections were incubated overnight with alkaline phosphatase-labeled anti-digoxigenin antibodies

(11093274910, Roche) at the concentration of 1:10 000 for *rRev-Erba*, *mPer2* and 1:5 000 for *mClock*, *mCry2* in 100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH:7.5. Phosphatase activity was detected with nitroblue tetrazolium (400 μM, 10202610, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (380 μM, R0821, Fisher Scientific) in 100 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 9.5).

Cell counting and analysis

Brain images were taken with a ProRes® CFcoolJenoptik camera on a Zeiss AxioImager microscope, standardizing all lighting parameters on the microscope and the camera software to ensure consistent stable lighting throughout the image capture, and stored on a PC. Digoxigenin-positively labeled cells were counted using ImageJ (NIH) software. Positive cells were counted in the whole Lhb (4 sections/animal, -1.82 to -1.46 mm from Bregma), based upon the atlas of Paxinos and Franklin (2001). Data are presented as the mean number of immunopositive cells per section ± SEM. The circadian profiles of gene expression were fitted by a non-linear least-squares cosinor regression analysis (Refinetti et al. 2007) using the SigmaPlot Software (Systat Software Inc., version 12.5). The fitting equation is:

$$y = A + B \cos\left(2\pi \frac{x - C}{24}\right)$$

where y is the number of positively labeled cells, A the mesor (Midline Estimating Statistic Of Rhythm) or the mean level of the oscillation, B the amplitude of the oscillation, C the acrophase (time when the oscillation peaks), x the time (h), and the period is set at 24h. Only significant best-fit parameters ($p < 0.05$) were included in this study if the residues of the fit respected the analysis of variance (ANOVA) rules.

Locomotor activity recordings

General locomotor activity was measured by using infrared detectors placed above the cage and linked to an automated recording system (CAMS, Circadian Activity Monitoring System, Lyon, France). Data were recorded in 5 min bins and plotted as actograms. Clocklab software (Actimetrics, Wilmette, IL, USA) was used to determine the period of circadian behavior (χ^2 periodograms) of each animal under different experimental conditions during intervals of 10 days for LD and LL conditions and 20 days for SHAM and SCN_X animals. Data from mice belonging to the SCN_X group which showed rhythmic locomotor activity were removed from the study ($n=5$).

ARTICLE 1

SCN lesions

Per2^{Luc} mice were anaesthetized with 1-3% isoflurane, with subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/Kg) as pre- peri- and post-analgesia and with subcutaneous injection of lidocaine (5 mg/Kg; Xylovet, Ceva Santé Animal, Libourne, France) as local analgesia. The animals were placed into a stereotaxic apparatus (David Kopf Instrument, Tujunga, CA, USA). Current (1 mA, 20 seconds) was applied bilaterally through a stainless steel electrode (300 μ m diameter) at the level of the SCN following the coordinates +0.5 mm (anterior-posterior axis); \pm 0.2 mm (medio-lateral axis); 5.7 mm (dorso-ventral axis) according to Paxinos and Franklin (2001). SHAM control animals underwent the same surgery procedure without electrical current. For 3 days, mice received an analgesic solution (1 mL/Kg of body weight; Meloxicam, Boehringer, Ingelheim, Germany) in water bottles. For histological verification of SCN lesions, thirty-micrometer coronal sections at the SCN level of SHAM or SCN_X mice were fixed with 4% PFA and cut with cryostat at -20°C according to mouse brain stereotaxic atlas (Paxinos and Franklin 2001), and then mounted on slides. Sections were stained with Cresyl Violet 0.1% for 10 min, then rinsed with distilled water for 2x5 min, and dehydrated with increased ethanol concentration (70% for 5 min, 95% for 5 min, 100% for 2x5 min), and finally in Toluene for 2x5 min. Slides were coverslipped with Eukitt® mounting medium. SCN_X animals with intact SCN were excluded from the analysis and were the same that kept rhythmic locomotor activity (n=5).

Tissue culture for ex vivo bioluminescence

PER2::LUC bioluminescence recordings were performed using a LumiCycle photon-counting photomultiplier (Actimetrics). Animals were killed by cervical dislocation and brains were rapidly removed and placed in ice-cold 1X Hank's balanced salt solution (HBSS; 10X, H1641, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) containing sodium bicarbonate (0.035%, S8761, Sigma), HEPES (10 mM, H0887, Sigma) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, P433, Sigma). Coronal sections (500 μ m) of the SCN region and the dorsal thalamus containing the Hb were made using a vibratome (MA752 Campden Instrument, Loughborough, U.K.) in which the medium was kept cold by 1X HBSS ice cubes. A pair of scalpels was used to cut the brain regions of interest into small sections (1.0 mm²) according to mouse brain stereotaxic atlas (Paxinos and Franklin 2001). The Hb, 1.2 mm long, was separated into two pieces: rostral and caudal, due to their different innervations and their difference in lateral and medial proportion (**Fig. 4c** and **Fig. S1**; Paxinos and Franklin

2001; Hernández et al. 2015). Then, tissues were cultured on Millicell® culture membranes (PICMORG 50, Millipore, Billerica, MA, USA) in a 35-mm Nunc™ cell culture dish (10654161, Fisher Scientific) with 1 mL Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; D2902, Sigma) supplemented with D (+) glucose (0.35%, G7021, Sigma), sodium bicarbonate (0.035%), HEPES (10 mM), B27 (2%, 17504–044, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), antibiotics (25 U/mL penicillin and 25 µg/mL streptomycin), and beetle luciferin (0.1 mM, E1602, Promega, Madison, WI, USA). Culture dishes were sealed with high-vacuum grease (Dow corning®, Wiesbaden, Germany) and placed for recording into the LumiCycle device maintained at 37°C within an incubator. Samples included both the lateral and medial habenula, thus we refer to as the habenular complex (Hb).

Bioluminescence recording and analysis

Bioluminescence was recorded for 112 sec (every 15 min) for at least 5 days. Waveforms of rhythmic bioluminescence emission were analyzed with the LumiCycle Analysis software (Actimetrics). Data were smoothed with a 5h running average method and detrended by using a 24h running average subtraction (LumiCycle Analysis software; Actimetrics). We chose as time reference ($t = 0$) midnight before the start of the experiment: in this context, $t = 1$ day means midnight after the start of the experiment. The period and first peak amplitude were determined within a 3-day time window (from around $t = 2$ to $t = 5$ days) by using the LM sin fit dampened method. The phase was determined as the midpoint of the first peak, which occurred between 24-48h of culture. Then we calculated the absolute difference between Hbr and Hbc phases ($\Delta \text{phase}_{(\text{Hbr-Hbc})}$) by subtracting the Hbc phase from that of Hbr; the more the value will be close to 0, the higher the two areas will be close in phase. Tissue samples that did not survive (bioluminescence activity as low as for an empty dish) were excluded from the analysis. The threshold for goodness of fit was set at 70%; when below, data were considered arrhythmic. Data are presented in hours for the period and phase, and as relative bioluminescence activity in counts per second (cps) for the amplitude.

Statistical Analysis

All results are indicated as mean \pm SEM except for the phases where only the median is shown. Graphs were made with SigmaPlot (Systat Software Inc., version 12.5, Chicago, IL, USA) or GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., version 6, La Jolla, CA, USA) and all the figures were made with Adobe Illustrator CS6 (Adobe systems, San Jose, CA, USA). Data were analyzed by two-way ANOVA, ANOVA on ranks or unpaired student's t -

ARTICLE 1

test using SigmaPlot. Amplitude values from Hb samples were normalized after log transformation. Significant differences were analyzed with Holm-Sidak-corrected or with Tukey-corrected (only for ANOVA on ranks analysis) *post hoc* comparisons. The homogeneity of variance of Δ values was tested with Levene's test using Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). α level was set at 0.05 for all experiments.

Results

Clock gene expression in the LHb is altered in double $Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}$ mutant mice

Rhythmic expression of *Clock*, *Cry2* and *Rev-Erba* mRNA was observed in the LHb under DD condition (**Fig. 1a**). LHb cells expressed *Per2* gene in a narrow time window around p-ZT10 (late resting state) but the fit of cosinor regression was not optimal enough to indicate a significant rhythmic expression (Fig. 1b; Table 1). Circadian rhythms of *Rev-Erba* and *Cry2* peaked during the early and middle subjective active phase respectively (Fig. 1b). Interestingly, the circadian oscillation of the *Clock* gene peaked during the late subjective active phase, in antiphase with the expression of *Rev-Erba* (**Fig. 1b; Table 1**). However, in double $Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}$ mutant mice, *Clock* and *Rev-Erba* genes lost rhythmicity with consistency (but different from zero) for *Rev-Erba* and wide variability for *Clock* (**Fig. 2a-b; Table 2**). *Cry2* was non-detectable in *Per* mutant mice (**Fig. S2; Table 2**). Thus, integrity of *Per* genes is required for clock oscillations in the LHb.

SCN lesions do not interrupt the clock in the Hb

To evaluate to which extent the SCN circadian clock is necessary to sustain circadian oscillations in the Hb, we performed SCN lesions (SCNX) in transgenic $Per2^{Luc}$ mice. Behavioral and histological verification indicated that intact control (SHAM) mice showed a rhythmic free-running pattern of locomotor activity with an endogenous period of $24.19\text{h} \pm 0.05\text{h}$ (**Fig. 3a and c**). SCNX mice exhibited a total loss of rhythmic locomotor activity (**Fig. 3b and c**). Histological verification confirmed complete and successful SCN ablations (**Fig. 3d-e**). Five SCNX animals which retained rhythmic activity were removed from the analysis.

Unlike for hybridization experiment, we were not able to separate the lateral from the medial Hb; hence the entire Hb clock was investigated. We observed that 9/9 (100%) rostral (Hbr) and 7/9 (78%) caudal (Hbc; **Fig. 4c**) Hb explants from SHAM animals showed PER2::LUC oscillations with respective periods of $28.10 \pm 0.59\text{h}$ and $26.47 \pm 1.02\text{h}$ (**Fig. 4a and d**).

Importantly, in arrhythmic animals with complete SCN lesion, 7/9 (78%) Hbr and 9/9 (100%) Hbc samples displayed sustained PER2::LUC oscillations with respective periods of 28.41 ± 0.61 h and 27.27 ± 0.68 h (**Fig. 4b-d**). Periods did show no significant difference between groups (SHAM vs. SCN, $F_{(1,31)}=0.656$; $p=0.43$) or between areas (rostral vs. caudal, $F_{(1,31)}=4.068$; $p=0.053$) or any significant interaction between area and group ($F_{(1,31)}=0.122$; $p=0.73$). Because the SCN might be necessary to synchronize clock cells in the Hb, we evaluated the amplitude and phase of the Hb oscillations. The amplitudes in both the Hbr (0.66 ± 0.10 cps in \log_{10}) and Hbc (0.65 ± 0.14 cps in \log_{10}) of SHAM animals were not significantly different from those of SCN mice (Hbr, 0.84 ± 0.13 cps; Hbc, 0.60 ± 0.12 cps in \log_{10} ; $F_{(1,31)}=0.30$; $p=0.59$; **Fig. 4e**). Two-way ANOVA revealed no effect of area ($F_{(1,31)}=1.166$; $p=0.29$), and no interaction between area and group ($F_{(1,31)}=0.807$; $p=0.38$; **Fig. 4e**). Amplitude raw data are available in the supplemental **table S1**. Moreover, the damping rate of Hb PER2::LUC oscillations was not affected by SCN lesions (**Fig. S3**).

To investigate whether the SCN has a role on the coupling between the Hbr and Hbc clock, we analyzed the $\Delta \text{phase}_{(\text{Hbr-Hbc})}$ of PER2::LUC activity. We found that the Δ values in both the SHAM and SCN groups were significantly different from 0 (respectively $p=0.001$ and $p<0.001$), meaning that Hbr and Hbc oscillations were not in the same phase (**Fig. 4a-b and 4f**). Moreover, the phase differences from the SCN group were more dispersed than those from the SHAM group ($p=0.014$, Levene's test). They were so spread that they could be subdivided into two populations for the SCN group: one with Δ values around 5h and the other around 20h. However, the ANOVA on ranks did not show any difference between the two groups ($p=0.165$).

Lighting conditions affect Hb oscillations

The Hb receives inputs from the retina directly *via* retinal ganglion cells or indirectly, such as in the *zebrafish*, through a thalamic nucleus not described in rodents so far (Qu et al., 1996; Reuss and Decker, 1997; Hattar et al., 2006; Cheng et al., 2017) and responds to light after photo-stimulation of the retina (Zhao and Rusak, 2005; Dreosti et al., 2014; Shuboni et al., 2015; Cheng et al., 2017). Therefore, to unravel how lighting conditions might affect circadian activity of the Hb clock, we exposed two groups of *Per2^{Luc}* mice to either a light-dark cycle (LD) or constant light (LL) condition, and compared rhythms of PER2::LUC bioluminescence with previous results obtained for SHAM animals under DD condition. Mice under LD cycle showed a clear entrained behavioral rhythm with main locomotor activity at

ARTICLE 1

night (**Fig. 5a and c**), whereas mice under LL condition showed a progressive lengthening of the period of locomotor activity, and then total loss of behavioral rhythms after 5 weeks of LL exposure (**Fig. 5b-c**).

In animals exposed to a LD cycle, PER2::LUC oscillations were observed in 12/14 (86%) Hbr and 10/14 (71%) Hbc with respective periods of $27.28\text{h}\pm 0.47\text{h}$ and $27.23\text{h}\pm 0.55\text{h}$ (**Fig. 6a and 6c**). In arrhythmic animals exposed to LL condition, PER2::LUC oscillations were maintained with periods of $27.98\pm 0.46\text{h}$ in 10/12 (83%) Hbr and $27.15\pm 0.94\text{h}$ in 7/10 (70%) Hbc (**Fig. 6b and 6c**). Periods of Hb (rostral and caudal) from animals that were exposed to a LD cycle or to LL condition did not differ from those of animals in DD condition (**Fig. 4a and 6c**, $F_{(2,49)}=0.139$; $p=0.87$), without difference between regions ($F_{(1,49)}=2.508$; $p=0.12$), or interaction between area and group ($F_{(2,49)}=0.779$; $p=0.46$). Amplitudes of PER2::LUC oscillations did not differ between animals exposed to a LD cycle (Hbr $0.65\pm 0.05\text{cps}$; Hbc, $0.50\pm 0.10\text{cps}$ in \log_{10}), LL condition (Hbr, $0.54\pm 0.07\text{cps}$; Hbc, $0.42\pm 0.08\text{cps}$ in \log_{10}) or DD condition (Hbr $0.67\pm 0.10\text{ cps}$; Hbc, $0.64\pm 0.12\text{cps}$ in \log_{10} ; $F_{(1,49)}=1.69$; $p=0.16$), and there was no difference between regions ($F_{(1,49)}=1.722$; $p=0.20$), or interaction between area and group ($F_{(2,49)}=0.261$; $p=0.77$; **Fig. 6d**). Amplitude raw data are available in the supplemental **table S1**. By contrast, LL exposure led to a significant decrease in amplitude of PER2::LUC oscillations in SCN explants when compared to those from animals under LD cycles (**Fig. S4**), suggesting that the LL condition was able to affect the SCN.

Interestingly, when we analyzed the Δ phase ($_{\text{Hbr-Hbc}}$) of the PER2::LUC bioluminescence activity, we found that all Δ values in the different lighting conditions were different from 0 (LD $p=0.003$; DD $p=0.001$; LL $p=0.002$), suggesting that Hbr and Hbc were not perfectly in phase (**Fig. 4a, 6a-b and 6e**). However, the DD condition appeared to affect the Hb clock in a distinct way since Δ phases were more dispersed than those of LD and LL groups ($p=0.0036$, Levene's test). The ANOVA on ranks showed an effect of group ($p=0.014$) and pointed to the difference between Δ phase ($_{\text{Hbr-Hbc}}$) from LD and DD conditions ($p=0.014$). Together, phase differences suggest that lighting information is important for coupling of Hbr and Hbc oscillators. It is important to note that acrophases in Hb explants from animals kept in LD or DD were not under the influence of the time of sacrifice (**Fig. S5**).

Discussion

In the present study, we reported that the rostral and caudal regions of the Hb oscillate robustly with similar period and amplitude independently from the SCN and the lighting

conditions. However, despite the ability of the two parts of the Hb to oscillate robustly in a circadian manner, they lose their coupling in the absence of light cues even with an intact SCN (SHAM group in DD condition). We also observed that the circadian expression of clock genes in the Hb is altered in double *Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}* mutant mice, suggesting that despite the independence from the SCN, the Hb clock needs the clock genes to keep circadian timing.

Rhythmic activity of the Hb has been previously reported for different parameters: for instance, for the daily profile of electrophysiological activity of both the LHb and medial Hb (Sakhi et al. 2014a, b), for clock genes and proteins expression, and for c-Fos expression in the LHb of animals under LD condition (Shieh 2003; Tavakoli-Nezhad and Schwartz 2006; Zhao et al. 2015; Christiansen et al. 2016). Here, unlike in previous studies, animals were kept under DD condition to explore the endogenous rhythmicity (i.e., clock gene expression and PER2::LUC oscillations) of the Hb clock, independently of the LD cycle. *In vivo*, we observed that expression of *Cry2*, *Clock* and *Rev-Erba* clock genes was rhythmic in the LHb of animals maintained in DD condition. We found that the LHb cells expressed *Per2* gene for a short time around the end of subjective day (p-ZT10). Similarly, in rats under LD cycle, both the *Per2* mRNA and protein are expressed rhythmically and peak at day time (ZT6-10) in the LHb (Zhao et al. 2015). Thus, the short delay on the peak of expression in our study might reflect the free-running expression of animals under DD condition with a period superior to 24h. The narrow window of expression in our experiment might be also explained by the method of analysis: we counted the number of positively labeled cells instead of quantifying labeling intensity. Unlike what has been reported for the SCN, the cosinor analysis revealed that *mClock* mRNA showed rhythmic expression as assessed by the number of labeled cells in the LHb. Thus, the LHb, like the pineal gland, presents circadian variations in expression of the *Clock* gene (Karolczak et al. 2004). Accordingly, daily variation of expression of the CLOCK protein has been also found in other brain areas such as the arcuate nucleus, paraventricular thalamus, dorsomedial hypothalamus, paraventricular nucleus and dentate gyrus (Wyse and Coogan 2010). Our result also fits with the observation that CLOCK and BMAL1 proteins display rhythmic expression in the LHb in LD condition (Wyse and Coogan 2010). We also found circadian rhythms in the expression of *Rev-Erba* and *Cry2* genes in the LHb, with acrophase occurring at the early (p-ZT13) and mid-subjective night (p-ZT17), respectively. REV-ERB α is a key clock factor with transcriptional repression activity and it is expressed rhythmically in the SCN with an acrophase during the day

ARTICLE 1

(Preitner et al. 2002). Here, to our knowledge, this is the first time that rhythmic expression of *Rev-Erba* is reported in the LHb. If it has a similar role as in the SCN, thus we should observe a repressive action on its principal targets (*Bmal1* and *Clock*). At the clockwork level, *Rev-Erba* is induced by the CLOCK/NPAS2:BMAL1 heterodimer, and then REV-ERB α , in turn, represses the expression of these three transcription factors (Preitner et al. 2002; Crumbley and Burris 2011; Ripperger and Albrecht 2012). Here rhythmic expression of *Clock* gene was in antiphase with that of *Rev-Erba*, suggesting that the negative control of REV-ERB α over *Clock* also exists in the LHb. Interestingly in double *Per1*^{Brdm1}-*Per2*^{Brdm1} mutant mice, the expression of *Clock* and *Rev-Erba* mRNA was arrhythmic and that of *Cry2* was undetectable. A previous study showed that single mutation in *Per2* gene resulted in significant decrease of *Cry1*, *Per1* and *Bmal1* clock gene expression (Bae et al. 2001). The double *Per1-2* mutation may worsen the phenotype in our study to the point of making the *Cry2* mRNA undetectable. Our results are consistent with those from the study of Sakhi et al. (2014b) which showed that the double knock-out of *Cry1-2* genes abolishes the *Per1-Luciferase* rhythmic activity in the mouse Hb. This suggests that malfunction of the molecular clock disrupts rhythmic expression of clock genes in the LHb.

Since the generation of the *Per2*^{Luc} transgenic mouse model, the identification of organs and brain regions with rhythmic activity has been extensively explored (Yoo et al. 2004; Prolo et al. 2005; Ruan et al. 2008; Guilding et al. 2009; Guilding et al. 2010; Leise et al. 2012; Jaeger et al. 2015; Besing et al. 2017; Brancaccio et al. 2017). This mouse model has been used to demonstrate sustained circadian oscillations in the LHb (Guilding et al. 2010). Here, we confirm the results from Guilding et al. (2010), but report increased sustainability of PER2::LUC bioluminescence activity. This could be explained by the augmented thickness (500 μ m instead of 300 μ m) of our samples. Because our aim was to decipher whether the Hb clock is dependent or not on the SCN master clock, we monitored PER2::LUC activity in the Hb from arrhythmic SCN-lesioned animals. We did observe changes in period and amplitude of PER2::LUC oscillations of Hb explants neither from arrhythmic SCN-lesioned animals, nor from arrhythmic animals induced by LL condition, suggesting that the Hb clock does not require the SCN pacemaker to maintain its own oscillations. Indeed, LL exposure was reported to affect the SCN by downregulating the amplitude of the PER2::LUC and *Per1-luciferase* activity, and to alter the phase relationship between the SCN and other circadian clocks (present results; Granados-Fuentes et al. 2004; Ohta et al. 2005). This has been suggested to be the result of the desynchronization of multiple SCN oscillators (Ohta et

al. 2005). Unlike the SCN, the Hb and the olfactory bulb (OB) kept circadian time in LL condition (Granados-Fuentes et al. 2004). However, these analyses are from *ex vivo* experiments. Thus, bioluminescence studies in freely moving mice may underline other characteristics of the Hb clock or the involvement of the SCN in the Hb oscillations (Hamada et al. 2016).

In a previous study of Xu et al. (2015) in rats, SCN lesions altered the day-night expression of *Per2* and *c-fos* in the Hb. Different to our study, authors evaluated *c-fos* and *Per2* mRNA expression at only two time points (day vs. night), which is not sufficient to conclude that the Hb lost rhythmic activity rather than it underwent phase shift. Indeed, the coupling between the two Hb parts of the same animal has been revealed in our study. First, in LD cycle phase differences were quite close to zero and clustered, meaning that the Hbr and Hbc did not peak exactly at the same time but they stayed in synchrony. Similarly, these two oscillators kept their phase relationship under LL exposure. Nevertheless, large dispersion of Δ values was observed in DD condition and even more in arrhythmic SCN-lesioned animals, suggesting that in the absence of the principal synchronizer for the circadian system (light), coupled clocks in the Hb become internally desynchronized and even more if the main pacemaker (the SCN) is also missing. In fact, even if the presence of some fibers originating in the retina have been described in the Hb (Qu et al. 1996; Reuss and Decker 1997), melanopsin-expressing retinal ganglion cells (ipRGC) appear to project to the border of the dorsal region of the LHb in mice, also called the peri-habenular zone (Hattar et al. 2006). Thus, this border projection might be important to maintain the coupling between the rostral and caudal Hb oscillators by light.

In *zebrafish*, a thalamic nucleus acting as a relay between the retina and Hb has been reported (Cheng et al. 2017; Lin and Jesuthasan 2017). Therefore other potential candidates, beyond the peri-habenular zone, as thalamic or hypothalamic such as lateral preoptic area and lateral hypothalamus (which receive ipRGC innervations; Hattar et al. 2006; Zahm and Root 2017) could be also found in rodents as important relay structures to transmit light information to the Hb. Further *in vivo* recordings of PER2::LUC activity in the Hb from animals exposed to LL condition or to flashing lights should confirm the functional link between the retina and the Hb clock (Hamada et al. 2016). Interestingly, the double *Per2/Cry1* mutant or the vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor mutant mice are arrhythmic in DD condition, while their behavioral rhythms are rescued upon exposure to LL condition (Abraham et al. 2006; Hughes et al. 2015). This condition may reflect the fact that behavioral and physiological

ARTICLE 1

perturbations might appear when the (circadian) system is lacking of external signals, leading to uncoupling of clocks within the same structure.

The presence of different oscillators along the rostrocaudal axis was previously reported in the SCN (Jagota et al., 2000; Honma et al., 2012). These oscillators show two independent peaks of the firing rate activity: a morning peak at dawn and an evening peak at dusk, which have been suggested as the morning and evening coupled oscillators encoding photoperiod (Jagota et al., 2000; Pittendrigh and Daan, 1976). Here we reported the presence of two mutually coupled oscillators in the Hb which are in the rostrocaudal axis. What is the functional relevance of these oscillators is, however, unknown, but these might have a similar role in the differential integration and regulation of external or internal time signal. Few studies have evaluated the anatomical differences along the rostro-caudal axis of the Hb (Zhang et al., 2016, 2018). According to these results, Hb oscillators may differ in the circadian regulation of behaviors such as food or water intake. However, this hypothesis remains to be tested.

The Hb, and particularly the LHb, is also an important nucleus implicated in the regulation of motivational and emotional states (Mizumori and Baker 2017), because it modulates the monoamine system (mainly dopamine and serotonin) in the midbrain (Namboodiri et al. 2016). Interestingly, long time exposure to DD condition results in important damage to the monoamine system (serotonin from the raphe nuclei and dopamine from the VTA) and depressive-like behavior in rats, which are reversed when animals are treated with antidepressant drugs (Gonzalez and Aston-Jones 2008). Whether uncoupling of the two regions (rostral and caudal) of the Hb might be part of the mechanism whereby constant darkness could affect mood, is not known. Hence, it may be interesting to evaluate monoamine and behavioral changes in animals with uncoupled Hb clock(s). Importantly, in a previous study it was reported that noradrenaline (NA) concentrations are different between the rostral and caudal Hb areas: higher concentrations were found in the rostral than the caudal part. Indeed, the rostral Hb receives sympathetic and central NA innervations, and the caudal Hb receives only central innervations (Gottesfeld 1983).

Conclusion

In the present study, we demonstrate the importance of entrainment signals (e.g. light, the SCN timing) for the Hb clock to keep a coupled circadian time, and the relevance of *Per* genes for this property. Moreover, whereas constant LL does not appear to affect the Hb clock, the lack of light/dark alternations (e.g., DD) desynchronizes at least two possible

oscillators present in the Hbr and Hbc. Internal desynchronization of the circadian system (the SCN, Hb or between circadian clocks) has been proposed as part of the consequences induced by different circadian perturbations in human conditions such as jet-lag or shift-work, and which leads to psychiatric pathologies (Karatsoreos 2014). Therefore, understanding the clock mechanisms in the Hb will allow better comprehension of its involvement in physiology (reward, motivation) and physiopathology (drug intake, mood).

Acknowledgments

We thank deeply Prof. Urs Albrecht (University of Fribourg) for providing the *Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}* mutant mice. *Per1* and *Cry2* plasmids were kindly donated by Prof. H. Okamura (Kyoto University, Japan). *mClock* and *rRev-Erb α* plasmids were generously provided by Prof. J. Takahashi (Northwestern University) and Dr. Hugues Dardente (University of Tours), respectively. We thank the personal of the Chronobiotron Platform (UMS 3414, Strasbourg) for animal care. Funding sources of the present study were provided by the Agence National de la Recherche (ANR-14-CE13-0002-01 ADDiCLOCK JCJC to JM and NLS PhD fellow) and the Centre National de la Recherche Scientifique (JM and MPFS).

Compliance with Ethical Standards

Authors declare no potential conflicts of interest. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

References

- Abraham D, Dallmann R, Steinlechner S, et al (2006) Restoration of circadian rhythmicity in circadian clock-deficient mice in constant light. *J Biol Rhythms* 21:169–176. doi: 10.1177/0748730406288040
- Aizawa H, Cui W, Tanaka K, Okamoto H (2013) Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front Hum Neurosci* 7:826. doi: 10.3389/fnhum.2013.00826
- Bae K, Jin X, Maywood ES, et al (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525–536
- Besing RC, Rogers CO, Paul JR, et al (2017) GSK3 activity regulates rhythms in hippocampal clock gene expression and synaptic plasticity. *Hippocampus* 27:890–898. doi: 10.1002/hipo.22739

ARTICLE 1

- Bianco IH, Wilson SW (2009) The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 364:1005–1020. doi: 10.1098/rstb.2008.0213
- Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, et al (2017) Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93:1420–1435.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.030
- Brinschwitz K, Dittgen A, Madai VI, et al (2010) Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168:463–476. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.050
- Cheng R-K, Krishnan S, Lin Q, et al (2017) Characterization of a thalamic nucleus mediating habenula responses to changes in ambient illumination. *BMC Biol* 15:104. doi: 10.1186/s12915-017-0431-1
- Christiansen SL, Bouzinova EV, Fahrenkrug J, Wiborg O (2016) Altered Expression Pattern of Clock Genes in a Rat Model of Depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19:pyw061. doi: 10.1093/ijnp/pyw061
- Christoph GR, Leonzio RJ, Wilcox KS (1986) Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J Neurosci* 6:613–619
- Concha ML, Wilson SW (2001) Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J Anat* 199:63–84
- Crumbley C, Burris TP (2011) Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS ONE* 6:e17290. doi: 10.1371/journal.pone.0017290
- Dreosti E, Vendrell Llopis N, Carl M, et al (2014) Left-right asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Curr Biol* 24:440–445. doi: 10.1016/j.cub.2014.01.016
- Gonzalez MMC, Aston-Jones G (2008) Light deprivation damages monoamine neurons and produces a depressive behavioral phenotype in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:4898–4903. doi: 10.1073/pnas.0703615105
- Gottesfeld Z (1983) Origin and distribution of noradrenergic innervation in the habenula: A neurochemical study. *Brain Research* 275:299–304. doi: 10.1016/0006-8993(83)90990-3
- Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED (2004) The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J Neurosci* 24:615–619. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4002-03.2004
- Guilding C, Hughes ATL, Brown TM, et al (2009) A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus. *Mol Brain* 2:28. doi: 10.1186/1756-6606-2-28
- Guilding C, Hughes ATL, Piggins HD (2010) Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience* 169:1630–1639. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.015
- Guilding C, Piggins HD (2007) Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci* 25:3195–3216. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05581.x
- Hamada T, Sutherland K, Ishikawa M, et al (2016) In vivo imaging of clock gene expression in multiple tissues of freely moving mice. *Nat Commun* 7:11705. doi: 10.1038/ncomms11705

- Hattar S, Kumar M, Park A, et al (2006) Central projections of melanopsin-expressing retinal gangli on cells in the mouse. *J Comp Neurol* 497:326–349. doi: 10.1002/cne.20970
- Hernández VS, Vázquez-Juárez E, Márquez MM, et al (2015) Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. *Front Neuroanat* 9:130. doi: 10.3389/fnana.2015.00130
- Hikosaka O (2010) The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat Rev Neurosci* 11:503–513. doi: 10.1038/nrn2866
- Honma, S., Ono, D., Suzuki, Y., Inagaki, N., Yoshikawa, T., Nakamura, W., et al. (2012). “Suprachiasmatic nucleus: Cellular clocks and networks,” in *The Neurobiology of Circadian Timing Progress in Brain Research.*, ed. M. M. Andries Kalsbeek Till Roenneberg and Russell G. Foster (Elsevier), 129–141. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00029-0.
- Hughes ATL, Croft CL, Samuels RE, et al (2015) Constant light enhances synchrony among circadian clock cells and promotes behavioral rhythms in VPAC2-signaling deficient mice. *Sci Rep* 5:14044. doi: 10.1038/srep14044
- Jaeger C, Sandu C, Malan A, et al (2015) Circadian organization of the rodent retina involves strongly coupled, layer-specific oscillators. *FASEB J* 29:1493–1504. doi: 10.1096/fj.14-261214
- Jagota, A., de la Iglesia, H. O., and Schwartz, W. J. (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat. Neurosci.* 3, 372–376. doi:10.1038/73943.
- Karatsoreos IN (2014) Links between Circadian Rhythms and Psychiatric Disease. *Front Behav Neurosci* 8:162. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00162
- Karolczak M, Burbach GJ, Sties G, et al (2004) Clock gene mRNA and protein rhythms in the pineal gland of mice. *Eur J Neurosci* 19:3382–3388. doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03444.x
- Lammel S, Lim BK, Ran C, et al (2012) Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491:212–217. doi: 10.1038/nature11527
- Lecourtier L, Kelly PH (2007) A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31:658–672. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.01.004
- Leise TL, Wang CW, Gitis PJ, Welsh DK (2012) Persistent cell-autonomous circadian oscillations in fibroblasts revealed by six-week single-cell imaging of PER2::LUC bioluminescence. *PLoS ONE* 7:e33334. doi: 10.1371/journal.pone.0033334
- Lin Q, Jesuthasan S (2017) Masking of a circadian behavior in larval zebrafish involves the thalamo-habenula pathway. *Sci Rep* 7:4104. doi: 10.1038/s41598-017-04205-7
- Mathis V, Cosquer B, Avallone M, et al (2015) Excitatory Transmission to the Lateral Habenula Is Critical for Encoding and Retrieval of Spatial Memory. *Neuropsychopharmacology* 40:2843–2851. doi: 10.1038/npp.2015.140
- Matsumoto M, Hikosaka O (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447:1111–1115. doi: 10.1038/nature05860

ARTICLE 1

- Mizumori SJY, Baker PM (2017) The Lateral Habenula and Adaptive Behaviors. *Trends Neurosci* 40:481–493. doi: 10.1016/j.tins.2017.06.001
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci* 35:445–462. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153128
- Namboodiri VMK, Rodriguez-Romaguera J, Stuber GD (2016) The habenula. *Curr Biol* 26:R873–R877. doi: 10.1016/j.cub.2016.08.051
- Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG (2005) Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci* 8:267–269. doi: 10.1038/nn1395
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition, 2 edition. Academic Press, San Diego.
- Pittendrigh CS, Daan SA (1976) Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: a clock for all seasons. *J. Comp. Physiol. A* 106, 333-355.
- Poller WC, Madai VI, Bernard R, et al (2013) A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. *Brain Res* 1507:45–60. doi: 10.1016/j.brainres.2013.01.029
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, et al (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251–260
- Prolo LM, Takahashi JS, Herzog ED (2005) Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J Neurosci* 25:404–408. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4133-04.2005
- Qu T, Dong K, Sugioka K, Yamadori T (1996) Demonstration of direct input from the retina to the lateral habenular nucleus in the albino rat. *Brain Research* 709:251–258. doi: 10.1016/0006-8993(95)01306-7
- Refinetti R, Lissen GC, Halberg F (2007) Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res* 38:275–325. doi: 10.1080/09291010600903692
- Reuss S, Decker K (1997) Anterograde tracing of retinohypothalamic afferents with Fluoro-Gold. *Brain Research* 745:197–204. doi: 10.1016/S0006-8993(96)01151-1
- Ripperger JA, Albrecht U (2012) The circadian clock component PERIOD2: from molecular to cerebral functions. *Prog Brain Res* 199:233–245. doi: 10.1016/B978-0-444-59427-3.00014-9
- 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:e249. doi: 10.1371/journal.pbio.0060249
- Sakhi K, Belle MDC, Gossan N, et al (2014a) Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. *J Physiol (Lond)* 592:587–603. doi: 10.1113/jphysiol.2013.263319
- Sakhi K, Wegner S, Belle MDC, et al (2014b) Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. *J Physiol (Lond)* 592:5025–5045. doi: 10.1113/jphysiol.2014.280065
- Shieh K-R (2003) Distribution of the rhythm-related genes rPERIOD1, rPERIOD2, and rCLOCK, in the rat brain. *Neuroscience* 118:831–843

- Shuboni DD, Cramm SL, Yan L, et al (2015) Acute effects of light on the brain and behavior of diurnal *Arvicantis niloticus* and nocturnal *Mus musculus*. *Physiol Behav* 138:75–86. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.09.006
- Sutherland RJ (1982) The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci Biobehav Rev* 6:1–13
- Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 9:764–775. doi: 10.1038/nrg2430
- Talbi R, Klosen P, Laran-Chich M-P, et al (2016) Coordinated seasonal regulation of metabolic and reproductive hypothalamic peptides in the desert jerboa. *J Comp Neurol* 524:3717–3728. doi: 10.1002/cne.24026
- Tavakoli-Nezhad M, Schwartz WJ (2006) Hamsters running on time: is the lateral habenula a part of the clock? *Chronobiol Int* 23:217–224. doi: 10.1080/07420520500521947
- Tournier BB, Menet JS, Dardente H, et al (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118:317–322. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00008-3
- Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72:551–577. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135919
- Wyse CA, Coogan AN (2010) Impact of aging on diurnal expression patterns of CLOCK and BMAL1 in the mouse brain. *Brain Research* 1337:21–31. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.113
- Xu H, Zhang C, Zhao H (2015) Effect of Suprachiasmatic Nucleus Lesion on Period2 and C-fos Expression in Habenular Nucleus. *International Journal of Chemistry* 7:163
- Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, et al (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5339–5346. doi: 10.1073/pnas.0308709101
- Zahm DS, Root DH (2017) Review of the cytology and connections of the lateral habenula, an avatar of adaptive behaving. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 162:3–21. doi: 10.1016/j.pbb.2017.06.004
- Zhang C, Truong KK, Zhou Q-Y (2009) Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS ONE* 4:e7151. doi: 10.1371/journal.pone.0007151
- Zhang, L., Hernández, V. S., Swinny, J. D., Verma, A. K., Giesecke, T., Emery, A. C., et al. (2018). A GABAergic cell type in the lateral habenula links hypothalamic homeostatic and midbrain motivation circuits with sex steroid signaling. *Transl Psychiatry* 8, 50. doi:10.1038/s41398-018-0099-5.
- Zhang, L., Hernández, V. S., Vázquez-Juárez, E., Chay, F. K., and Barrio, R. A. (2016). Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? *Front. Neural Circuits*, 13. doi:10.3389/fncir.2016.00013.
- Zhao H, Rusak B (2005) Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience* 132:519–528. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.012

ARTICLE 1

- Zhao Z, Xu H, Liu Y, et al (2015) Diurnal Expression of the Per2 Gene and Protein in the Lateral Habenular Nucleus. *Int J Mol Sci* 16:16740–16749. doi: 10.3390/ijms160816740
- Zheng B, Albrecht U, Kaasik K, et al (2001) Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105:683–694
- Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, et al (1999) The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400:169–173. doi: 10.1038/22118

Tables

Table 1. Summary of statistics for the Cosinor analysis on the *in situ* hybridization results from WT animals

	Parameters			Cosinor analysis	
	Mean ^a	Amplitude ^a	Acrophase ^b	Ficher F _(2;31)	P value
<i>Clock</i>	26.89*	7.12*	21.31*	5.2467	0.0114
<i>Cry2</i>	13.49*	15.34*	17.68*	24.1755	<0.0001
<i>Per2</i>	7.08*	8.75*	10.29	7.2469 ^c	0.0027 ^c
<i>Rev-Erba</i>	28.68*	24.20*	13.02	12.8704	<0.0001

* p<0.05, ^a number of positive cells, ^b in hours (p-ZT), ^c did not follow ANOVA rules

Table 2. Summary of statistics for the Cosinor analysis on the *in situ* hybridization results from KO animals.

	Parameters			Cosinor analysis	
	Mean ^a	Amplitude ^a	Acrophase ^b	Ficher F _(2;31)	P value
<i>Clock</i>	110.45*	10.63	18.66*	0.2751	0.7620
<i>Rev-Erba</i>	55.43*	5.51	12.75	0.5015	0.6114

* p<0.05, ^a number of positive cells, ^b in hours (p-ZT)

Figures

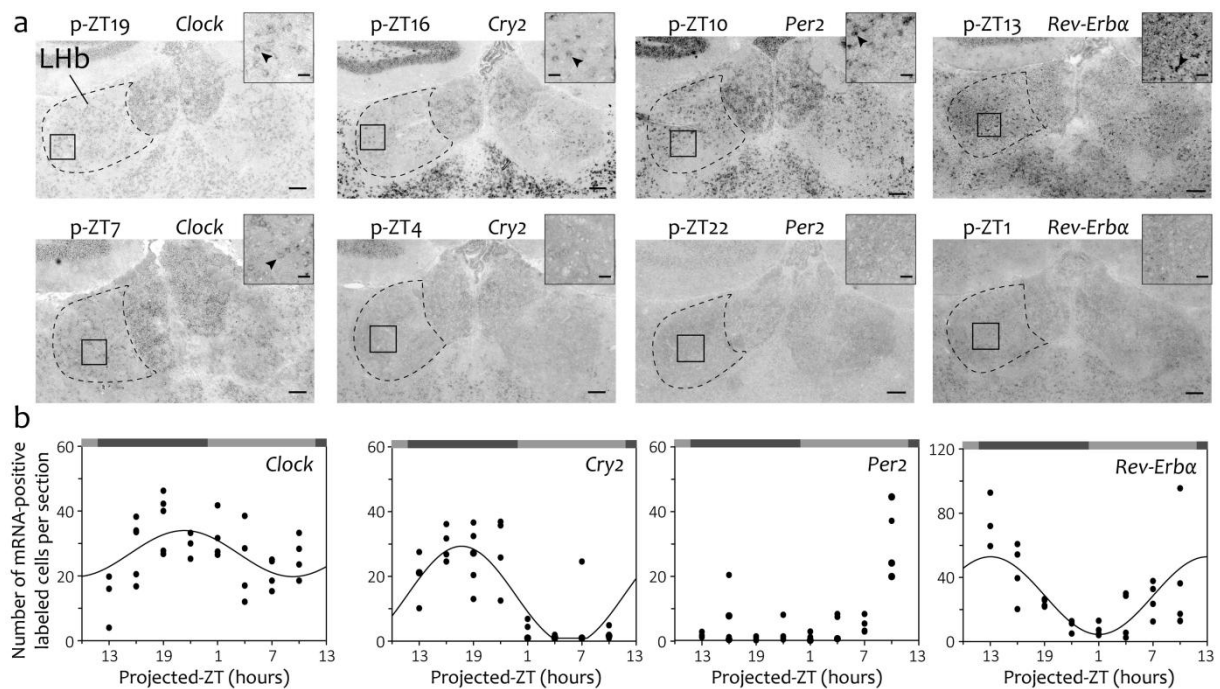


Fig. 1. Circadian gene expressions in the LHB from WT mice housed in DD condition for 24h. **a)** Representative photos of the *in situ* hybridization on coronal brain slices containing the LHB (dashed line) from WT mice using mRNA probes (*Clock*, *Cry2*, *Per2* and *Rev-Erba*). The peak (top row) and the nadir (bottom row) of the expression are represented. Zoomed-in areas correspond to the labeled boxed areas. **b)** Number of mRNA positive labeled cells in the LHB from WT mice. Each closed circle represents an animal and the curves represent the best fit for cosinor analyses. The darkest grey bar on top of each graph represents the subjective night and the lightest grey bar represents the subjective day. p-ZT: projected-ZT; ZT: *Zeitgeber* Time. Scale bar: 100 μ m for the Hb image; 25 μ m for the zoom-in.

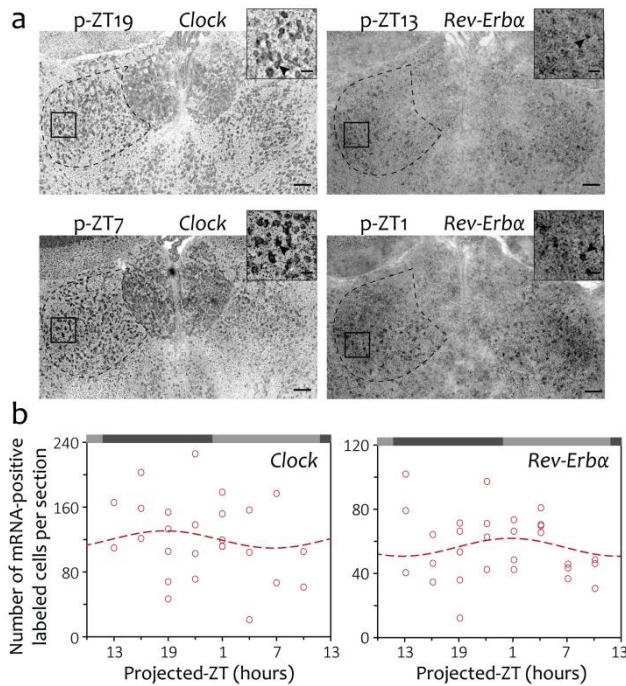


Fig. 2. Circadian gene expressions in the LHB from double $Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}$ mutant mice housed in DD condition for 24h. **a)** Representative photos of the *in situ* hybridization on coronal brain slices containing the LHB (dashed line) from double $Per1^{Brdm1}-Per2^{Brdm1}$ mutant mice using mRNA probes (*Clock* and *Rev-Erba*). **b)** Number of mRNA positive labeled cells in the LHB from KO mice. Each opened circle represents an animal and the curves represent the best fit for cosinor analyses. The darkest grey bar on top of each graph represents the subjective night and the lightest grey bar represents the subjective day. p-ZT: projected-ZT; ZT: *Zeitgeber* Time. Scale bar: 100 μ m for the Hb image; 25 μ m for the zoom-in.

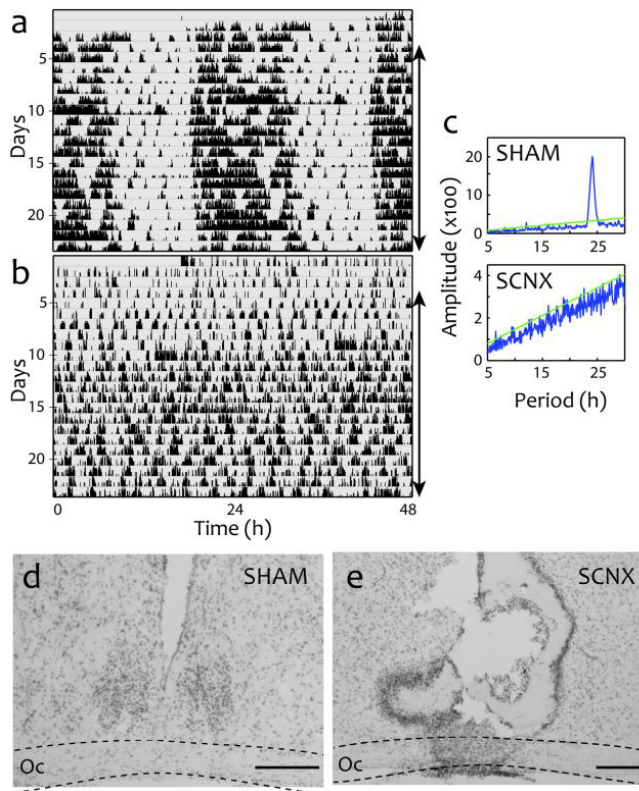


Fig. 3. SCN histology and behavioural verification. Double plotted actograms of representative SHAM (**a**) and SCNX (**b**) mice kept in DD condition. SHAM animal showed a circadian rhythm of locomotor activity with a 24h-superior period, while SCNX mouse was totally arrhythmic. **c**) Arrows in **a** and **b** show the 20 days used to determine the period of circadian rhythms of locomotor activity by using the χ^2 periodogram method. Cresyl violet staining of coronal sections at the level of the SCN from SHAM (**d**) and SCNX (**e**) mice. Scale bar: 100 μ m. Oc: optic chiasma.

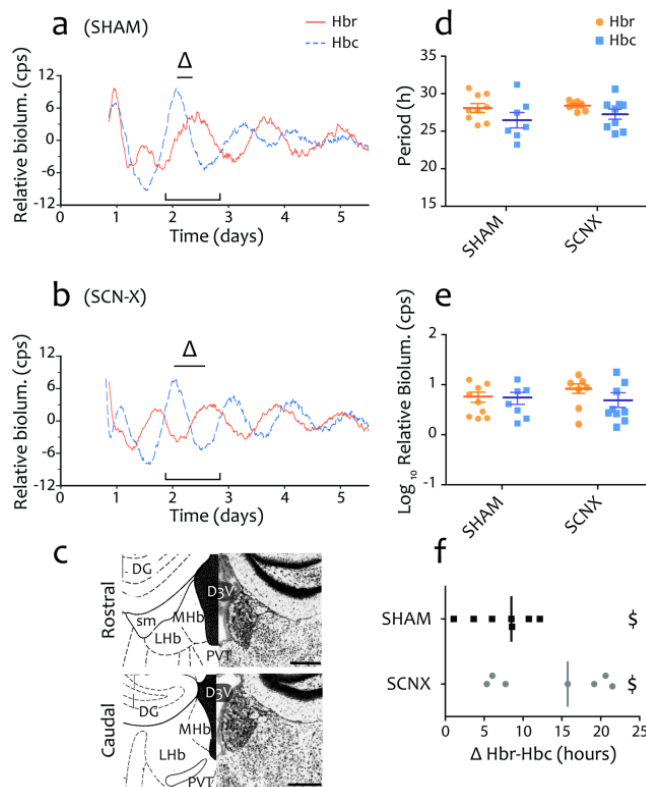


Fig. 4. PER2::LUC circadian oscillations in Hb explants remained stable even after SCN lesions. Hbr (solid orange line) and Hbc (dashed blue line) oscillations from SHAM (**a**) and SCN-X (**b**) mice. **c**) Schematic and representative pictures (cresyl violet staining) of the two regions of interest of the Hb used for analyses. No difference was noticed in the period (**d**) or in the amplitude (**e**) between Hbr (orange circles) and Hbc (blue squares) explants and between SHAM and SCN-X mice. **f**) Difference (Δ) between Hbr and Hbc phases. Each phase corresponded to the time when the first peak of PER2::LUC oscillation occurs 24h-48h after the beginning of culture (brackets in **a** and **b** show this time window). Oscillations in the Hbr and Hbc from both SHAM (square) and SCN-X (circle) mice were not in phase (different from zero) and were desynchronized (high variance). Scale bar: 250 μ m. Cps: counts per second. D3V: dorsal 3rd ventricle; DG: dentate gyrus; MHb: medial habenula; LHb: lateral Habenula; PVT: paraventricular thalamus; sm: *stria medularis*. \$ $p < 0.05$, significant difference between the mean and 0. Adapted from Paxinos and Franklin, 2001 and Allen Brain Institute (www.brain-map.org) mouse atlas.

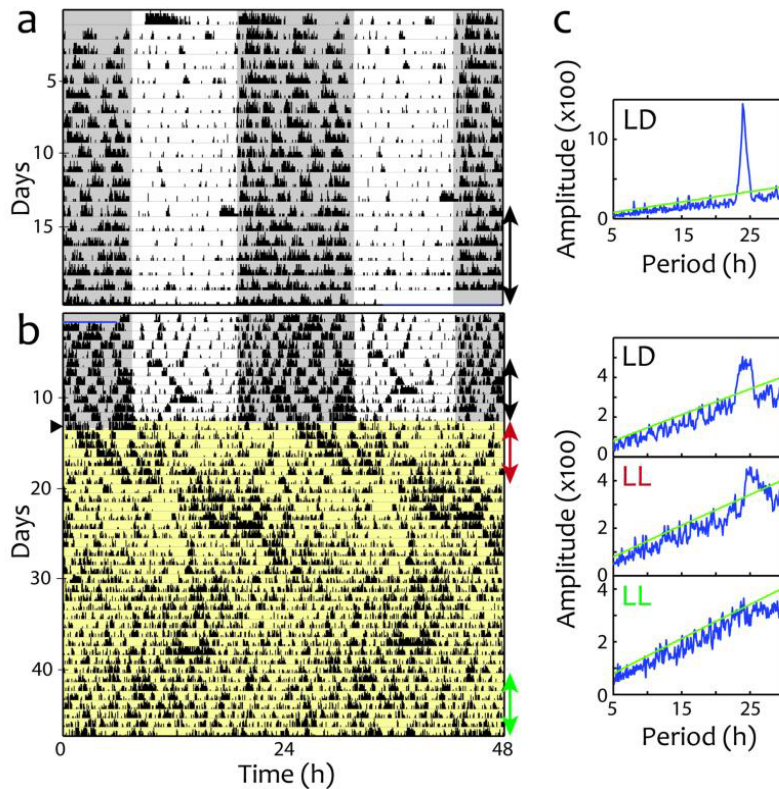


Fig. 5. The LL condition induced loss of circadian rhythms of locomotor activity. Double plotted actograms of mice kept in LD (**a**) and LL conditions (**b**). At first, animals from both groups (LD or LL) were synchronized to a 24h-LD cycle. Under LL exposure (head of the arrow), mice showed increasing period (second arrow in **b**) and then became arrhythmic (last arrow in **b**). **c**) Arrows in **a** and **b** indicate the 10 days used to determine the period of circadian behaviour by using the χ^2 periodogram method; periodograms follow the same order as arrows.

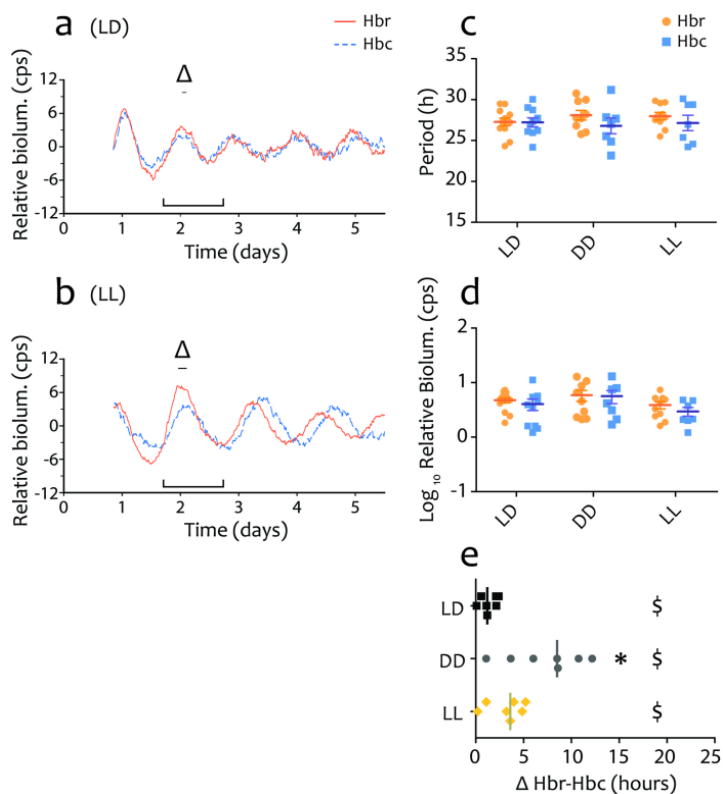


Fig. 6. Constant darkness uncoupled oscillations of Hb explants. Hbr (solid orange line) and Hbc (dashed blue line) oscillations from LD (**a**) and LL-exposed (**b**) mice. No difference was noticed in the period (**c**) or in the amplitude (**d**) between Hbr (orange circles) and Hbc (blue squares) explants and between LD, DD and LL conditions. **e**) Δ values between Hbr and Hbc phases according to lighting conditions. Each phase corresponded to the time when the first peak of PER2::LUC oscillation occurs 24h-48h after culture (brackets in **a** and **b** show this time window). Phase differences of Hbr and Hbc were different from zero and those in LD (square) and LL (diamond) conditions were clustered. However, under DD condition there was a higher and significant variance (desynchronization) between the two parts of Hb compared to the other lighting housing conditions. Cps: counts per second. \$ $p < 0.05$, significant difference between the mean and 0. * $p < 0.05$, significant difference vs. LD.

Supplemental information

Table S1 Amplitude raw data and its \log_{10} transformation for each group in bioluminescence experiments

	SHAM		SCNX		LD		LL	
	Hbr	Hbc	Hbr	Hbc	Hbr	Hbc	Hbr	Hbc
Amplitude (\log_{10} in cps)	0.66 ± 0.10	0.65 ± 0.14	0.84 ± 0.13	0.64 ± 0.12	0.65 ± 0.05	0.50 ± 0.10	0.54 ± 0.07	0.42 ± 0.08
Amplitude (raw data in cps)	5.77 ± 1.32	5.53 ± 1.50	8.54 ± 1.83	5.66 ± 1.83	4.76 ± 0.50	4.04 ± 0.96	3.88 ± 0.58	2.96 ± 0.54

cps: counts per second

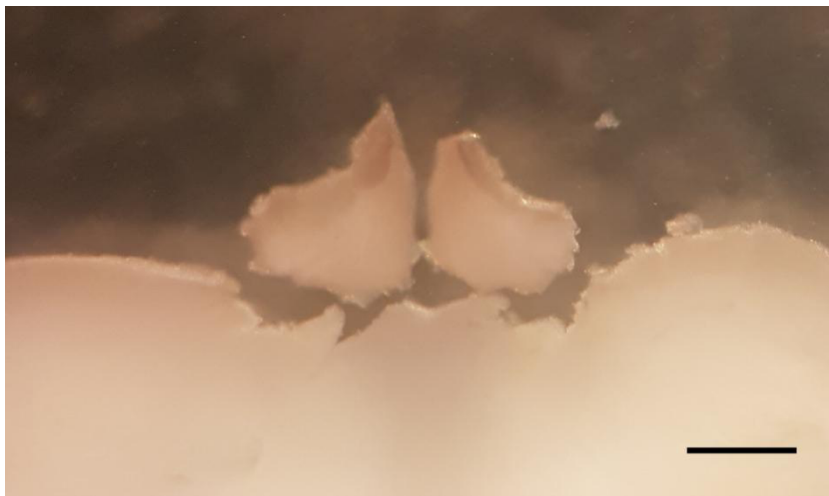


Fig. S1. Photomicrograph of the Hbr explants microdissected for bioluminescence recording. The endpendal cells, the paraventricular nucleus of the thalamus, the hippocampus and other nuclei surrounding the Hb were removed. Scale bar: 500 μm .

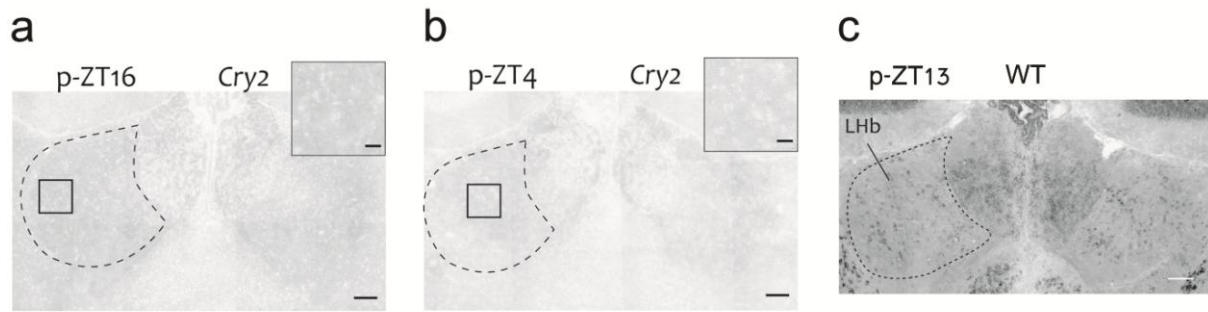


Fig. S2. (a-b) In double *Per1-Per2* mutant mice *Cry2* mRNA was undetectable in every time point investigated. (c) *Cry2* expression at p-ZT13 in a WT mouse. This positive control was included in the series of staining performed for the KO sections. Scale bar 100µm. Zoom 25µm.

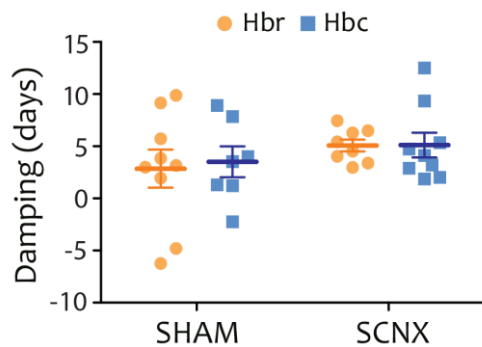


Fig. S3. Rate of damping (days) of PER2::LUC oscillations in both Hbr and Hbc explants from SHAM and SCN animals. SCN lesions do not affect the damping rate circadian rhythms of PER2::LUC oscillations in Hb explants. Damping rate is the number of days required for the amplitude of the rhythm to decrease to $1/e$ ($\sim 36.8\%$) of the starting value (Izumo et al. 2003). Values were determined with the LumiCycle analysis software (Actimetrics).

Izumo M, Johnson CH, Yamazaki S (2003) Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting: temperature compensation and damping. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100 (26): 16089-94.

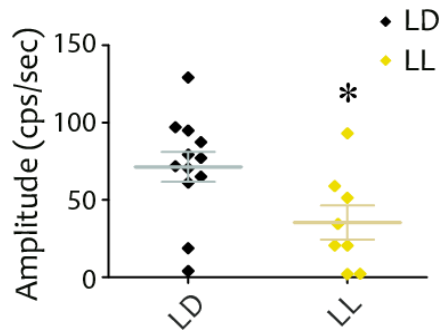


Fig. S4. Constant light (LL) decreases SCN PER2::LUC oscillations amplitude in comparison with those of animals kept in normal light-dark cycle (LD). 71.41 ± 9.67 cps in LD, $n=12/13$ [92%] vs. 35.44 ± 11.01 cps in LL, $n=8/13$ [62%]; $P=0.0264$, *t*-test. Cps/sec: counts per second. * $p < 0.05$, significant difference between LD and LL conditions.

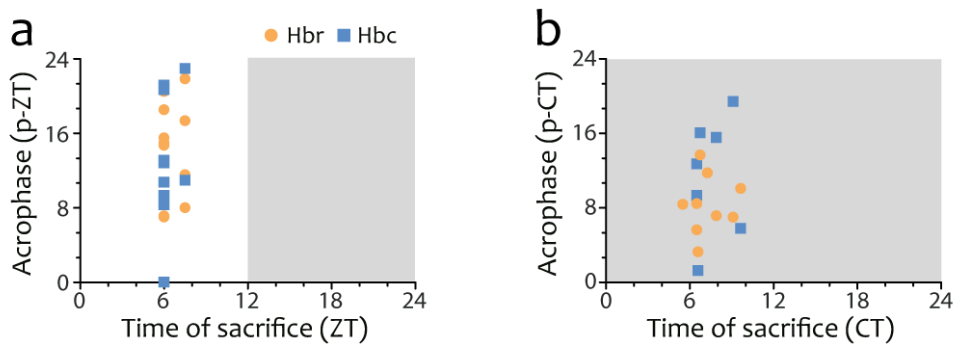


Fig. S5. Acrophases from Hb explants of animals kept (a) in LD and (b) in DD (SHAM) are not under the influence of time of sacrifice. CT: circadian time; p-CT: projected-circadian time; p-ZT: projected-*Zeitgeber* time; ZT: *Zeitgeber* time.

Article 2

The circadian clock in the mouse habenula is set by catecholamines

Nora L. Salaberry and Jorge Mendoza

Institute of Cellular and Integrative Neurosciences, CNRS UPR-3212, 5 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg, France

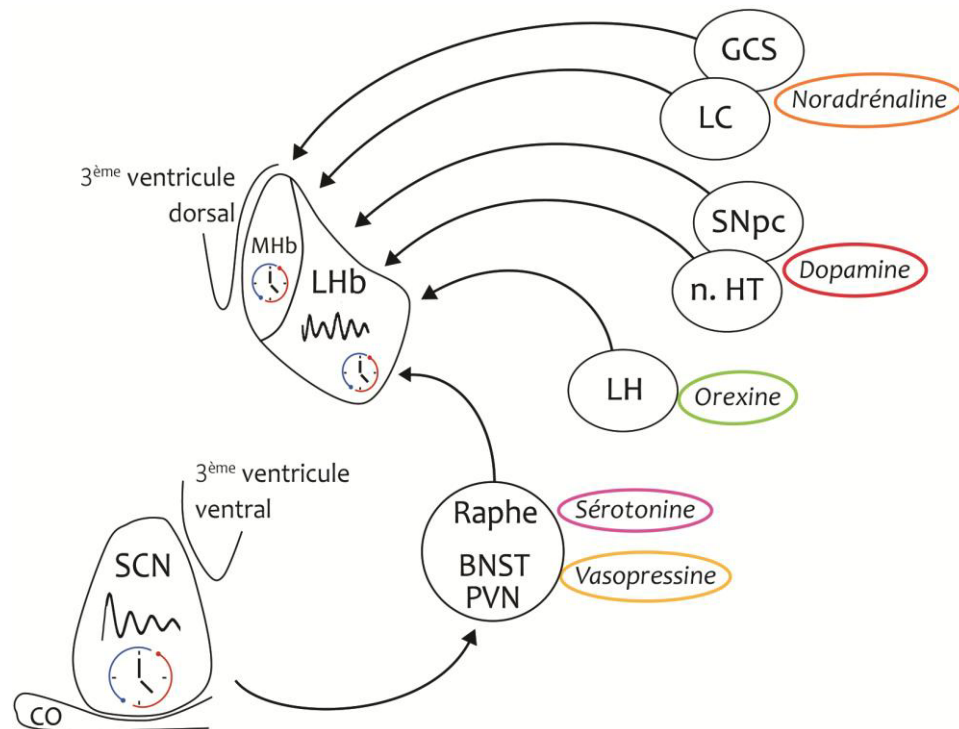


FIGURE 19 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ETUDE. Dans cette partie, nous avons voulu étudier l'impact de différents neurotransmetteurs ou neuropeptides sur l'horloge de l'habénula. BNST : noyau du lit de la *stria terminalis* ; GCS : ganglions cervicaux supérieurs ; LC : *locus caeruleus* ; LH : hypothalamus latéral ; n. HT : noyau hypothalamique ; SCN : noyau suprachiasmatique ; SNpc : substance noire *pars compacta* ; PVN : noyau paraventriculaire.

Dans ce deuxième article, nous avons accompli le dernier objectif de ce travail de thèse – c'est-à-dire éclaircir quelle structure pourrait influencer l'horloge en s'intéressant tout d'abord à quelle molécule pourrait l'affecter (**voir FIGURE 19**).

Tous les trois jours, le milieu de culture des explants d'habénula ont été changé avec une concentration croissante d'une molécule (dopamine, sérotonine, AVP, orexine, noradrénaline). Les catécholamines augmentent significativement l'amplitude des oscillations de PER2::LUC sans que cet effet soit dû uniquement et spécifiquement aux récepteurs dopaminergiques D2 ou D4. A l'inverse, l'AVP diminuent significativement l'amplitude des oscillations de PER2::LUC et l'orexine, la période. La sérotonine quant à elle n'affecte en aucune mesure l'activité de la protéine PER2 dans nos expériences.

Abstract

Circadian rhythms are behavioral and molecular variations in organisms that follow roughly 24h-cycles and are sustained in the absence of any external cue. For many years, the suprachiasmatic nucleus was considered as the unique brain pacemaker. Currently, it is known that other brain areas are able to oscillate in a circadian manner, and independently of the SCN, such as the habenula in the epithalamus area, a key nucleus for monoamine control; how its clockwork is affected by internal signals has not been, however, fully characterized. Numerous inputs from the forebrain target the habenula, but also, from the midbrain catecholaminergic ventral tegmental area. Hence, the aim of this study was to determine whether and how monoamines, such as dopamine and noradrenaline, but also orexin A and vasopressin, all of them neurotransmission signals from forebrain and midbrain, affect the habenula circadian clock. Using the *Per2::luciferase* transgenic mice we found that amplitude, period and phase of PER2 circadian oscillations in habenula explants are affected by dopamine, noradrenaline, orexin A and vasopressin but not by serotonin; these effects were dose-dependent for noradrenaline. Finally, we found that D2 or D4 receptor specific agonists do not affect habenula clock neurons (PER2 expression) suggesting that the catecholamine effects on the amplitude of PER2 in the habenula is mediated by a general activation of dopamine receptors. In conclusion, the catecholaminergic, orexinergic and vasopressinergic transmission modulate the circadian properties of the habenula which can lead in timed regulation of behavior.

Key words

Circadian; Habenula; *Per2::Luciferase*; catecholamines; orexin; vasopressin

Abbreviations

5HT: 5-hydroxy-tryptophan (serotonin); 6-OHDA: 6-hydroxydopamine; AVP: arginine-vasopressin; DA: dopamine; DRD2: dopamine receptor D2; DRD4: dopamine receptor D4; Hb: habenula; Hbc: caudal Hb; Hbr: rostral Hb; LD cycle: Light/Dark cycle; LHb: lateral habenula; MHb: median habenula; NA: noradrenaline; ORXA: orexin A; *Per2::luc*: *Period2::luciferase*; PK2: prokineticin 2; PVN: paraventricular nucleus; SCN: suprachiasmatic nucleus; VTA: ventral tegmentale area

1. Introduction

Organisms have to adapt to daily changes imposed by day-night cycles. To detect these changes, species have developed internal timekeeping entities like the suprachiasmatic nucleus (SCN), localized in the hypothalamus, which is principally entrained to the light-dark (LD) cycle by direct retinal innervations from photosensitive retinal ganglion cells (Hattar et al., 2006; Welsh et al., 2010). The circadian (*circa*=around; *diem*=day) clock of the SCN depends on a molecular machinery of interlocked feedback loops encoded by a series of clock genes such as *Clock*, *Bmal1*, *Per1-3*, *Cry1-2* (Lowrey and Takahashi, 2011). Beyond the SCN, in the brain, circadian activity has been reported in the habenula (Hb), a small structure situated at the top of the epithalamus (Guilding et al., 2010).

The Hb is anatomically subdivided in a medial (MHb) and a lateral part (LHb), and both show circadian activity, although it is the LHb which presents more pronounced daily oscillations of clock protein expression and firing rate (Zhao and Rusak, 2005; Guilding et al., 2010; Wyse and Coogan, 2010; Sakhi et al., 2014a, 2014b; Z. Zhao et al., 2015). Moreover, the LHb shows electrical and cellular responses to light (Zhao and Rusak, 2005; Tavakoli-Nezhad and Schwartz, 2006; Dreosti et al., 2014; Shuboni et al., 2015). The LHb is a key nucleus for dopamine (DA) and serotonin (5HT) control, two important neurotransmitters in psychiatric pathologies such as addiction and depression (Lecourtier and Kelly, 2007; Lecca et al., 2014; Proulx et al., 2014; H. Zhao et al., 2015). The LHb modulates DAergic neurons from the ventral tegmental area (VTA), nucleus of the reward system, via the GABAergic rostromedial tegmental nucleus (RMTg) (Christoph et al., 1986; Matsumoto and Hikosaka, 2007; Ji and Shepard, 2007; Zhou et al., 2009; Brinschwitz et al., 2010; Lammel et al., 2012; Brown and Shepard, 2016). On the other way around the LHb receives VTA fibers and chronic exposure to drugs that induced a massive DA release results in the degeneration of the *fasciculus retroflexus*, the output of the Hb (Ellison et al., 1996; Ellison, 2002; Gruber et al., 2007; Lax et al., 2013). Furthermore, LHb receives glutamatergic inputs from the forebrain, including the prefrontal cortex, the septum and the lateral hypothalamus (LH), an important structure for the control of hedonic feeding intake in which orexin (ORX) communication between the LH and LHb is implicated (Zahm and Root, 2017). Thus, the LHb activity, including circadian, might be modulated by different neurotransmission systems or by stimuli able to affect them (e.g., drug intake, feeding).

ARTICLE 2

Behavioral and physiological drug effects and intake follow daily rhythms (Abarca et al., 2002). Indeed, cocaine and alcohol intake is higher at night than day in rats (Morgan and Roberts, 2004; Rosenwasser et al., 2005; Perreau-Lenz et al., 2012). On the other hand, in humans and rodents, circadian rhythms are disrupted by drug intake (Morgan and Roberts, 2004; Kosobud et al., 2007; Honma and Honma, 2009; Bass et al., 2010; Stowie et al., 2015). Recently, we reported that chronic exposure to methamphetamine, a drug of abuse, affects the period and amplitude of Hb PER2 luciferase circadian oscillations, but not those of the SCN of mice (Salaberry et al., 2017). Similarly, a highly palatable diet feeding changes the day-night expression of the protein PER2 in the LHb (Blancas-Velazquez et al., 2017). Therefore, PER2 circadian activity of the LHb affected by drug or food intake may be regulated by endogenous changes of molecules (e.g., DA) targeting the Hb. DA modulates the PER2 protein expression in the striatum via the D₂ DA receptors, while DAergic lesions induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) disrupt the daily rhythm of PER2 protein in the striatum (Hood et al., 2010). DA modulates Hb metabolism by decreasing glucose uptake, and a DA antagonist increase it (Shumake and Gonzalez-Lima, 2013). Hence, in the present study it was evaluated whether DA and other putative brain transmitters modulate PER2 protein expression in the Hb. We used the *Period2::Luciferase* (*Per2^{Luc}* or PER2::LUC) mice model to follow a rhythmic protein expression of the molecular clock.

2. Materials & methods

2|1. Animals

C57BL/6J homozygous *Per2^{Luc}* knock-in mice (initially from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA; (Yoo et al., 2004); n=63) were obtained from our breeding colony in Strasbourg (Chronobiotron platform, UMS3415, CNRS, University of Strasbourg, France). Mice (7-10 weeks old) were housed in group of 3 or 4 individuals with food (UAR, Epinay sur Orge, France) and water available *ad libitum*, in light-proof ventilated rooms, under 12h white light and 12h dim red light (<5 lux at cage level) cycle (LD12:12; lights on at 7:00 A.M.). All experiments were performed in accordance with the rules of the French National Law and the European Committee Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE).

2|2. Tissue culture for ex vivo bioluminescence

PER2::LUC bioluminescence recordings were performed using a Lumicycle photon-counting photomultiplier (Actimetrics, Wilmette, IL, USA). Animals were killed by cervical dislocation between Zeitgeber time 6-8 (6-8h after light turns on). In fact, time of sacrifice

does not change period or amplitude of PER2::LUC oscillations (data not shown). Brains were rapidly removed and placed in ice-cold Hank's balanced salt solution (HBSS; 1X, H1641, Sigma, Saint-Louis, MO, USA) containing sodium bicarbonate (0.035%, S8761, Sigma), HEPES (10 mM, H0887, Sigma) and antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, P433, Sigma). Coronal sections (500 µm) of the dorsal thalamus containing the Hb were made using a vibratome (MA752 Campden Instrument, Loughborough, U.K.) and a pair of scalpels to cut the brain regions of interest into small sections (1.0 mm²) according to mouse brain stereotaxic atlas (Paxinos and Franklin, 2001). The Hb, 1.2 mm of length, was separated in two pieces: rostral and caudal (**Figure 1A**), due to their different innervations and their difference of lateral and medial proportion (Gottesfeld, 1983; Paxinos and Franklin, 2001; Geisler et al., 2003; Zhang et al., 2016, 2018). Then, tissues were cultured on Millicell® culture membranes (PICMORG 50, Millipore, Billerica, MA, USA) in a 35 mm culture dish with 1 mL of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; D2902, Sigma) supplemented with D (+) glucose (0.35%, G7021, Sigma), sodium bicarbonate (0.035%), HEPES (10 mM), B27 (2%, 17504-044, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), antibiotics (25 U/mL penicillin and 25 µg/mL streptomycin), and beetle luciferin (0.1 mM, E1602, Promega, Madison, WI, USA). Culture dishes were sealed with high-vacuum grease (Dow corning®, Wiesbaden, Germany) and set in the Lumicycle device kept in a 37°C incubator for recording. Due to the size of the medial and lateral Hb, we did not separate them. Thus, we recorded all Hb signals.

2|3. Experimental design

Hb explants of *Per2^{Luc}* mice were exposed to different concentrations of drug every 3 days after one wash out to resynchronize all the cells and allow us to calculate the baseline of each sample. A last wash is done to see the ability of the tissue to go back to its own baseline (**Figure 1B**).

2|4. Drugs

Drugs were dissolved in deionized water. We used dopamine hydrochloride (DA, H8502, Sigma), DL-noradrenaline hydrochloride (NA, N112, Sigma), serotonin hydrochloride (5HT, H9523, Sigma) and the D2-type (sumanirole maleate, SML1087, Sigma) and D4-type agonist receptors (A-412997, ab120581, Abcam, Cambridge, U.K.). Moreover, the peptides orexin A (ORXA, O6012, Sigma) and arginine-vasopressin (AVP, H-1780, Abcam) were also used.

ARTICLE 2

Concentrations of drugs were chosen according to previous studies (see **Table 1**). The volume of drug in the medium never exceeded 0.01% of the total media volume (1ml).

2|5. Bioluminescence recording and analysis

Bioluminescence was recorded for 112s in 15 min bins intervals for at least 5 days. Waveforms of rhythmic bioluminescence emission were analyzed in Lumicycle software (Actimetrics). Data were subtracted with a 24h running average from the raw data, and smoothed with a 5h running average (Lumicycle software; Actimetrics). The period and amplitude of the first peak of PER2 protein expression were extracted from 3-days oscillation and calculated using the LM sin fit method (Lumicycle software; Actimetrics). The amplitude was then baseline-corrected with the mean of the first wash values. The Δ of the phase, appearance of the first acrophase (peak) after changing medium, was calculated by the following equation:

$$\Delta = T_{-1} + P_{-1} - T_{+1}$$

Where T_{-1} is the time (h) of the last peak before the medium change, P_{-1} is the period (h) of the oscillation before the medium change and T_{+1} is the time (h) of the first peak after medium change. Positive Δ means phase advance while negative Δ means phase delay.

Tissue samples that did not survive (bioluminescence activity as low as empty dish) were excluded from the analysis. Data are presented as hours for the period and phase, and as percentage of the baseline for the amplitude.

2|6. Statistical Analysis

All results are indicated as mean \pm SEM. Data were analyzed by two-way repeated measures analysis of variance (RM ANOVA) using the SigmaPlot Software (SigmaPlot; Systat Software Inc version 12.5). Data of amplitude for the NA and AVP treatment of Hbr samples were transformed with $y = \log_{10}(x)$ to fit the rules of ANOVA. Since ANOVA did not take negative data into account, we shifted all Δ phases with 24h to be able to perform statistics. Significant differences were analysed with Holm-Sidak-corrected *post hoc* comparisons. The α level was set at 0.05 for all the experiments.

3. Results

3|1. Monoamines

When we analyzed the effects of DA on the period of PER2::LUC bioluminescence in the Hbr and Hbc explants, no differences were observed between the drug and vehicle treatment

(**Figure 2A, B; Tables 2 and 3**). The analyses of the amplitude of PER2::LUC oscillations revealed that DA induced a significant increase of the Hb amplitude of oscillations (two or three-fold higher) compared to the controls (**Figure 2A, B; Tables 2 and 3**). Whereas in the Hbr, only the higher concentration (1 mM) induced a significant difference between the DA and vehicle (post-hoc test, $p=0.012$), in the Hbc the effect was observed from the first lower concentration (10 μM , $p=0.047$; 100 μM , $p=0.003$; 1 mM, $p<0.001$) indicating a dose-dependent effect (**Figure 2A, B**).

Similar to DA, NA treatment leads in a higher and significant increase in the amplitude of PER2::LUC oscillations in the Hb in a concentration manner. However, these changes were still higher than those observed by DA, up to 10 and 6 times of the baseline for Hbr and Hbc, respectively (**Fig 2C, D; Tables 2 and 3**). However, for the highest concentration (100 μM), the amplitude was decreased in both Hbr and Hbc. No changes on the period of PER2::LUC bioluminescence of Hb explants by NA were observed (**Fig 2C, D; Tables 2 and 3**). Unlike catecholamines, any change in circadian parameters (period, amplitude, phase) was noted when we added 5-HT in the medium (**Figure S1**).

To determine whether the drug exposure resets the phase of PER2 oscillations in Hb explants, we evaluated the phase of the first peak after the medium change and subtracted it to the previous peak before medium changes (Δ phase). DA did not change the Δ phase of Hbr or Hbc explants (**Fig. 2A, B; Tables 2 and 3**). However, PER2::LUC oscillations in both Hbr and Hbc treated with NA showed a significant phase delay $\sim 3\text{h}$ at the end of the experiment when the drug was removed (**Fig 2C, D; Tables 2 and 3**).

3|2. Dopamine Receptors

DA affects Hb clock mostly by increasing PER2::LUC amplitude, like in the striatum where DA increases PER2 expression via D_2 receptors (Hood et al., 2010). Interestingly, NA is also able to activate D_4 receptors in the Hb (Root et al., 2015). However, the DA type receptors which activate PER2 protein expression in the Hb are still unknown. To unravel the pathway used by the NA and the DA, we added sumanirole maleate and A-412997, respective DRD2 and DRD4 agonists, in the medium of our Hb explants. No differences were observed on the period of PER2::LUC oscillations in the presence of DRD2 and DRD4 agonists or vehicle (**Figure 3; Tables 2 and 3**). Unlike DA or NA, DRD2 and DRD4 failed to change the amplitude of PER2::LUC oscillations (**Figure 3; Tables 2 and 3**). Whereas DRD2 agonist does not affect the phase of Hbr and Hbc explants, A-412997 drug delayed the phase of PER2

oscillations in Hbr explants when 10 μ M concentration was applied (Post-hoc, $p=0.018$; **Figure 3**).

3|3. Neuropeptides

We evaluated whether ORX and AVP, whose fibers innervate the Hb differently along the rostrocaudal axis, affect PER2 activity (Buijs, 1978; Peyron et al., 1998; Zhang et al., 2016, 2018). ORX at 100 nM in the Hbc explants decreased the period of PER2::LUC oscillations (**Figure 4A**, $25.64\text{h} \pm 0.08\text{h}$ vs. $24.89\text{h} \pm 0.14$, $p=0.003$). ORX Hb treated explants also showed an increase in the amplitude of PER2::LUC oscillations (**Figure 4A, B**), although this effect was statistically significant in the Hbc sections exposed to 10 nM ($p=0.031$) and 100 nM ($p=0.015$; **Figure 4B**). We did not observe significant phase changes by ORX-A (**Figure 4A, B; Tables 2 and 3**).

AVP did not affect the period of Hb explants (**Fig 4C and 4D**). However, a significant decrease of the amplitude was noted at 300 nM of AVP in the Hbr explants ($p=0.005$), whereas no differences were observed in the Hbc samples (**Fig 4C; Tables 2 and 3**). A significant phase advance was observed in both Hbr ($\sim 4\text{h}$) and Hbc ($\sim 1.5\text{h}$) explants when AVP was added to their medium ($p=0.01$; **Fig 4C and 4D; Tables 2 and 3**).

4. Discussion

In the present study, we observed that Hb explants (from the rostral or caudal part) of *Per2::luciferase* transgenic mice exposed to DA, NA, ORXA or AVP show significant changes in period, amplitude and/or phase of PER2 bioluminescence oscillations, with a dose-dependent for NA. DA, NA, ORXA and AVP are important chemical inputs from the fore- and midbrain to the Hb for the regulation of motivated behaviors such as arousal, locomotion, food and drug intake, behaviors with circadian profiles (Mendoza and Challet, 2014; Webb et al., 2015). Since DA, ORX and AVP show rhythmic gene, protein and release expressions, circadian physiology of the Hb might be influenced or potentiated by these neurotransmission timing signals independent or dependent on the main SCN clock.

DA induced a significant increased of PER2 bioluminescence oscillations (amplitude) in the mouse Hb. Similarly, in the rat striatum rhythms of PER2 protein expression is DA-dependent since when blocking DA transmission pharmacologically or by anatomical denervation this disappears (Hood et al., 2010). Thus, although DA has similar effects in both striatum and Hb on PER2 rhythmic expression, in the striatum DA is essential for oscillations whereas in the

Hb DA potentiates, but not necessary, PER2 circadian rhythm. Interestingly, in the SCN DA facilitates and accelerates the behavioral re-entrainment to the light-dark cycle (Grippe et al., 2017). Hence, DA targets brain clocks to induce (striatum), potentiate (Hb) and modulate (SCN) the responses to synchronizers.

At the cellular level, DA affects the *Per2* gene via the cAMP response element-binding protein (CREB) early signaling pathway since the *Per2* promoter region contains a CRE-responsive site (Beaulieu et al., 2007). In fact, DA has an action on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the cAMP-CREB which leads to an increase of *Per* gene expression (Yujnovsky et al., 2006). Therefore, changes in amplitude of rhythms might indicate an up-regulation of PER2 in Hb neurons by DA. However, DA might also have a role to synchronize internally clock cells in the Hb leading in increased amplitude in the whole nucleus.

Initially, we evaluate the effect of DA on Hb oscillations due to the close relationship between the VTA and LHb (Morales and Margolis, 2017). Nevertheless, it was previously reported that the mesohabenular pathway is mainly of γ -Aminobutyric acid (GABA) and of glutamate origin (Root et al., 2014; Taylor et al., 2014). Indeed, DA neurons do not express the vesicular monoamine transporter 2 necessary for DA package in vesicles (Root et al., 2015). DA source may therefore come from another structure of the fore- or midbrain as the *substantia nigra pars compacta* which is part of A9 DAergic cell group, or the medial preoptic area and other hypothalamic nuclei from A14 DAergic cell group (Li et al., 1993).

Diverse DA receptors are expressed in the Hb (Savasta et al., 1986; Dawson et al., 1988; Wamsley et al., 1989; Bouthenet et al., 1991; Aizawa et al., 2012; Good et al., 2013; Khaled et al., 2014; Zhang et al., 2018). Interestingly, activation of D4 type receptors in the LHb is dependent on NA (Root et al., 2015). Thus, we evaluated the Hb clock responses to NA in mice. Similarly to DA, when we applied NA in the culture medium of Hb explants of *Per2^{Luc}* transgenic mice, we observed an important increase in the amplitude of these rhythms in a dose-dependent manner. The Hb is innervated by NA fibers from central and peripheral system according to lesional (Kobayashi et al., 1975; Gottesfeld, 1983), autoradiographic (Jones and Moore, 1977) and tracing studies (Gruber et al., 2007).

Recently, using $\alpha 2$ adrenergic agonist infusions showed that NE release within the LHb participates in the regulation of anxiety-related behaviors in rats (Purvis et al., 2018). Moreover, Gottesfeld (1983) reported NA concentrations in the Hb which varies according to

ARTICLE 2

the rostral-caudal axis, and noticed more important levels in the MHb than in the LHb. Our results support this statement: NA treatment increased the amplitude of PER2::LUC expression at a greater rate in the Hbr (10 times in comparison to the baseline) than in the Hbc (6 times). Since the NA pathway from the *locus caeruleus* is involved in the arousal phase of the sleep-wake cycle (Berridge, 2008), it is possible that the actions of NA on the Hb may contribute to the timing of the wake period to synchronize the clock in the Hb. This effect may depend on the activation of $\beta 1$ and $\beta 2$ adrenergic receptors. NA has been reported to induce the expression of *Per* and *Cry* genes via $\beta 1$ receptor in the pineal gland of Syrian hamsters at night (Simonneaux and Ribelayga, 2003; Simonneaux et al., 2004). However, these NA receptors are mainly present in the MHb (Nicholas et al., 1993), a region in which PER2 expression is less pronounced (Guilding et al., 2010). Nevertheless, because there is anatomical reports indicating a direct connection from the MHb to the LHb, it is possible that NA effects on PER2 in the LHb are modulated by the MHb (Kim and Chang, 2005).

5HT is another monoamine modulating the LHb, whose release is coming from fibers of median and dorsal raphe nucleus (Herkenham and Nauta, 1977; Shabel et al., 2012; Metzger et al., 2017). Serotonin release is rhythmic and is in phase with the locomotor activity rhythm (Semba et al., 1984; Dudley et al., 1998; Glass et al., 2000). In the SCN clock, 5HT has important resetting properties mainly by acting *Per* genes expression (Horikawa et al., 2000; Varcoe et al., 2003). However, here, we do not observed significant changes in PER2::LUC activity in the Hb by 5HT at any dose used, even though that 5HT receptors are expressed in the Hb (Wright et al., 1995; Aizawa et al., 2012; Han et al., 2016; Tchenio et al., 2016; Xie et al., 2016).

Stimulation of D2 receptors induces *Per* expression in the striatum and retina (Yujnovsky et al., 2006; Hood et al., 2010). The Hb contains both D1-type and D2-type family receptors (Savasta et al., 1986; Dawson et al., 1988; Wamsley et al., 1989; Bouthenet et al., 1991; Aizawa et al., 2012; Good et al., 2013; Khaled et al., 2014; Zhang et al., 2018). Moreover, NA effects in the Hb firing rate are mediated by the activation of D4 receptors (Good et al., 2013; Root et al., 2015). Our results showed that DRD2 agonist does not produced any effect in the PER2::LUC bioluminescence activity of Hb explants. However, DRD4 agonist exposure in media culture produces slight changes in phase and amplitude of PER2::LUC oscillations, suggesting that DA and NA actions might be mediated by the activation of D4 receptors. Because these changes were not comparable in magnitude to those observed when Hb

explants were exposed to DA or NA, it is possible that these changes are the result of a combined activation of DA receptors.

Among the principal inputs to the LHb, the lateral hypothalamus (LH) have been implicated in the regulation of reward and feeding (Tsujino and Sakurai, 2013; Zahm and Root, 2017) (Stamatakis et al., 2016). Recently we reported that in animals fed with a highly palatable diet, that affects ORX activity, PER2 expression of the LHb is significantly affected (Blancas-Velazquez et al., 2017). Therefore, here we evaluated the effects of ORXA in PER2::LUC bioluminescence. Similar to DA and NA, but in a less extend, ORXA induces an increase in the amplitude and a shortening of the period of PER2 bioluminescence activity in the Hb. Similarly, ORXA shortens the period of oscillations of PER2 in the hippocampus at the same concentration used in the present study (100 nM) (Ma et al., 2016). ORX binds to two types of receptor (A and B) which are both expressed in the LHb (Marcus et al., 2001; Ch'ng and Lawrence, 2015; Zhang et al., 2018). ORX receptors activation results mostly in an increase of kinases or phosphatases pathway which phosphorylate or dephosphorylate respectively critical amino acid residues of PER2 protein and this will alter the amplitude or period of circadian oscillations (Vanselow and Kramer, 2007; Tsujino and Sakurai, 2013; Leonard and Kukkonen, 2014; Davies et al., 2015). ORX fibers have been importantly involved in the regulation of motivated behaviors by modulating directly the VTA (Tsujino and Sakurai, 2013). However, the LH fibers projecting to the VTA and LHb turned out to be mostly glutamatergic and GABAergic neurons (Poller et al., 2013; Nieh et al., 2016; Stamatakis et al., 2016). Thus, neurons from the LH might affect circadian activity of the Hb clock through the activation of ORX, glutamate or GABA receptors.

The clock-coupling between the SCN and LHb has been proposed to be probably dependent on the AVP or prokineticin 2 (PK2) signaling from the SCN to the LHb (de Vries et al., 1981; Sakhi et al., 2014b), however, SCN lesions did not abolish the AVP fibers staining in the LHb (Hoorneman and Buijs, 1982; Rood et al., 2013). Both PK2 and AVP receptors are preferentially expressed in the LHb and MHb (Hernando et al., 2001; Cheng et al., 2002), and additional AVP projections from the PVN could act as a relay nucleus to link the SCN and LHb (Hernández et al., 2015). Hence, to evaluate at what extend one of these SCN-outputs may affect the Hb clockwork we exposed the explants to culture medium containing different concentrations of AVP. However, only a slight decrease of the amplitude was observed in the circadian oscillations of PER2::LUC bioluminescence in Hbr explants.

ARTICLE 2

In our study, we showed differences between the two parts of the Hb (rostral vs. caudal). The Hb is a heterogeneous structure by the morphology, the electrical activity, the molecular characteristics and the targets of its neurons (Andres et al., 1999; Geisler et al., 2003; Kim and Chang, 2005; Weiss and Veh, 2011; Aizawa et al., 2012; Wagner et al., 2014; Quina et al., 2015; Wagner et al., 2016, 2017; Zhang et al., 2018). Besides, AVP fibers are diffused in the Hbr while they are condense in the Hbc and in reverse for NA fibers (Gottesfeld, 1983; Zhang et al., 2016). Together, this may explain our dissimilar results from the Hbr to the Hbc.

5. Conclusion

In summary, in the present study we reported that the clock activity (PER2::LUC rhythms) in the Hb is affected mostly by catecholamines (DA and NA) and ORXA input signals. Cellular activity (gene and protein expression) or release of these molecules, involved in the regulation of motivated and reward behaviors, are quite rhythmic in the brain and their deregulation may result in sleep, addicted or feeding/metabolic consequences (Berridge and Robinson, 1998; Berridge, 2008; Hood et al., 2010; Tsujino and Sakurai, 2013). Moreover, catecholaminergic signaling to the Hb may serve as a kind of feedback inputs to give robustness and synchrony to the clock for appropriately circadian role. What exactly is the Hb clock role remains to be determinate in further studies, but it is possible that in circadian pathologies with a DAergic background (i.e., feeding, motivation, and sleep) the motion of the Hb epithalamic clock is compromised.

6. Acknowledgements

The investigators thank Miss Helene Hamm for technical support and the staff of the Chronobiotron facility for animal care. Funding sources of the present study were provided by the Agence National de la Recherche (ANR-14-CE13-0002-01 ADDiCLOCK JCJC to JM and NLS PhD fellow) and the Centre National de la Recherche Scientifique (JM).

7. Competing interest

Authors declare no potential conflicts of interest. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

8. References

- Abarca, C., Albrecht, U., Spanagel, R., 2002. Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9026–9030. <https://doi.org/10.1073/pnas.142039099>
- Aizawa, H., Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., Okamoto, H., 2012. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J. Comp. Neurol.* 520, 4051–4066. <https://doi.org/10.1002/cne.23167>
- Andres, K.H., von Düring, M., Veh, R.W., 1999. Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J. Comp. Neurol.* 407, 130–150.
- Bass, C.E., Jansen, H.T., Roberts, D.C.S., 2010. Free-running rhythms of cocaine self-administration in rats held under constant lighting conditions. *Chronobiol. Int.* 27, 535–548. <https://doi.org/10.3109/07420521003664221>
- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., 2007. The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.02.006>
- Berridge, C.W., 2008. Noradrenergic modulation of arousal. *Brain Res Rev* 58, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.10.013>
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 28, 309–369.
- Blancas-Velazquez, A., la Fleur, S.E., Mendoza, J., 2017. Effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on brain PER2 and BMAL1 protein expression in mice. *Appetite* 117, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.07.002>
- Bouthenet, M.L., Souil, E., Martres, M.P., Sokoloff, P., Giros, B., Schwartz, J.C., 1991. Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res.* 564, 203–219.
- Brinschwitz, K., Dittgen, A., Madai, V.I., Lommel, R., Geisler, S., Veh, R.W., 2010. Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.050>
- Brown, P.L., Shepard, P.D., 2016. Functional evidence for a direct excitatory projection from the lateral habenula to the ventral tegmental area in the rat. *J. Neurophysiol.* 116, 1161–1174. <https://doi.org/10.1152/jn.00305.2016>
- Buijs, R.M., 1978. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192, 423–435.
- Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M., Zhou, Q.-Y., 2002. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405–410. <https://doi.org/10.1038/417405a>
- Ch'ng, S.S., Lawrence, A.J., 2015. Distribution of the orexin-1 receptor (OX1R) in the mouse forebrain and rostral brainstem: A characterisation of OX1R-eGFP mice. *J. Chem. Neuroanat.* 66–67, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2015.03.002>
- Christoph, G.R., Leonzio, R.J., Wilcox, K.S., 1986. Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J. Neurosci.* 6, 613–619.
- Davies, J., Chen, J., Pink, R., Carter, D., Saunders, N., Sotiriadis, G., Bai, B., Pan, Y., Howlett, D., Payne, A., Randevara, H., Karteris, E., 2015. Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Sci Rep* 5, 12584. <https://doi.org/10.1038/srep12584>

ARTICLE 2

- Dawson, T.M., Barone, P., Sidhu, A., Wamsley, J.K., Chase, T.N., 1988. The D1 dopamine receptor in the rat brain: quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience* 26, 83–100.
- de Vries, G.J., Buijs, R.M., Swaab, D.F., 1981. Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain--presence of a sex difference in the lateral septum. *Brain Res.* 218, 67–78.
- Dreosti, E., Vendrell Llopis, N., Carl, M., Yaksi, E., Wilson, S.W., 2014. Left-right asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Curr. Biol.* 24, 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.016>
- Dudley, T.E., DiNardo, L.A., Glass, J.D., 1998. Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 18, 5045–5052.
- Ellison, G., 2002. Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry. *Eur Neuropsychopharmacol* 12, 287–297.
- Ellison, G., Irwin, S., Keys, A., Noguchi, K., Sulur, G., 1996. The neurotoxic effects of continuous cocaine and amphetamine in Habenula: implications for the substrates of psychosis. *NIDA Res. Monogr.* 163, 117–145.
- Geisler, S., Andres, K.H., Veh, R.W., 2003. Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 458, 78–97. <https://doi.org/10.1002/cne.10566>
- Glass, J.D., DiNardo, L.A., Ehlen, J.C., 2000. Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin release and circadian phase-resetting. *Brain Res.* 859, 224–232.
- Good, C.H., Wang, H., Chen, Y.-H., Mejias-Aponte, C.A., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., 2013. Dopamine D4 Receptor Excitation of Lateral Habenula Neurons via Multiple Cellular Mechanisms. *J. Neurosci.* 33, 16853–16864. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1844-13.2013>
- Gottesfeld, Z., 1983. Origin and distribution of noradrenergic innervation in the habenula: A neurochemical study. *Brain Research* 275, 299–304. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90990-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90990-3)
- Gruber, C., Kahl, A., Lebenheim, L., Kowski, A., Dittgen, A., Veh, R.W., 2007. Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neurosci. Lett.* 427, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.09.016>
- Guilding, C., Hughes, A.T.L., Piggins, H.D., 2010. Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience* 169, 1630–1639. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.015>
- Han, L.N., Zhang, L., Sun, Y.N., Du, C.X., Zhang, Y.M., Wang, T., Zhang, J., Liu, J., 2016. Serotonin7 receptors in the lateral habenular nucleus regulate depressive-like behaviors in the hemiparkinsonian rats. *Brain Research* 1644, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.05.016>
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., Berson, D.M., 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349. <https://doi.org/10.1002/cne.20970>
- Herkenham, M., Nauta, W.J., 1977. Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J. Comp. Neurol.* 173, 123–146. <https://doi.org/10.1002/cne.901730107>
- Hernández, V.S., Vázquez-Juárez, E., Márquez, M.M., Jáuregui-Huerta, F., Barrio, R.A., Zhang, L., 2015. Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. *Front Neuroanat* 9, 130. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00130>

- Hernando, F., Schoots, O., Lolait, S.J., Burbach, J.P., 2001. Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* 142, 1659–1668. <https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8067>
- Honma, K., Honma, S., 2009. The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1707–1717. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06976.x>
- Hood, S., Cassidy, P., Cossette, M.-P., Weigl, Y., Verwey, M., Robinson, B., Stewart, J., Amir, S., 2010. Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* 30, 14046–14058. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2128-10.2010>
- Hoorneman, E.M., Buijs, R.M., 1982. Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 243, 235–241.
- Horikawa, K., Yokota, S., Fuji, K., Akiyama, M., Moriya, T., Okamura, H., Shibata, S., 2000. Nonphotic entrainment by 5-HT1A/7 receptor agonists accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* 20, 5867–5873.
- Jhou, T.C., Fields, H.L., Baxter, M.G., Saper, C.B., Holland, P.C., 2009. The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61, 786–800. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.02.001>
- Ji, H., Shepard, P.D., 2007. Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J. Neurosci.* 27, 6923–6930. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0958-07.2007>
- Jones, B.E., Moore, R.Y., 1977. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res.* 127, 25–53.
- Khaled, M.A.T.M., Pushparaj, A., Di Ciano, P., Diaz, J., Le Foll, B., 2014. Dopamine D3 receptors in the basolateral amygdala and the lateral habenula modulate cue-induced reinstatement of nicotine seeking. *Neuropsychopharmacology* 39, 3049–3058. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.158>
- Kim, U., Chang, S.-Y., 2005. Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *J. Comp. Neurol.* 483, 236–250. <https://doi.org/10.1002/cne.20410>
- Kobayashi, R.M., Palkovits, M., Jacobowitz, D.M., Kopin, I.J., 1975. Biochemical mapping of the noradrenergic projection from the locus coeruleus. A model for studies of brain neuronal pathways. *Neurology* 25, 223–233.
- Kosobud, A.E.K., Gillman, A.G., Leffel, J.K., Pecoraro, N.C., Rebec, G.V., Timberlake, W., 2007. Drugs of abuse can entrain circadian rhythms. *ScientificWorldJournal* 7, 203–212. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.234>
- Lammel, S., Lim, B.K., Ran, C., Huang, K.W., Betley, M.J., Tye, K.M., Deisseroth, K., Malenka, R.C., 2012. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature11527>
- Lax, E., Friedman, A., Croitoru, O., Sudai, E., Ben-Moshe, H., Redlus, L., Sasson, E., Blumenfeld-Katzir, T., Assaf, Y., Yadid, G., 2013. Neurodegeneration of lateral habenula efferent fibers after intermittent cocaine administration: implications for deep brain stimulation. *Neuropharmacology* 75, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.034>
- Lecca, S., Meye, F.J., Mameli, M., 2014. The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1170–1178. <https://doi.org/10.1111/ejn.12480>

ARTICLE 2

- Lecourtier, L., Kelly, P.H., 2007. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 658–672. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.004>
- Leonard, C.S., Kukkonen, J.P., 2014. Orexin/hypocretin receptor signalling: a functional perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171, 294–313. <https://doi.org/10.1111/bph.12296>
- Li, J.-D., Burton, K.J., Zhang, C., Hu, S.-B., Zhou, Q.-Y., 2009. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 296, R824–R830. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90463.2008>
- Li, Y.Q., Takada, M., Shinonaga, Y., Mizuno, N., 1993. The sites of origin of dopaminergic afferent fibers to the lateral habenular nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 333, 118–133. <https://doi.org/10.1002/cne.903330110>
- Lowrey, P.L., Takahashi, J.S., 2011. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Adv. Genet.* 74, 175–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>
- Ma, Z., Jiang, W., Zhang, E.E., 2016. Orexin signaling regulates both the hippocampal clock and the circadian oscillation of Alzheimer's disease-risk genes. *Scientific Reports* 6, 36035. <https://doi.org/10.1038/srep36035>
- Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435, 6–25.
- Matsumoto, M., Hikosaka, O., 2007. Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115. <https://doi.org/10.1038/nature05860>
- McCall, R.B., Lookingland, K.J., Bédard, P.J., Huff, R.M., 2005. Sumanitrole, a highly dopamine D2-selective receptor agonist: in vitro and in vivo pharmacological characterization and efficacy in animal models of Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1248–1256. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.084202>
- Metzger, M., Bueno, D., Lima, L.B., 2017. The lateral habenula and the serotonergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 162, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.05.007>
- Morgan, D., Roberts, D.C.S., 2004. Sensitization to the reinforcing effects of cocaine following binge-abstinent self-administration. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 803–812. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.11.004>
- Nicholas, A.P., Pieribone, V.A., Hökfelt, T., 1993. Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 56, 1023–1039.
- Nieh, E.H., Vander Weele, C.M., Matthews, G.A., Presbrey, K.N., Wichmann, R., Leppla, C.A., Izadmehr, E.M., Tye, K.M., 2016. Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron* 90, 1286–1298. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.035>
- Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Second Edition, 2 edition. ed. Academic Press, San Diego.
- Perreau-Lenz, S., Vengeliene, V., Noori, H.R., Merlo-Pich, E.V., Corsi, M.A., Corti, C., Spanagel, R., 2012. Inhibition of the casein-kinase-1- ϵ/δ prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology* 37, 2121–2131. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.62>
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., Kilduff, T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.

- Poller, W.C., Madai, V.I., Bernard, R., Laube, G., Veh, R.W., 2013. A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. *Brain Res.* 1507, 45–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.029>
- Proulx, C.D., Hikosaka, O., Malinow, R., 2014. Reward processing by the lateral habenula in normal and depressive behaviors. *Nat Neurosci* 17, 1146–1152. <https://doi.org/10.1038/nn.3779>
- Quina, L.A., Tempest, L., Ng, L., Harris, J.A., Ferguson, S., Jhou, T.C., Turner, E.E., 2015. Efferent pathways of the mouse lateral habenula. *J. Comp. Neurol.* 523, 32–60. <https://doi.org/10.1002/cne.23662>
- Rood, B.D., Stott, R.T., You, S., Smith, C.J.W., Woodbury, M.E., De Vries, G.J., 2013. Site of origin of and sex differences in the vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain. *J. Comp. Neurol.* 521, 2321–2358. <https://doi.org/10.1002/cne.23288>
- Root, D.H., Hoffman, A.F., Good, C.H., Zhang, S., Gigante, E., Lupica, C.R., Morales, M., 2015. Norepinephrine activates dopamine D4 receptors in the rat lateral habenula. *J. Neurosci.* 35, 3460–3469. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4525-13.2015>
- Root, D.H., Mejias-Aponte, C.A., Zhang, S., Wang, H.-L., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., Morales, M., 2014. Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci.* 17, 1543–1551. <https://doi.org/10.1038/nn.3823>
- Rosenwasser, A.M., Fecteau, M.E., Logan, R.W., 2005. Effects of ethanol intake and ethanol withdrawal on free-running circadian activity rhythms in rats. *Physiology & Behavior* 84, 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.01.016>
- Sakhi, K., Belle, M.D.C., Gossan, N., Delagrangé, P., Piggins, H.D., 2014a. Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 587–603. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.263319>
- Sakhi, K., Wegner, S., Belle, M.D.C., Howarth, M., Delagrangé, P., Brown, T.M., Piggins, H.D., 2014b. Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 5025–5045. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.280065>
- Salaberry, N.L., Mateo, M., Mendoza, J., 2017. The Clock Gene *Rev-Erb α* Regulates Methamphetamine Actions on Circadian Timekeeping in the Mouse Brain. *Mol. Neurobiol.* 54, 5327–5334. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0076-z>
- Savasta, M., Dubois, A., Scatton, B., 1986. Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [³H]SCH 23390. *Brain Research* 375, 291–301. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90749-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90749-3)
- Semba, J., Toru, M., Mataga, N., 1984. Twenty-four hour rhythms of norepinephrine and serotonin in nucleus suprachiasmaticus, raphe nuclei, and locus coeruleus in the rat. *Sleep* 7, 211–218.
- Shabel, S.J., Proulx, C.D., Trias, A., Murphy, R.T., Malinow, R., 2012. Input to the lateral habenula from the basal ganglia is excitatory, aversive, and suppressed by serotonin. *Neuron* 74, 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.037>
- Shuboni, D.D., Cramm, S.L., Yan, L., Ramanathan, C., Cavanaugh, B.L., Nunez, A.A., Smale, L., 2015. Acute effects of light on the brain and behavior of diurnal *Arvicantis niloticus* and nocturnal *Mus musculus*. *Physiol. Behav.* 138, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.09.006>
- Shumake, J., Gonzalez-Lima, F., 2013. Functional opposition between habenula metabolism and the brain reward system. *Front. Hum. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00662>
- Simonneaux, V., Poirel, V.-J., Garidou, M.-L., Nguyen, D., Diaz-Rodriguez, E., Pévet, P., 2004. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 120, 164–172.

ARTICLE 2

- Simonneaux, V., Ribelayga, C., 2003. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacol Rev* 55, 325–395. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2>
- Stamatakis, A.M., Swieten, M.V., Basiri, M.L., Blair, G.A., Kantak, P., Stuber, G.D., 2016. Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *J. Neurosci.* 36, 302–311. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-15.2016>
- Stowie, A.C., Amicarelli, M.J., Prosser, R.A., Glass, J.D., 2015. Chronic cocaine causes long-term alterations in circadian period and photic entrainment in the mouse. *Neuroscience* 284, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.057>
- Tavakoli-Nezhad, M., Schwartz, W.J., 2006. Hamsters running on time: is the lateral habenula a part of the clock? *Chronobiol. Int.* 23, 217–224. <https://doi.org/10.1080/07420520500521947>
- Taylor, S.R., Badurek, S., Dileone, R.J., Nashmi, R., Minichiello, L., Picciotto, M.R., 2014. GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 522, 3308–3334. <https://doi.org/10.1002/cne.23603>
- Tchenio, A., Valentinova, K., Mameli, M., 2016. Can the Lateral Habenula Crack the Serotonin Code? *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00034>
- Tsujino, N., Sakurai, T., 2013. Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci* 7, 28. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00028>
- Vanselow, K., Kramer, A., 2007. Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 167–176. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.036>
- Varcoe, T.J., Kennaway, D.J., Voultzios, A., 2003. Activation of 5-HT_{2C} receptors acutely induces Per gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus at night. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 119, 192–200.
- Wagner, F., French, L., Veh, R.W., 2016. Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct Funct* 221, 39–58. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0891-9>
- Wagner, F., Stroh, T., Veh, R.W., 2014. Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *J. Comp. Neurol.* 522, 2650–2662. <https://doi.org/10.1002/cne.23554>
- Wagner, F., Weiss, T., Veh, R.W., 2017. Electrophysiological properties of neurons and synapses in the lateral habenular complex (LHb). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.07.008>
- Wamsley, J.K., Gehlert, D.R., Filloux, F.M., Dawson, T.M., 1989. Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. *J. Chem. Neuroanat.* 2, 119–137.
- Weiss, T., Veh, R.W., 2011. Morphological and electrophysiological characteristics of neurons within identified subnuclei of the lateral habenula in rat brain slices. *Neuroscience* 172, 74–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.047>
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., Kay, S.A., 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Wright, D.E., Seroogy, K.B., Lundgren, K.H., Davis, B.M., Jennes, L., 1995. Comparative localization of serotonin_{1A}, _{1C}, and ₂ receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 351, 357–373. <https://doi.org/10.1002/cne.903510304>

- Wyse, C.A., Coogan, A.N., 2010. Impact of aging on diurnal expression patterns of CLOCK and BMAL1 in the mouse brain. *Brain Research* 1337, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.113>
- Xie, G., Zuo, W., Wu, L., Li, W., Wu, W., Bekker, A., Ye, J.-H., 2016. Serotonin modulates glutamatergic transmission to neurons in the lateral habenula. *Sci Rep* 6, 23798. <https://doi.org/10.1038/srep23798>
- Yujnovsky, I., Hirayama, J., Doi, M., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P., 2006. Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 6386–6391. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510691103>
- Zahm, D.S., Root, D.H., 2017. Review of the cytology and connections of the lateral habenula, an avatar of adaptive behaving. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 162, 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.06.004>
- Zhang, L., Hernández, V.S., Swinny, J.D., Verma, A.K., Giesecke, T., Emery, A.C., Mutig, K., Garcia-Segura, L.M., Eiden, L.E., 2018. A GABAergic cell type in the lateral habenula links hypothalamic homeostatic and midbrain motivation circuits with sex steroid signaling. *Transl Psychiatry* 8, 50. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0099-5>
- Zhang, L., Hernández, V.S., Vázquez-Juárez, E., Chay, F.K., Barrio, R.A., 2016. Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? *Front. Neural Circuits* 13. <https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00013>
- Zhao, H., Rusak, B., 2005. Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience* 132, 519–528. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.012>
- Zhao, H., Zhang, B.-L., Yang, S.-J., Rusak, B., 2015. The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. *Behav. Brain Res.* 277, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.016>
- Zhao, Z., Xu, H., Liu, Y., Mu, L., Xiao, J., Zhao, H., 2015. Diurnal Expression of the Per2 Gene and Protein in the Lateral Habenular Nucleus. *Int J Mol Sci* 16, 16740–16749. <https://doi.org/10.3390/ijms160816740>
- Zuo, W., Chen, L., Wang, L., Ye, J.-H., 2013. Cocaine facilitates glutamatergic transmission and activates lateral habenular neurons. *Neuropharmacology* 70, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.008>

9. Tables

Table 1. Specifications of drugs used for bioluminescence recordings.

DRUG	Concentrations (μ M)	Supplier (catalog n $^{\circ}$)	References
Dopamine (DA)	10, 100, 1000	Sigma H8502	<i>Zuo et al., 2013</i>
Noradrenaline (NA)	1, 10, 100	Sigma N112	<i>Root et al., 2015</i>
Serotonin (5-HT)	10, 100, 500	Sigma H9523	<i>Shabel et al., 2012</i>
Sumanriole (D ₂ agonist)	1, 10, 100	Sigma SML1087	<i>McCall et al., 2005</i>
A-412997 (D ₄ agonist)	1, 10, 100	Abcam AB120581	<i>Good et al., 2013</i>
Orexin-A (ORX-A)	0.01, 0.1, 0.2	Sigma H8502	<i>Ma et al., 2016</i>
Vasopressin (AVP)	0.03, 0.15, 0.3	Bachem, H-1780	<i>Li et al., 2009</i>

Table 2: Effect of different drugs on the oscillations of Hbr samples of PER2::LUC mice

		Period		Amplitude		Δ phase	
		Fisher	P value	Fisher	P value	Fisher	P value
DA	Drug	F _(1,69) =1.277	p=0.281	F _(1,69) =1.423	p=0.256	F _(1,55) =4.543	p=0.054
	Concentration	F _(4,69) =3.388	<u>p=0.016</u>	F _(4,69) =9.587	<u>p<0.001</u>	F _(3,55) =0.079	p=0.971
	Interaction	F _(4,69) =3.022	<u>p=0.027</u>	F _(4,69) =6.014	<u>p<0.001</u>	F _(3,55) =1.192	p=0.327
NA	Drug	F _(1,59) =0.844	p=0.380	F _(1,59) =7.690	<u>p=0.020</u>	F _(1,47) =0.990	p=0.343
	Concentration	F _(4,59) =5.421	<u>p=0.001</u>	F _(4,59) =28.534	<u>p<0.001</u>	F _(3,47) =6.323	<u>p=0.002</u>
	Interaction	F _(4,59) =1.526	p=0.213	F _(4,59) =18.075	<u>P<0.001</u>	F _(3,47) =4.785	<u>p=0.008</u>
5HT	Drug	F _(1,59) =0.797	p=0.393	F _(1,59) =0.005	p=0.947	F _(1,47) =0.072	p=0.794
	Concentration	F _(4,59) =7.384	<u>p<0.001</u>	F _(4,59) =6.095	<u>p<0.001</u>	F _(3,47) =0.842	p=0.482
	Interaction	F _(4,59) =0.779	p=0.546	F _(4,59) =2.662	<u>p=0.046</u>	F _(3,47) =0.525	p=0.669
DRD2	Drug	F _(1,59) =0.858	p=0.376	F _(1,59) =0.030	p=0.865	F _(1,47) =2.189	p=0.170
	Concentration	F _(4,59) =4.250	<u>p=0.006</u>	F _(4,59) =3.890	<u>p=0.009</u>	F _(3,47) =2.616	p=0.069
	Interaction	F _(4,59) =2.031	p=0.108	F _(4,59) =2.789	<u>p=0.039</u>	F _(3,47) =2.629	p=0.068
DRD4	Drug	F _(1,59) =0.229	p=0.643	F _(1,59) =0.001	p=0.972	F _(1,47) =4.379	p=0.063
	Concentration	F _(4,59) =3.701	<u>p=0.012</u>	F _(4,59) =4.813	<u>p=0.003</u>	F _(3,47) =2.687	p=0.064
	Interaction	F _(4,59) =5.509	p=0.001	F _(4,59) =2.185	p=0.088	F _(3,47) =4.341	<u>p=0.012</u>
ORXA	Drug	F _(1,64) =0.652	p=0.436	F _(1,64) =0.096	p=0.762	F _(1,51) =0.137	p=0.718
	Concentration	F _(4,64) =4.840	<u>p=0.003</u>	F _(4,64) =4.197	<u>p=0.006</u>	F _(3,51) =0.484	p=0.696
	Interaction	F _(4,64) =2.947	<u>p=0.030</u>	F _(4,64) =1.200	p=0.324	F _(3,51) =0.588	p=0.627
AVP	Drug	F _(1,69) =2.090	p=0.174	F _(1,69) =3.326	p=0.093	F _(1,55) =0.093	p=0.765
	Concentration	F _(4,69) =7.075	<u>p<0.001</u>	F _(4,69) =1.805	p=0.143	F _(3,55) =3.669	<u>p=0.021</u>
	Interaction	F _(4,69) =4.895	<u>p=0.002</u>	F _(4,69) =3.158	<u>p=0.022</u>	F _(3,55) =3.488	<u>p=0.025</u>

The underlined number indicates significant p values.

Table 3: Effect of different drugs on the oscillations of Hbc samples of PER2::LUC mice

DA Effect	Period		Amplitude		Δ phase		
	Fisher	P value	Fisher	P value	Fisher	P value	
DA	Drug	F _(1,69) =2.950	p=0.112	F _(1,69) =7.827	<u>p=0.016</u>	F _(1,55) =0.235	p=0.637
	Concentration	F _(4,69) =4.373	<u>p=0.004</u>	F _(4,69) =4.573	<u>p=0.003</u>	F _(3,55) =2.428	p=0.081
	Interaction	F _(4,69) =1.376	p=0.256	F _(4,69) =6.955	<u>p<0.001</u>	F _(3,55) =1.332	p=0.279
NA	Drug	F _(1,59) =0.259	p=0.620	F _(1,59) =27.813	<u>p<0.001</u>	F _(1,55) =10.940	<u>p=0.006</u>
	Concentration	F _(4,59) =1.516	p=0.212	F _(4,59) =22.310	<u>p<0.001</u>	F _(3,55) =7.271	<u>p<0.001</u>
	Interaction	F _(4,59) =0.718	p=0.584	F _(4,59) =23.262	<u>p<0.001</u>	F _(3,55) =9.615	<u>p<0.001</u>
5HT	Drug	F _(1,59) =6.637	p=0.028	F _(1,59) =0.007	p=0.934	F _(1,47) =2.390	p=0.153
	Concentration	F _(4,59) =3.319	<u>p=0.019</u>	F _(4,59) =3.870	<u>p=0.009</u>	F _(3,47) =3.819	<u>p=0.020</u>
	Interaction	F _(4,59) =2.520	p=0.056	F _(4,59) =0.677	p=0.612	F _(3,47) =5.769	<u>p=0.003</u>
DRD2	Drug	F _(1,59) =1.533	p=0.244	F _(1,59) =1.196	p=0.300	F _(1,47) =0.002	p=0.970
	Concentration	F _(4,59) =2.192	p=0.087	F _(4,59) =2.315	p=0.074	F _(3,47) =1.998	p=0.136
	Interaction	F _(4,59) =1.397	p=0.253	F _(4,59) =1.186	p=0.332	F _(3,47) =1.802	p=0.168
DRD4	Drug	F _(1,59) =0.019	p=0.893	F _(1,59) =0.165	p=0.693	F _(1,47) =0.174	p=0.685
	Concentration	F _(4,59) =3.258	<u>p=0.021</u>	F _(4,59) =8.317	<u>p<0.001</u>	F _(3,47) =4.135	<u>p=0.014</u>
	Interaction	F _(4,59) =1.473	p=0.229	F _(4,59) =0.388	p=0.816	F _(3,47) =0.704	p=0.557
ORXA	Drug	F _(1,64) =10.735	<u>p=0.007</u>	F _(1,64) =1.578	p=0.235	F _(1,51) =0.011	p=0.920
	Concentration	F _(4,64) =3.178	<u>p=0.022</u>	F _(4,64) =10.570	<u>p<0.001</u>	F _(3,51) =2.542	p=0.073
	Interaction	F _(4,64) =2.343	p=0.069	F _(4,64) =3.728	<u>p=0.011</u>	F _(3,51) =2.576	p=0.070
AVP	Drug	F _(1,69) =0.337	p=0.573	F _(1,69) =1.836	p=0.200	F _(1,55) =0.536	p=0.478
	Concentration	F _(4,69) =0.873	p=0.487	F _(4,69) =8.079	<u>p<0.001</u>	F _(3,55) =3.249	<u>p=0.033</u>
	Interaction	F _(4,69) =1.047	p=0.393	F _(4,69) =1.492	p=0.219	F _(3,55) =2.678	p=0.062

The underlined number indicates significant p values.

10. Figures

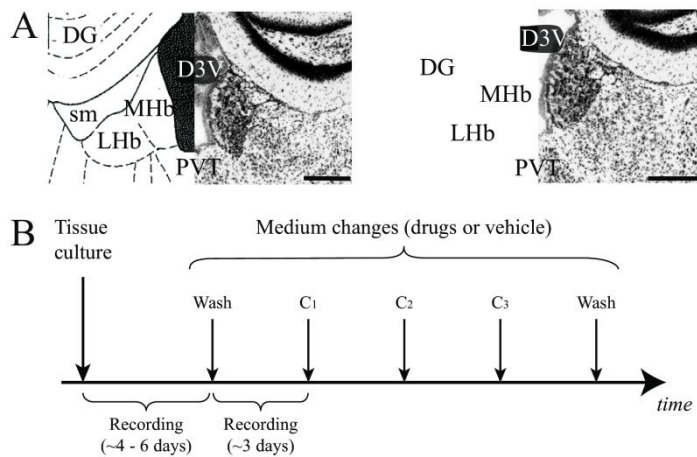


Figure 1 Experimental design. A) Schematic and representative pictures (cresyl violet staining) of the two regions of interest of the Hb that we used (left, Hbr; right, Hbc). B) Time line of the experiment for each Hb sample which receives in its culture medium an increased concentration of drug or vehicle, every 3 days. Scale bar: 250 μm . C₁₋₃: concentration 1-3; D3V: dorsal 3rd ventricle; DG: dentate gyrus; MHb: medial habenula; LHb: lateral Habenula; PVT: paraventricular thalamus; sm: *stria medularis*. Adapted from Paxinos and Franklin, 2001 and Allen Brain Institute (www.brain-map.org) mouse atlas.

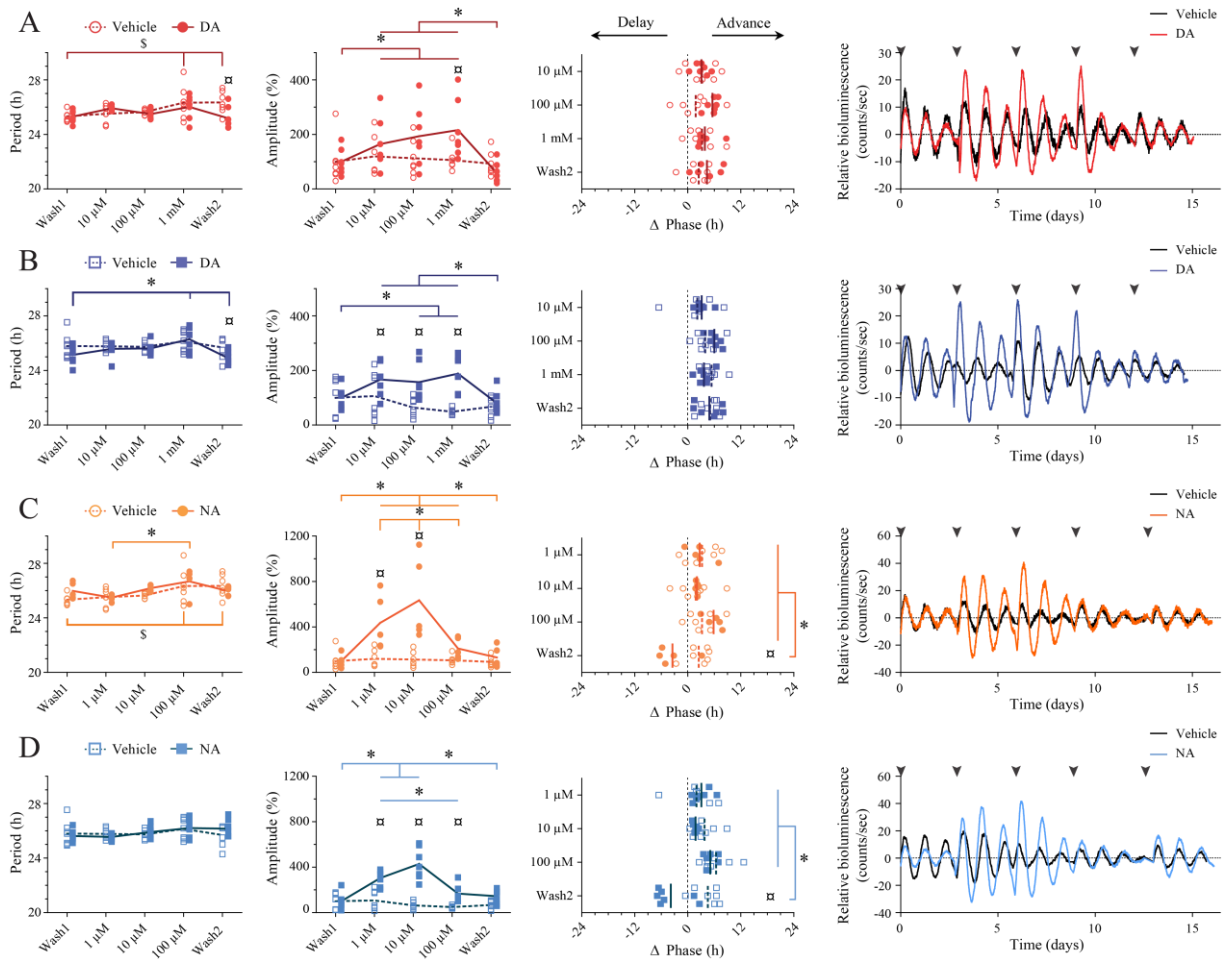


Figure 2 Effect of catecholamines on PER2::LUC oscillations in the rostral and caudal part of habenula explants. The period (first column), baseline-corrected amplitude (second column) and Δ phase (third column) of the PER2::LUC oscillations were chosen to describe the Hb clock. Dopamine or vehicle was added into the medium of the rostral (A) and caudal (B) part of the Hb explants. Noradrenaline or vehicle was added into the medium of the rostral (C) and caudal (D) part of the Hb explants. * $p < 0.05$, significant difference inside the drug group; \boxtimes $p < 0.05$, significant difference vehicle vs. drug; § $p < 0.05$, significant difference inside the vehicle group

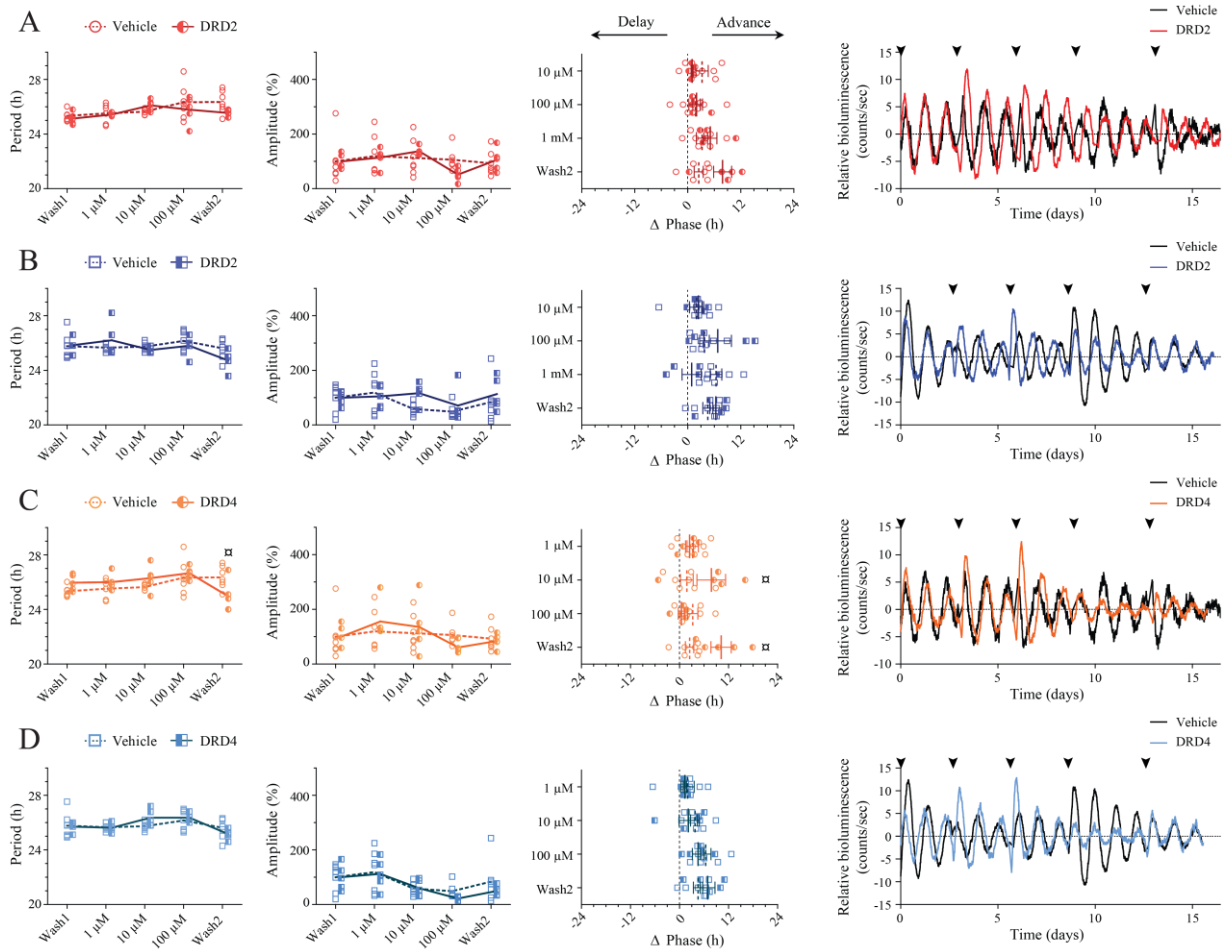


Figure 3 Effect of dopamine receptor D2 and D4 on PER2::LUC oscillations in the rostral and caudal part of habenula explants. The period (first column), baseline-corrected amplitude (second column) and Δ phase (third column) of the PER2::LUC oscillations were chosen to describe the Hb clock. DRD2 agonist or vehicle was added into the medium of the rostral (A) and caudal (B) part of the Hb explants. DRD4 agonist or vehicle was added into the medium of the rostral (C) and caudal (D) part of the Hb explants. * $p < 0.05$, significant difference inside the drug group; $\$$ $p < 0.05$, significant difference vehicle vs. drug; $\#$ $p < 0.05$, significant difference inside the vehicle group

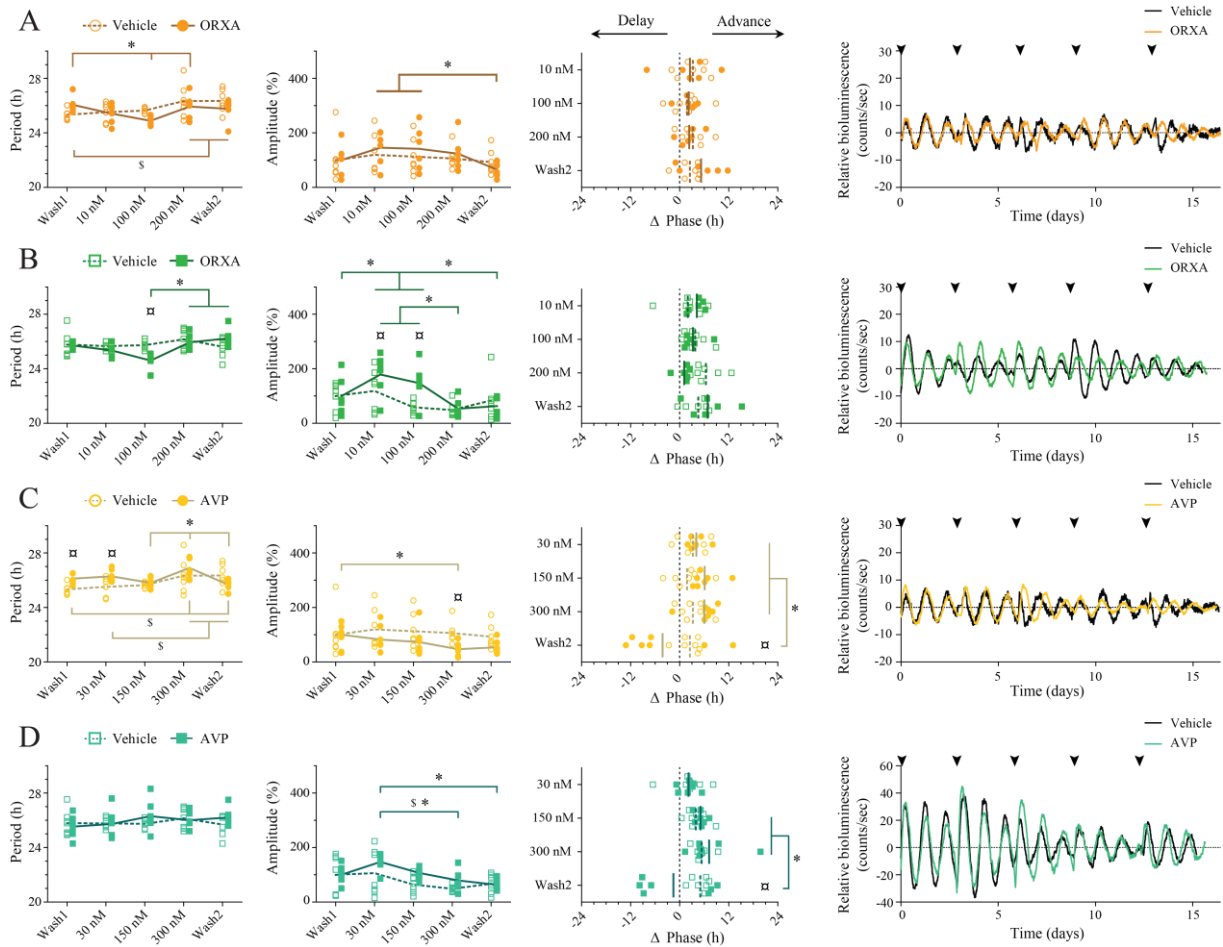


Figure 4 Effect of orexin A and vasopressin on PER2::LUC oscillations in the rostral and caudal part of habenula explants. The period (first column), baseline-corrected amplitude (second column) and Δ phase (third column) of the PER2::LUC oscillations were chosen to describe the Hb clock. ORXA or vehicle was added into the medium of the rostral (A) and caudal (B) part of the Hb explants. AVP or vehicle was added into the medium of the rostral (C) and caudal (D) part of the Hb explants. * $p < 0.05$, significant difference inside the drug group; α $p < 0.05$, significant difference vehicle vs. drug; \$ $p < 0.05$, significant difference inside the vehicle group

Supplemental information

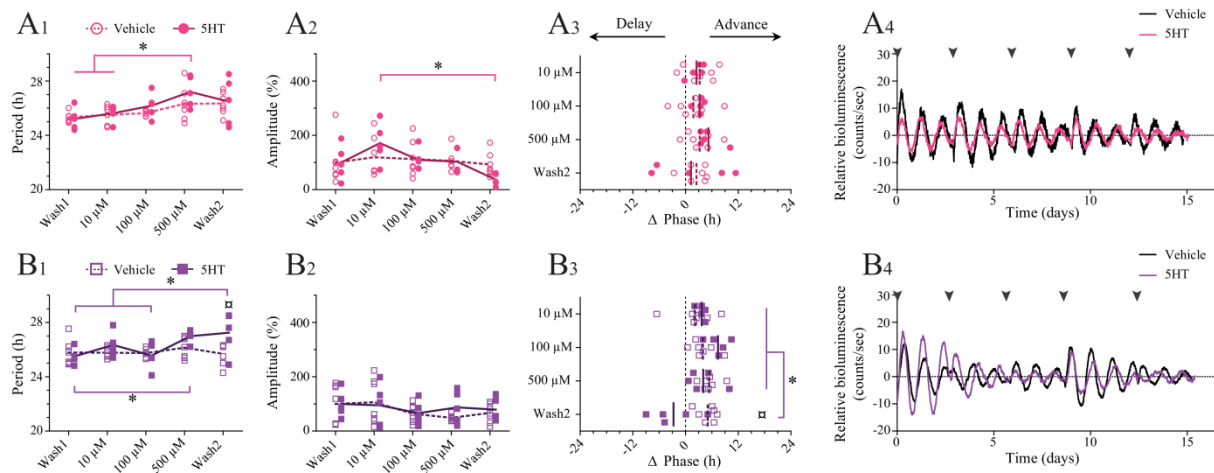


Figure S1 Effect of serotonin on PER2::LUC oscillations in the rostral and caudal part of habenula explants. The period (first column), baseline-corrected amplitude (second column) and Δ phase (third column) of the PER2::LUC oscillations were chosen to describe the Hb clock. Serotonin or vehicle was added into the medium of the rostral (A) and caudal (B) part of the Hb explants. * $p < 0.05$, significant difference inside the drug group; \otimes $p < 0.05$, significant difference vehicle vs. Drug

Discussion

1. Considérations techniques

1|1. Bioluminescence

La bioluminescence tire son potentiel de la luciférase : une enzyme capable de produire de la lumière et qui est présente dans certaines espèces comme la luciole. La luciférase a l'avantage d'être constituée d'une seule protéine (~61kDa ; [Gould & Subramani, 1988](#)). Elle émet moins de bruit de fond que la fluorescence, d'où un ratio signal/bruit plus élevé, ce qui lui confère une meilleure sensibilité ([Badr, 2014](#)). Bien que le modèle transgénique PER2::LUC nous donne un aperçu du fonctionnement de l'horloge, il ne se focalise que sur une seule protéine (PER2) sans aucune information sur les autres acteurs moléculaires de l'horloge.

1|2. Hybridation vs. Culture tissulaire

L'étude des rythmes circadiens requiert de récupérer des données rythmiques d'un organisme entier (comportement) ou d'un tissu (expression génique, protéique) sur 24h. Il est donc nécessaire d'obtenir des échantillons à différents points horaires afin de modéliser leur oscillation. Dans ce travail de thèse, l'hybridation *in situ* a été utilisée afin de marquer les cellules de la LHb exprimant différents gènes horloges (*Clock*, *Per2*, *Cry2*, *Rev-Erba*). Cependant, cette méthode requiert plus d'un échantillon, et donc plus d'un animal, par point horaire pour tester l'hypothèse d'un rythme sur une estimation valable du nombre de cellules exprimant ces gènes *in vivo*.

La culture quant à elle crée un environnement contrôlé dans lequel le tissu ne subit plus l'influence de facteurs externes, du moins que l'on sache. Il est ainsi possible d'étudier les propriétés rythmiques et endogènes d'un tissu, autrement dit sa capacité potentielle à osciller de lui-même sur plusieurs jours dans un contexte particulier. Le fait de recourir à des expériences longitudinales nous permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire à l'analyse des rythmes. Néanmoins, nous ne savons pas ce qu'il en est *in vivo*. Les afférences que reçoit l'habénula sont nombreuses et variées. Lors de sa mise en culture, l'habénula est microdissequée ; tout influx d'information lui est donc supprimé ce qui peut modifier son profil rythmique.

Ce travail mêle culture et bioluminescence. Ainsi il est possible de suivre sur le long terme les tissus *ex vivo* avec une fréquence d'échantillonnage plus élevée (toutes les 15 minutes) sur plusieurs cycles que celle d'expériences *in vivo* requérant un sacrifice toutes les 3 ou 4h pour avoir un cycle de 24h. Bien que le LumiCycle ne permette pas une discrimination entre la MHb et la LHb, il existe un autre appareil (LuminoView) prenant des photos à intervalles réguliers (1h pour l'habénula) d'un seul échantillon permettant d'avoir une résolution spatiale de l'émission de lumière par la luciférase.

La culture pose également le problème du changement de milieu. Au fil du temps, les nutriments et la luciférine décroissent tout comme les oscillations, ce qui nous oblige à renouveler le milieu. Ce renouvellement implique un changement drastique dans la composition du nouveau milieu comparé à l'ancien. Ce choc chimique et thermique a le potentiel de provoquer une éventuelle réinitialisation de l'horloge. Pour parer cette difficulté, un système de perfusion devrait être mis en place afin de

DISCUSSION

renouveler constamment le milieu des échantillons et ainsi éviter de réinitialiser l'horloge à chaque changement de milieu.

1|3. Vibratome

Le vibratome nécessite une longue préparation des échantillons : la pré-découpe du cerveau, son inclusion dans la gélatine afin de le fixer sur le support du vibratome, sa découpe jusqu'à arriver aux tranches sur lesquelles se situe la structure d'intérêt. Contrairement au vibratome, la matrice est une technique de découpe beaucoup plus rapide. Elle ne requiert que de déposer le cerveau dans son moule et de trancher à l'aide d'une lame de rasoir la ou les coupes d'intérêt. Plusieurs échantillons sont ainsi préparés en un minimum de temps pour un même point horaire mais dont l'épaisseur varie aux alentours de 500 μm . L'avantage du vibratome est dans la reproductibilité des épaisseurs (exactement 500 μm) et dans la reproductibilité anatomique pour récupérer les mêmes parties rostrales (Hbr) et caudales (Hbc) de l'habénula. Il fut donc important de s'assurer que le moment du sacrifice de l'animal ou de la mise en culture de l'échantillon n'influence pas la période ou l'amplitude de l'horloge dans l'habénula. Ces deux paramètres restaient identiques quelque soit le moment du jour ou de la nuit.

En 2010, le travail de Guilding montrait des oscillations de l'habénula moins robustes, s'amortissant plus rapidement que les résultats présentés ici (Guilding et al., 2010). En fait les deux études diffèrent par leurs échantillons : ceux de Guilding *et al* sont des échantillons d'épaisseur de 300 μm alors que les nôtres sont des microdissections incluant seulement la MHb et la LHb avec une épaisseur de 500 μm . L'habénula est grandement hétérogène (voir partie 4|2). La présence de certains sous-noyaux clés ou d'une certaine quantité de cellules serait nécessaire pour observer des oscillations plus robustes.

2. Une horloge endogène dans l'habénula

Afin de contrôler les noyaux monoaminergiques, l'habénula décharge de façon tonique sans l'aide de neurotransmission externe (Poller et al., 2011). Bien qu'elle ait les outils nécessaires pour être un pacemaker, il reste à savoir si elle a la capacité d'être une horloge indépendante.

2|1. Aspects moléculaires

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de caractériser quels gènes horloges sont toujours exprimés dans l'habénula lorsque les animaux sont maintenus en DD. Bien que nous n'ayons pas étudié tous les gènes horloges possiblement impliqués, nous savons que *Clock*, *Cry2* et *Rev-Erba* continuent d'être rythmiquement exprimés *in vivo* même en DD, ce qui indique une expression endogène de l'horloge située dans l'habénula. Cependant pour l'expression de *Per2* nous n'avons pas pu mener l'analyse Cosinor au vue de la répartition des données. En effet, le nombre de cellules exprimant *Per2* se restreignait à une étroite fenêtre temporelle à la fin de la phase de repos de l'animal (jour subjectif). Une autre étude a reporté un rythme dans l'expression de *Per2* par PCR¹ quantitative chez des rats maintenus en cycle LD (Zhao et al., 2015b). Les résultats observés dans ce travail peuvent s'expliquer soit par une différence d'analyse (niveau d'ARN messagers vs nombre de cellules marquées), soit par un allongement de la période en DD, ce qui entrainerait un pic tardif situé à la fin de notre cycle. Pour éclaircir la situation, un cycle de 48h serait envisageable.

¹ De l'anglais *polymerase chain reaction*

De plus, les gènes horloges sont nécessaires aux oscillations circadiennes dans la LHb. Une perturbation de l'horloge moléculaire, comme une double mutation¹ des gènes *Per*, altère l'expression des gènes *Clock* et *Rev-Erba* et rend indétectable celle du gène *Cry2*. En effet, une simple mutation¹ du gène *Per2* entraîne une baisse de l'expression des gènes *Cry1*, *Per1* et *Bmal1* dans le SCN, ce qui laisserait penser à une aggravation du phénotype lors d'une double mutation (Bae et al., 2001). De même, la double mutation *Cry1-2* altère l'horloge dans l'habénula (son activité électrique et l'expression *Per1-luciférase* ; Sakhi et al., 2014b).

2|2. Robustesse de l'horloge

L'hybridation *in situ* ne nous a permis d'examiner qu'un seul cycle en DD. Grâce à notre modèle transgénique *Per2^{Luc}*, nous avons pu travailler sur des oscillations *ex vivo* de plusieurs jours afin d'accomplir nos autres objectifs. Ainsi, nous avons pu démontrer que l'activité endogène de PER2::LUC n'est nullement affectée par les différentes conditions auxquelles les souris étaient soumises (LD, DD, LL). De plus, le rythme de l'activité électrique ne diffère pas entre les conditions LD et DD (Sakhi et al., 2014b). Le bulbe olfactif comme l'habénula présente une période et une amplitude qui restent dans le même ordre de grandeur en LD comme en LL, cependant le SCN montre des oscillations plus faibles en LL (nos résultats ; Granados-Fuentes et al., 2004a). Notre modèle animal possède la protéine de fusion PER2::LUC qui nous permet de suivre la production de PER2. Les rats *Per1-luciférase* quant à eux, ont la luciférase sous le contrôle du promoteur de *Per1*, ce qui donne un aperçu de l'activité de BMAL1:CLOCK. Les oscillations de tissus provenant de rats *Per1-luciférase* seraient plus instables et de ce fait, plus facilement altérables à des facteurs externes comme la lumière (Granados-Fuentes et al., 2004a; Jaeger, 2014). La robustesse de l'activité de PER2::LUC pourrait empêcher la détection d'un effet de la lumière sur l'habénula, ce que pourrait en revanche révéler le modèle des rats *Per1-luciférase*.

Le SCN n'est pas nécessaire au maintien des oscillations de l'habénula. L'habénula des animaux dont le SCN a été lésé ne montrait aucune différence par rapport aux animaux contrôles « sham ». Seulement ces résultats ne sont que le fruit d'expériences *ex vivo*. Les mêmes études *in vivo* des oscillations de PER2 en implantant par exemple une fibre optique au niveau de l'habénula chez une souris transgénique *Per2^{Luc}*, pourraient révéler un lien possible entre le SCN et l'habénula qui n'apparaît pas *ex vivo* (Hamada et al., 2016).

2|3. Couplage des deux oscillateurs internes

L'étude de l'horloge présente dans l'habénula nous a conduit à analyser la phase des oscillateurs présents dans l'habénula (Hbr et Hbc). En ce qui concerne la période ou l'amplitude des oscillations, rien ne distingue la Hbr de la Hbc. Toutefois, la phase des oscillations était modifiée en fonction des différentes conditions. Afin d'analyser la synchronisation entre les phases de la Hbr et la Hbc d'un même animal, il semblait plus juste de travailler sur une différence de phase de ses deux noyaux. Il apparaît qu'en cycle LD, la différence est minime sans que les oscillations soient en phase (c'est-à-dire sans que leur acrophase arrivent au même moment) tout comme en LL. Que la LL ne semble pas affecter la rythmicité des oscillations de PER2 peut être surprenant. Néanmoins, il existe des mutants¹ du récepteur VIP ou des gènes *Per2-Cry1* dont la rythmicité de l'activité locomotrice est perdue en DD et restaurée en LL (Abraham et al., 2006; Hughes et al., 2015). C'est en absence de

¹ Mutation entraînant une perte de fonction

DISCUSSION

lumière que la différence de phase a montré une grande disparité qui fut exacerbée en l'absence de lumière et du SCN. Ceci signifie que pour maintenir ses oscillateurs (Hbr et Hbc) synchronisés, l'habénula a principalement besoin de la lumière ; en son absence, le SCN pourrait prendre le relais. Certains horloges (ex. SCN, rétine) possèdent plusieurs oscillateurs qui auraient comme fonction de renforcer leurs oscillations intrinsèques (Jaeger, 2014; Jagota et al., 2000). Il est envisageable que le rôle des oscillateurs de l'habénula puisse également encoder un élément temporel, le SCN possédant également deux oscillateurs pour encoder la photopériode (voir partie 2|2.b ; Honma et al., 2012).

3. Entrées multiples de l'horloge

Plusieurs études se sont intéressées à l'horloge de l'habénula de diverses manières mais peu se sont intéressées aux entrées qui pourraient influencer l'horloge (Zhao & Rusak, 2005; Tavakoli-Nezhad & Schwartz, 2006; Guilding et al., 2010; Wyse & Coogan, 2010; Sakhi et al., 2014a, 2014b; Shuboni et al., 2015; Zhao et al., 2015b). De plus, nous avons regardé les effets de diverses molécules sur la Hbr et la Hbc. Selon les noyaux, différents résultats nous sont apparus ce qui s'expliquent par l'hétérogénéité de l'habénula sur l'axe rostro-caudal (Andres et al., 1999; Zhang et al., 2016, 2018).

3|1. Catécholamines

Un précédent travail de l'équipe a démontré l'impact de la métamphétamine dissoute dans l'eau de boisson sur l'activité locomotrice ainsi que sur les oscillations PER2::LUC de l'habénula (Salaberry et al., 2017). La métamphétamine est une drogue agissant sur le transporteur vésiculaire, ce qui résulte en une augmentation du niveau des monoamines dans la synapse (Wise, 1998). De ce fait, nous nous sommes intéressés aux effets de la dopamine sur l'horloge de l'habénula en sachant le lien étroit entre cette dernière et le système de la récompense (Viswanath et al., 2013; Lecca et al., 2014).

En plus de moduler l'expression de PER2 dans le striatum *via* le récepteur D2 (Hood et al., 2010), la dopamine augmente l'amplitude des oscillations de l'habénula. La noradrénaline qui a la capacité d'activer le récepteur dopaminergique D4 (Root et al., 2015), augmente également l'amplitude des oscillations. Cette augmentation proviendrait d'une hausse de la synthèse de PER2::LUC ou d'une meilleure synchronisation entre les cellules dont l'apogée de la production de PER2::LUC arriverait au même moment, créant une plus grande quantité de photons. Cependant, cet effet n'est ni le résultat de l'activation spécifique du récepteur dopaminergique D2 ou D4. Il pourrait provenir d'une activation multiple des récepteurs dopaminergiques ou d'une activation des récepteurs adrénergiques situés sur la MHb en ce qui concerne l'effet noradrénergique (voir partie 4|2.d|i). En effet, la dopamine induit par les récepteurs de type 2, une cascade de phosphorylation qui aboutira à la phosphorylation de CREB¹ qui modulera les gènes de *Per* et *Clock* (Nikaido et al., 2001; Yujnovsky et al., 2006; Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Quant à la noradrénaline, elle induit l'expression des gènes *Cry2* et *Per1* dans la glande pinéale d'hamsters syriens par l'activation des récepteurs adrénergiques β 1 (Simonneaux & Ribelayga, 2003).

3|2. Neuropeptides

L'habénula n'est pas seulement sensible aux catécholamines, mais aussi à certains neuropeptides comme l'orexine et l'AVP. L'hypothalamus latéral dont la majorité des neurones expriment de l'orexine, est une des afférences majeures de la LHb (Tsujiino & Sakurai, 2013; Zahm & Root, 2017). Il

¹ De l'anglais *C-AMP Response Element-binding protein*

est notamment impliqué dans le sommeil et la prise alimentaire ainsi que son aspect récompensant (Tsujino & Sakurai, 2013). L'orexine A agit sur les oscillations de PER2::LUC en raccourcissant d'au moins 1h la période des échantillons issus de l'habénula dont l'effet est significatif seulement à 100 nM. A la même concentration, les oscillations de PER2::LUC des échantillons issus de l'hippocampe réagissent de la même façon (Ma et al., 2016). De plus, l'orexine A augmente l'amplitude des oscillations de l'habénula. Les phosphatases et kinases activées à la suite de l'activation des récepteurs orexinergiques déphosphorylent ou phosphorylent respectivement certains acides aminés de la protéine PER2 qui jouent sur sa stabilité (voir partie 2|1.c ; Vanselow & Kramer, 2007; Tsujino & Sakurai, 2013; Leonard & Kukkonen, 2014; Davies et al., 2015). Une instabilité de la protéine suggérerait une dégradation plus rapide. Cette hypothèse couplée à celle d'une augmentation de la production de la protéine PER2::LUC amènerait à un raccourcissement de la période avec en même temps une augmentation de l'amplitude. Seulement, bien que l'on détecte des fibres orexinergiques dans l'habénula, les afférences provenant de l'hypothalamus latéral transmettent essentiellement du glutamate et du GABA (Peyron et al., 1998; Poller et al., 2013; Nieh et al., 2016; Stamatakis et al., 2016).

Le SCN transmet ses informations notamment par l'AVP (Jin et al., 1999). Le PVN a également une sortie vasopressinergique, est innervé par le SCN et projette sur la LHb (Kalsbeek et al., 2006; Hernández et al., 2015). De ce fait, nous avons testé l'effet de l'AVP sur les oscillations de l'habénula. Contrairement aux autres molécules, l'AVP baisse l'amplitude de l'activité PER2::LUC à la plus forte concentration (300 nM), signifiant une désynchronisation des cellules entre elles ou une baisse de la synthèse de PER2 au sein de l'habénula. Une double mutation (perte de fonction) des récepteurs vasopressinergiques V1a et V1b ou un blocage pharmacologique de ces récepteurs entraîne une resynchronisation plus rapide de l'horloge moléculaire dans le SCN ou du comportement locomoteur aux variations de l'environnement externe comme le décalage horaire (Yamaguchi et al., 2013b). Ainsi, l'AVP pourrait bien freiner la synchronisation des oscillations des cellules du SCN ou de l'habénula.

4. Intérêt d'une horloge dans l'habénula

La LHb contrôle les noyaux monoaminergiques tandis que ces derniers influencent l'activité de l'habénula et/ou de son horloge. Mais quel serait l'intérêt d'avoir une horloge dans l'habénula ? Quel rôle pourrait-elle avoir sur les noyaux monoaminergiques ?

La VTA a une activité rythmique dans sa décharge de potentiels d'action et dans sa libération de dopamine (Schade et al., 1995; Shieh et al., 1997; Luo et al., 2008; Hood et al., 2010). Cependant, lorsque l'on isole la VTA issue d'un rat transgénique *Per1-luciférase*, aucune oscillation n'est détectée (Abe et al., 2002). Donc une autre horloge entrerait en jeu qui ne serait pas le SCN. En effet, une différence journalière dans l'expression de la tyrosine hydroxylase et du transporteur dopaminergique subsiste chez des rats dont le SCN a été lésés (Sleipness et al., 2007). La LHb exerce toniquement un contrôle sur la VTA qui pourrait être modulé tout au long de la journée. En effet, chez les rats, le pic d'activité de la LHb durant le jour correspond au niveau le plus bas de dopamine libérée dans le striatum (Zhao & Rusak, 2005; Hood et al., 2010). Cependant, chez la souris, le pic d'activité de la LHb se présente durant le jour qui peut être corrélé à une plus faible activité électrique de la VTA (Guilding et al., 2010; Stowie et al., 2015b). Une activation ou une lésion de la

DISCUSSION

LHb chez le rat et la souris semble nécessaire pour déterminer si son activité circadienne influence celle de la VTA avec une possible différence entre espèces.

La LHb exerce aussi un contrôle sur les noyaux du Raphé dans lesquels a lieu la synthèse de sérotonine. En effet, la stimulation électrique ou pharmacologique de la LHb contribue à une diminution de la libération de sérotonine dans le cerveau alors qu'une lésion de la LHb l'augmente (Kalén et al., 1989; Yang et al., 2008; Han et al., 2016). Cette libération est en plus rythmique dans le SCN (Semba et al., 1984; Dudley et al., 1998). Il serait envisageable que l'horloge située dans l'habénula puisse aussi jouer un rôle dans cette activité rythmique des noyaux du Raphé.

4|1. Dysfonctionnement de l'horloge

L'habénula est impliquée dans des maladies psychiatriques qui souvent résultent ou entraînent un dysfonctionnement monoaminergique comme l'addiction ou la dépression (Lecourtier & Kelly, 2007; Salaberry & Mendoza, 2015; Zhao et al., 2015a). De plus, le système circadien est également impliqué dans ces maladies psychiatriques.

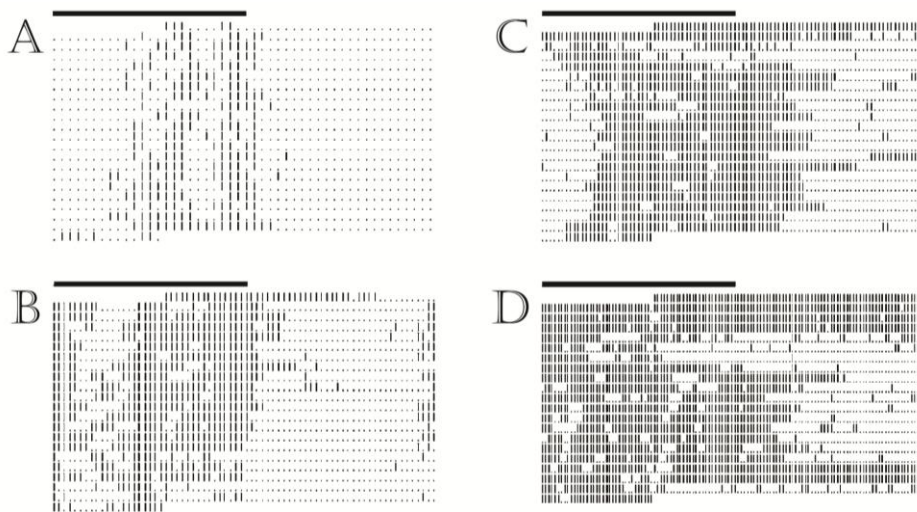


FIGURE 20 : AUTO-ADMINISTRATION DE COCAÏNE SUR UNE PERIODE DE 21 JOURS. Les rats ont suivi un protocole restreint d'auto-administration de cocaïne (1.5 mg/kg/inf). Chaque figure correspond à un individu typique de son protocole. Les rats avaient accès à la drogue 2, 3, 4 ou 5 fois par heure (respectivement A, B, C ou D). Chaque ligne représente une période de 24h, dont la phase obscure est signalée par une barre horizontale noire. Chaque petite marque verticale indique une infusion de cocaïne tandis que les points signalent une omission. Repris de Morgan & Roberts, 2004.

Une perturbation du système circadien comme le travail décalé, le décalage horaire à répétition ou des mutations dans les gènes horloges entraîne une plus grande probabilité de consommer des psychostimulants (Honma & Honma, 2009; Kirkpatrick et al., 2009; Doyle et al., 2015; Stowie et al., 2015a). Ainsi des travailleurs de nuit prendront plus facilement de la métamphétamine afin de rester éveillé et de réussir leur tâche plutôt qu'à des fins récréatives, la métamphétamine agissant dans cette expérience comme un synchronisateur (Kosobud et al., 2007; Kirkpatrick et al., 2009). Chez les animaux modèles, on retrouve également l'influence du système circadien sur la prise de drogue. En effet, les mutations¹ des gènes *Clock* et *Per2* suscitent une plus grande consommation d'alcool. De

¹ Mutation entraînant une perte de fonction

plus, une plus grande sensibilité à la cocaïne est développée avec une préférence augmentée pour celle-ci et une réponse plus grande de l'activité locomotrice après son injection (Abarca et al., 2002; Perreau-Lenz et al., 2009; Ozburn et al., 2012, 2013). A *contrario*, les animaux exprimant des protéines PER1 et NPAS2¹ dysfonctionnelles consomment de la cocaïne en moindre quantité et y sont moins sensible (Reick et al., 2001; Abarca et al., 2002; Ozburn et al., 2015).

La consommation de drogue influence également le système circadien. L'auto-administration de cocaïne ou d'alcool chez les rongeurs montre un rythme circadien avec une consommation plus forte durant la phase active de l'animal (Morgan & Roberts, 2004; Rosenwasser et al., 2005; Bass et al., 2010; Perreau-Lenz et al., 2012). De plus, ce rythme n'est gardé que si l'auto-administration de la cocaïne est restreinte à deux ou trois prises par heures (voir FIGURE 20). Au-delà, l'animal commence à réduire son temps de sommeil pour continuer à appuyer sur le levier, jusqu'à perdre totalement son cycle veille/sommeil (Morgan & Roberts, 2004). L'horloge de l'habenula pourrait être la clé entre le système circadien et celui monoaminergique. Il est possible que cette perte de contrôle soit due à la neurodégénérescence du fasciculus retroflexus qui permettait de contrôler temporellement les noyaux monoaminergiques. Ainsi, sans la Lhb pour inhiber la VTA au bon moment et rétablir son activité rythmique, le système commence à être dérégulé, prenant une dimension pathologique (voir FIGURE 21).

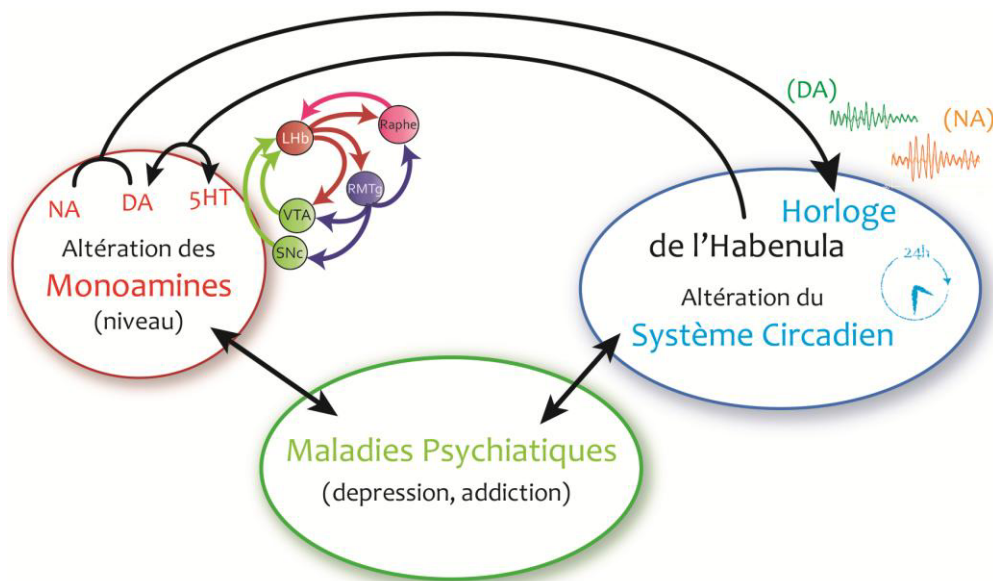


FIGURE 21 : INTRICATION DU SYSTEME CIRCADIEN ET MONOAMINERGIQUE AVEC L'HABENULA. L'horloge de l'habenula est altérée en présence de dopamine (DA) ou de noradrénaline (NA). Les noyaux monoaminergiques (VTA, SNc, Raphé) sont contrôlés par l'habenula directement ou indirectement (RMTg). Celle-ci fait le lien entre les systèmes circadiens et monoaminergiques. Cependant, si l'équilibre entre les systèmes est brisé, cela peut mener à des troubles psychiatriques comme l'addiction ou la dépression. SNc : substance noire *pars compacta* ; RMTg : noyau rostromédian du tegmentum ; VTA : aire tegmentale ventrale

5. Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse a permis de caractériser de façon moléculaire et pharmacologique l'horloge située dans l'habenula. Premièrement, la Lhb possède une machinerie moléculaire qui est altérée comme

¹ De l'anglais *neuronal PAS domain protein 2*, un homologue de la protéine CLOCK

DISCUSSION

on pourrait s'y attendre lorsqu'une mutation touche une des boucles moléculaires. De plus, l'habénula est une horloge indépendante du SCN pour maintenir ses oscillations *ex vivo*. Cependant, pour garder ses oscillateurs synchrones, elle a besoin de recevoir des informations provenant de *zeitgeber* comme la lumière. Enfin, les catécholamines, l'orexine A et l'AVP ont été identifiés comme possible entrées de l'horloge puisque ces molécules peuvent jouer sur sa période ou sur son amplitude.

Mais quelle est la sortie de cette horloge présente dans l'habénula ? Bien que nous ayons des hypothèses sur son éventuel rôle, il n'y a pas encore de preuves pour les démontrer. Ainsi pour répondre à cette nouvelle question, la prochaine étape sera d'inactiver l'horloge de l'habénula par des virus. Le vecteur viral contiendrait le gène de la cre-recombinase, une enzyme capable d'enlever un morceau d'ADN située entre deux sites LoxP. L'injection d'un virus adéno-associé exprimant la cre recombinase dans l'habénula d'une souris transgénique exprimant le gène *Bmal1* dont le 4^e exon est flanqué de sites LoxP engendrerait un KO de *Bmal1* spécifique dans l'habénula (Izumo et al., 2014). L'homologue de BMAL1 (BMAL2) étant trop faiblement exprimé pour compenser la perte de fonction (Shi et al., 2010), nous devrions obtenir un KO de l'horloge moléculaire. Dans un premier temps, l'impact de ce KO sur l'activité locomotrice et la prise alimentaire des animaux, deux sorties comportementales rythmiques, serait examiné afin de déterminer son effet en condition normale. Dans un deuxième temps, il serait possible d'étudier les effets immédiats et à plus long terme de cette altération circadienne sur la prise de drogue. Ce KO de l'horloge de l'habénula pourrait engendrer une modification de la préférence voire de la consommation de drogue comme la métamphétamine ou l'alcool. Ensuite, effectuer une microdialyse sur 24h au niveau du striatum ventral, avant et après la présentation de la drogue, nous renseignerait sur l'impact de ce KO sur la libération dopaminergique de la VTA. Cela permettrait d'élucider le rôle de l'horloge de l'habénula sur l'activité rythmique de la VTA. Enfin, il a déjà été démontré une hyperactivité de l'habénula lorsque les animaux sont exposés à des drogues (cocaïne, alcool ; Kowski et al., 2009; Maroteaux & Mameli, 2012; Meye et al., 2015; Neumann et al., 2015; Fu et al., 2017). Il serait donc intéressant d'évaluer l'activité électrique de l'habénula par des enregistrements électrophysiologiques lorsque l'horloge est altérée et si elle est modulée en fonction du moment de la journée.

L'habénula est une structure clé impliquée dans le système monoaminergique, le système de la récompense et le système circadien. Leurs dysfonctionnements occasionnent notamment des maladies psychiatriques comme la dépression ou l'addiction. Mieux comprendre le fonctionnement de l'horloge dans l'habénula constitue un enjeu important dans la compréhension de son intrication dans ces différents systèmes et des pathologies qui peuvent y être associées.

Annexe

En annexe a été ajouté, le protocole de bioluminescence que nous avons publié chez bio-protocole. Il recense les produits, les outils et les solutions que l'on a utilisé lors de la microdissection des échantillons. Ici, la technique utilisant la matrice est détaillée et non pas le vibratome que j'ai utilisé pour ces travaux de thèse.

Brain Tissue Culture of *Per2::Luciferase* Transgenic Mice for *ex vivo* Bioluminescence

Nora L. Salaberry* and Jorge Mendoza

Institute of Cellular and Integrative Neurosciences (CNRS UPR-3212), Strasbourg, France

*For correspondence: salaberry@inci-cnrs.unistra.fr

Abstract

In circadian research, it is essential to be able to track a biological rhythm for several days with the minimum perturbation for the organisms or tissues. The use of transgenic mice lines, in which the luciferase reporter is coupled to a molecular clock protein (here PERIOD2), gives us the opportunity to follow the circadian activity in different tissues or even single clock cells for days without manipulation. This method creates sections using a mouse brain matrix, which allows us to obtain several brain samples quickly at a single time point.

Keywords: Bioluminescence, *Per2::Luciferase*, Brain, Mouse matrix, Tissue culture, Rhythm, Circadian

Background

Circadian rhythms are behavioral or molecular changes that follow roughly 24 h-cycles and are sustained without any external cue. In mammals, locomotor activity, body temperature and hormone release are examples of circadian rhythms which are under the control of the suprachiasmatic nucleus (SCN) clock located in the hypothalamus. The ability of the SCN cells to keep an endogenous rhythm is due to a molecular machinery composed by the positive and negative loops of the expression of clock genes: firstly, CLOCK and BMAL1 proteins heterodimerize to activate the transcription of different genes through E-box sites on the promoter which is on genes like *period* (*Per1-3*) and *cryptochrome* (*Cry1-2*; Takahashi *et al.*, 2008). Then, the proteins of PERIOD and CRYPTOCHROME heterodimerize and enter back to the nucleus to prevent BMAL1 binding to the E-Box. Hence, PERIOD and CRYPTOCHROME inhibit their own transcription (Takahashi *et al.*, 2008). A second loop is made by retinoid-related orphan receptors (ROR) and Rev-Erb: the ROR proteins activate *Bmal1* gene while REV-ERB proteins inhibit it *via* ROR-response element in the *Bmal1* promoter. All this mechanism oscillates within a 24h-period (Takahashi *et al.*, 2008).

In circadian research, it is important to follow rhythmic activity in the whole organism or tissues around the 24 h. For that, it is necessary to get tissues or samples at different time points to model the oscillations of gene, protein expression or hormonal release. However, these methods require more than one animal per time point, and therefore it requires a lot of animals to get a complete and significant circadian oscillation.

In 2000, Yamazaki *et al.*, created a transgenic rat line to solve this problem. They inserted a vector containing the luciferase gene from the firefly under the control of *Per1* promoter. Since the 80's, the luciferase has been used as ATP, gene or protein reporter. This 61-kDa enzyme has the particularity to release photon by oxidation of its substrate and in the presence of ATP, Mg²⁺ and oxygen (Gould and Subramani, 1988). The beetle luciferase has the advantage to be a single protein with no post-

translational modification; its catalytic area is ready-to-use after its translation and minimal auto-fluorescence throughout recording ([Bioluminescent Reporters](#)).

Although *Per1-luciferase* rat is an advance in circadian field, it does not allow us to follow the endogenous clock gene expression, but rather the endogenous activity of the heterodimer CLOCK-BMAL1. In 2004, Takahashi lab created the transgenic mouse line in which the open reading frame (ORF) of the luciferase is fused to the end of the *Per2* gene (Yoo *et al.*, 2004). All cells expressing the PER2 protein are also able to produce yellow-green light (~560 nm) in the absence of external light source if they have access to the luciferin: the consumable substrate. The bioluminescence produced by these cells permits to follow the circadian clock activity of the same individual for several days, and even weeks.

The principal aim of this technique is to dissect the brain region of interest of several animals at a single time point. For that, we used a mouse brain matrix that requires less tissue preparation and slices faster than a vibratome. However, the disadvantage of this technique is the loss of thickness precision (~500 µm). The vibratome cuts thinner and more precise tissue slices, but all the related procedure requires time. The advantage of the use of the matrix is to have few steps to work rapidly on the area of interest.

Materials and Reagents

1. Gloves
2. Carbon steel scalpel N°24 (Swann-Morton, catalog number: [0211](#))
3. Double edge stainless steel razor blade (Electron Microscopy Sciences, catalog number: [72000](#))
4. Nunc™ cell culture/Petri dishes (35 mm, Thermo Fisher Scientific, catalog number: [150318](#))
5. 10 ml syringe (Terumo Medical, catalog number: [SS-10ES](#))
6. Corning® vacuum filter system 500 ml, sterile, pore size: 0.22 µm (Corning, catalog number: [431097](#))
7. Sterile sampling pot: aseptic 40 ml polypropylene straight container with screw cap (Dominique DUTSCHER, Corning GOSELIN™, catalog number: [688252](#))
8. Falcon Corning® 15ml PP Centrifuge Tubes (Corning, catalog number: [430791](#))
9. Falcon Corning® 50ml PP Centrifuge Tubes (Corning, catalog number: [430829](#))
10. Fisherbrand™ SureOne™ 0.1-10 µl aerosol barrier pipette tips (Thermo Fisher Scientific, catalog number: [11903466](#))
11. Fisherbrand™ SureOne™ 20-200 µl aerosol barrier pipette tips (Thermo Fisher Scientific, catalog number: [11963466](#))
12. Fisherbrand™ SureOne™ 100-1000 µl aerosol barrier pipette tips (Thermo Fisher Scientific, catalog number: [11973466](#))
13. Costar® 5 ml Stripette® serological pipets, sterile (Corning, catalog number: [4487](#))
14. Costar® 10 ml Stripette® serological pipets, sterile (Corning, catalog number: [4488](#))
15. Costar® 25 ml Stripette® serological pipets, sterile (Corning, catalog number: [4489](#))
16. Axygen® 0.2ml Thin Wall PCR Tubes with Flat Cap (Corning, catalog number: [PCR-02-C](#))

17. Axygen® 0.6ml Maxy Clear Snaplock Microcentrifuge Tube (Corning, catalog number: [MCT-060-C](#))
18. Millicell® cell culture insert (Merck, catalog number: [PICMORG50](#))
19. *Per2::Luciferase* homozygote knock-in (KI) *Mus musculus* (*Per2^{tm1Jt}*)
Note: Mice were initially from Jackson Laboratories. Generally, we used young-adult (2-6 months old) mice, males as well as females, from our own breeding colony (Chronobiotron platform, UMS-3415 in Strasbourg). Aside from specific protocols, mice were housed in groups of 3 or 4 individuals with food and water available ad libitum in light-proof ventilated rooms, under 12h white light and 12h dim red light (<5 lux at cage level) cycle (LD12:12; lights on at 7:00 A.M.).
20. Antibiotic (penicillin-streptomycin 10,000 U/ml; 10,000 mg/ml, Sigma-Aldrich, catalog number: [P4333](#)) stored at -20 °C
21. B27 (Thermo Fisher Scientific, Gibco™, catalog number: [17504044](#)) stored at -20 °C
22. Hank's balanced salt solution with red phenol (HBSS; 10x, Sigma-Aldrich, catalog number: [H1641](#)) stored at room temperature
23. HEPES (Sigma-Aldrich, catalog number: [H0887](#)) stored at 4 °C
24. Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich, catalog number: [S8761](#)) stored at 4 °C
25. Bactericide/fungicide: ANIOSYME DD1 (Laboratoires ANIOS, Lille-Hellemmes, France)
26. Commercial chlorine in tablets to make 10x bleach
27. Dulbecco's modified Eagle's medium 10x (DMEM) with low glucose without red phenol (Sigma-Aldrich, catalog number: [D2902](#)) stored at 4 °C
28. D (+)Glucose (Sigma-Aldrich, catalog number: [G7021](#)), stored at room temperature
29. Beetle luciferin (Promega, catalog number: [E1602](#)), stored at -80 °C
30. High vacuum grease (Dow Corning®, Wiesbaden, Germany), stored at room temperature
31. MilliQ Water
32. EtOH 70%
33. 0.1 M luciferin (see Recipes), stored at -20 °C
34. HBSS 1x (see Recipes), stored at 4 °C
35. DMEM 1x (see Recipes), stored at 4 °C
36. Cleaning solution for tools (see Recipes)

Equipment

Note: All items without reference can be ordered from any qualified company.

1. Stainless steel mouse brain matrix (Adult Mouse Brain Slicer Matrix, Zivic Instruments, catalog number: [BSMAS005-1](#))

Note: Other brain matrixes (for hamsters or rats) exist.

2. Stainless steel tweezers, fine tips, straight

*Note: To have a better sight of the dissection tools, see **Figure1**.*

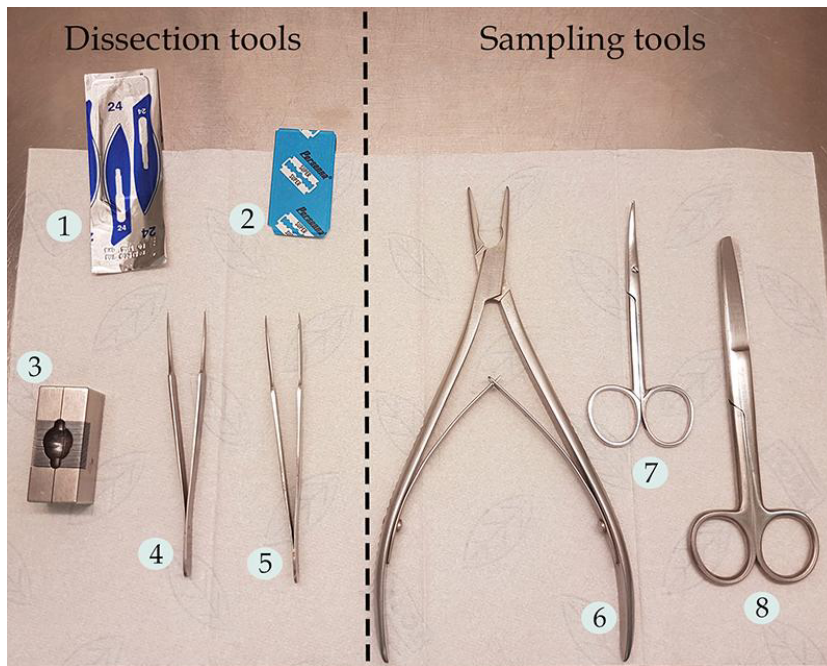


Figure 22. Surgery instruments used during the protocol. 1) Carbon steel scalpel N°24. 2) Double edge stainless steel razor blade. 3) Stainless steel mouse brain matrix. 4-5) Stainless steel tweezers, fine tips, straight. 6) Friedman bone rongeur. 7) Curved Scissors, fine tips. 8) Stainless steel operating scissors, straight.

3. Stainless steel operating scissors, straight
4. Curved Scissors, fine tips
5. Friedman bone rongeur
6. Vacuum pump (KNF, catalog number: [N86KN.18](#))
7. Red light lamp (around 620-650 nm)
8. Fiber optic light source (SCHOTT, catalog number: [KL 1500LCD](#))
9. Stereo Microscope (Nikon, catalog number: 536087)
10. Sterilized BRAND® Petri dish, glass, size 100 mm x 15 mm (BRAND, catalog number: [455742](#))
11. 1 L sterilized bottle
12. 500 ml sterilized bottle
13. 100 ml sterilized measuring cylinder
14. 1 L sterilized measuring cylinder
15. 1 L sterilized beaker
16. Magnet
17. Magnetic plate (size: big enough for 1 L beaker; strength: enough to dissolve powder into a liquid)
18. P10 pipetman® classic (Gilson, catalog number: [F144802](#))
19. P20 pipetman® classic (Gilson, catalog number: [F123600](#))
20. P200 pipetman® classic (Gilson, catalog number: [F123601](#))

21. P1000 pipetman[®] classic (Gilson, catalog number: [F123602](#))
22. Pipetboy acu 2 (INTEGRA Biosciences, catalog number: [155019](#))
23. Milli-Q[®] water system
24. Ice maker
25. Fridge (4°C)
26. Fume hood (horizontal flow)
27. Fume hood (vertical flow)
28. Autoclave
29. Photo-counting apparatus as LumiCycle 32 (Actimetrics, Wilmette, IL, USA) inside 36.5°C incubator
30. 37°C incubator

Note: Petri dishes will be sealed. We do not need 5% CO₂; an incubator that keeps only medium or dishes at 37 °C is enough.

Software

1. LumiCycle Analysis for data extraction
2. Table software like Microsoft Office Excel for data extraction
3. SigmaPlot for statistics
4. GraphPad for graphs

Procedure

Before the experiment

1. Prepare antibiotic and B27 aliquots, and keep them at -20°C ~~Erreur ! Pas de séquence spécifiée.~~. Prepare 1 mM of luciferin (see Recipes).

Note: The aliquots should avoid repeat freeze/thaw cycles, optimally less than 5 times.

2. Classify your animals according to their genotype to select homozygote knock-in (KI) mice for the transgene Per2::Luc; keep in mind that the heterogeneous KI/+ should have the half of the signal due to the presence of only one allele.

Note: Probes that we used for PCR genotyping are the same as that described in Yoo et al., (2004).

3. Prepare HBSS 1x and DMEM 1x under a clean fume hood (see Recipes).

Note: Fresh HBSS 1x and DMEM 1x can be prepared on the day of experiment, but HBSS has to be cold enough.

On the day of the experiment

1. Preparation

- a. Prepare the DMEM medium ready-to-use by adding B27, antibiotics and luciferin (see Recipes).

Note: It is not necessary to filter the medium again.

- b. Prepare sampling pot, for each animal, filled with HBSS 1x enough for the brain to bathe (around 10ml).
- c. Prepare culture dishes as many as samples. Number them on the cover side. Put 1 ml of ready-to-use DMEM in each and cover the top with vacuum grease. The grease avoids the medium to evaporate at 37°C: the samples will not dry and the apparatus will stay dry. Put the cover gently on its Petri dish and keep them at 37°C in the incubator.

Notes:

- i. Avoid red/pink ink. To open the LumiCycle and put the samples inside, it must be done under red light.
- ii. To easily cover the top, first fill a 10 ml syringe with the grease (see [Video 1](#)).



Video 1. Petri dish sealing. This video shows how we use a syringe to seal Petri dishes cleanly.

- d. Clean the fume hood (horizontal flow) and all the equipment inside (stereomicroscope, lamp) with 70% EtOH. Clean the brain matrix and all the forceps with 70% EtOH and let them dry under the clean fume hood. Cover the brain matrix with aluminum paper and keep it at 4°C at least 1h before to cool it down.

Note: It is also possible to put the matrix in the freezer to cool it faster but do not let it inside too much time. If the matrix is too cold, the brain will stick on it. If it happens, put some drops of HBSS medium on the brain and the matrix to take off the slices.

2. Sampling

- a. Kill the mouse by cervical dislocation.
- b. Then, obtain the brain quickly and keep it in HBSS 1x on ice/or in the fridge until dissection.
- c. To avoid degradation of the tissue (if all the procedure reaches more than ~1h), we recommend starting with the sacrifice of one or two animals at once.

Notes:

- i. *This sacrifice method is performed in accordance with the rules of the French National Law and the European Committee Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE).*
- ii. *We do not use sedation. You can use other method of sacrifice that allows you to obtain quickly the brain.*
- iii. *If you need more than one sample, be careful at what time you are sampling. It is important to sampling at the same moment, or to check if sampling at different moment of the day is not affecting your data.*
- iv. *We generally spent less than 1 min per animal to extract the brain after its death.*

3. Dissection

- a. Put the brain inside the matrix and slice it in a single act with the razor blade (around 500 μm of thickness). To place the brain upside down could be a solution to find anatomical landmarks as the optic chiasma, and find the location of the slice containing the area of interest with the help of a brain atlas (see **Figure 2**). It is also possible to section the whole brain (see [Video 2](#)) and, afterward select the slice where your structure of interest is.

Note: We generally spent less than 2 min to slice the whole brain.

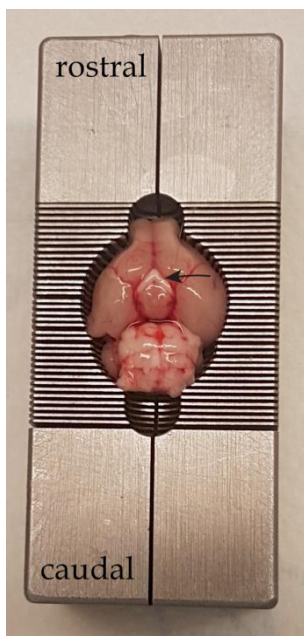


Figure 23. Upside down mouse brain in the matrix. The optic chiasma pointed with the arrow can be used as an anatomical landmark.



Video 2. Brain slicing with the mouse matrix

- b. Microdissection is done under the stereomicroscope in cold HBSS, in the glass and sterilized Petri dish. Try to minimize the sample to fit in 1 mm²: in this way, tissue will have access to all the nutrients needed easily, and avoid necrosis.

Notes:

- i. *It is also possible to use plastic culture dish, but after one or two microdissections, the scalpel leaves marks on it while it does not on glass. Also, glass Petri dish can be used again after sterilization.*
 - ii. *We usually use forceps to maintain the sample and scalpel to cut a square containing the structure of interest. However, it is important to microdissect only the area of interest if adjacent areas also oscillate. For example, the SCN fits in a square without any problem, while another brain structure of our interest, the habenula, needs to have all the other tissues around it removed.*
 - iii. *We generally spent between 3-5 min to microdissect according to the difficulty of the area of interest. If you have many brains, one person can slice the brain with the matrix while the second one is microdissecting to accelerate the experiment.*
- c. Pick up the culture dish inside the incubator corresponding to the sample and put the cell culture insert (Millicell[®]) on the medium. It should not have any bubbles under it. If this is the case, take it out and put it back. Place your sample on the top of it with your forceps or by recovering your sample with your 1,000 µl pipette. Remove the remained HBSS1x on the top of the culture insert (see [Video 3](#)).



Video 3. Sample dropping on the Millicell[®] culture insert

- d. Return the sample into the incubator until you collect all of them.

Note: We generally spent less than 5 min to place the sample on the insert and to return the petri dish inside the incubator.

4. LumiCycle

- a. At the end, put your samples in a photon-counting luminometer as the LumiCycle. You will need to be in dim red light and in low intensity to avoid the light (mostly green-yellow light) altering sensitive photomultipliers inside. The LumiCycle 32, as its name says, allows you to have 32 samples inside. You can turn on them at once or at several times.
- b. We usually record our sample 3 times in one hour by setting 112 sec of recording per sample.
- c. After 7 days, you will need to change your medium if you want to keep the sample on recording.

Note: It depends on your sample (the size, its consumption of luciferin...) and your experiment schedule. You need to check your sample oscillations and change them when they are low.

5. Cleaning

- a. To make sure that no bacteria or fungi will grow in medium used for dissection or culture, we add 10x bleach into it until the liquid becomes clear before throwing away.
- b. Place all the forceps used and the brain matrix in the cleaning solution for 20 min minimum. They need to be fully dipped or at least the part that was in contact with the tissues. Wash the equipment under tap water and dry them. Be careful; the solution is toxic; therefore, do not discard it in the sink.

Note: We usually let the tools in the cleaning solution overnight. Avoid bleach as it will harm your equipment.

- c. Clean the fume hood (horizontal flow) and all the equipment inside (stereo microscope, lamp) with 70% EtOH.

Data analysis

1. LumiCycle Analysis

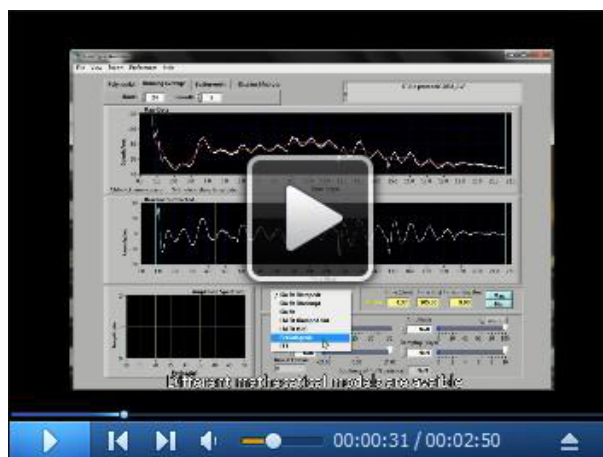
Note: You will be able to copy the recording file(s) at every moment of the experiment even if the LumiCycle is still recording.

We use the LumiCycle analysis which fits a mathematical model for the extraction of the oscillation characteristics (period, amplitude, acrophase). You can calculate manually, but the software is quite accurate with less effort.

First, we subtract the baseline of our oscillations with 24h-running average. In the end, we obtain a sinusoid curve which oscillates around the 0 of the y-axis which can be associated to different mathematical models. The smoothing of the data helps for a best fitting between the experimental and theoretical oscillations.

Then, we use the 'LM fit (dampened)' model which fits best to our oscillation. It takes the dampening into account and gives us a proper fit (goodness), meaning that 100% is a perfect fitting of your model on your data (LumiCycle software, Actimetrics). From the mathematical model, the software calculates the period and the first peak amplitude (by selecting the relative T_0) of the selected time window of the oscillation. Unlike the 'LM fit', periodogram model calculates the mean of the period and amplitude of the oscillation along time. We also measure the acrophase, the time when the peak occurs, with the help of the yellow slider which gives us the time at its position. Refer to [Video 4](#) for the detailed procedures.

Note: We usually skip the first hours of recording due to the huge peak of bioluminescence at the beginning (artifact). We recommend doing this analysis on at least 3-days oscillations.



Video4. Data analysis step by step with the LumiCycle Analysis software. This video shows how to use the data file given by the LumiCycle, how to analyse the data with the software tools and how to extract the data on Excel software to have a look into the oscillation.

Then, we export oscillation data (raw or baseline subtracted) as .csv file which can be opened by a table software. This allows us to recreate the oscillation using the graph software desired (see **Figure 3**).

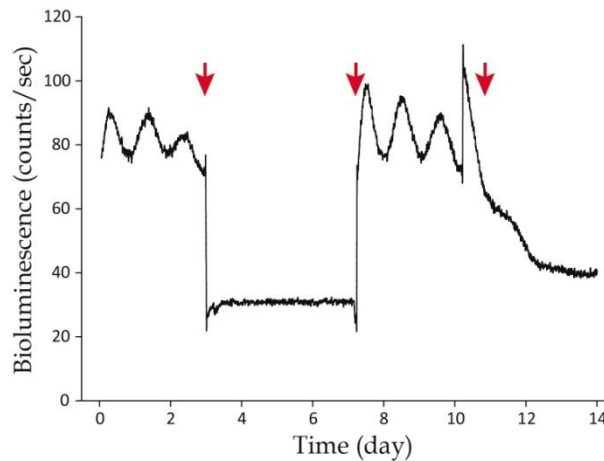


Figure 24. Example of an oscillation of habenula sample from a *Per2::Luciferase* transgenic mouse. After 3 days (first arrow), the sample was removed from the LumiCycle for another experiment and it was put back with a new and fresh culture medium (second arrow). The last arrow indicates that the sample is dying after the last medium change (around 10.5 days).

2. Exclusion

The ‘LM fit (dampened)’ model offers a proper fit (goodness). A threshold should be defined by the user under which the oscillation is considered to be arrhythmic. However, the sample cannot be excluded.

When no rhythm is observed and the data is like flat, there are two possibilities: cells are desynchronized (at the tissue level, the rhythm disappears) or the sample is dead. When a sample is dead, the data values of bioluminescence have to be in the range of the noise of the apparatus. The noise can be obtained by putting just the medium without any sample in the LumiCycle for each photomultiplier.

Note: We usually placed the threshold at 70% for habenula samples. You need to verify each time how your data fits the model.

Notes

Troubleshooting steps

Problems	Causes	Solution
Flat recording	dry sample	Put more grease on the cover of the petri dish
	contamination	Redo fresh DMEM 1x ready-to-use. Intensive deep cleaning of the fume hood(s), or even of the entire culture room should be considered.
	dead sample	Sample again
	arrhythmic sample	- Try thicker samples. Perhaps more cells are required to record a proper oscillation. - Try to microdissect only your area of interest. Perhaps other structures near of it oscillate in an anti-phase manner. - You sample is too heterogeneous. Try to divide it. You can also change the medium or add 10 μ M of forskolin which both act as synchronizator.
Data extraction: the data does not separate automatically in column	your software writes decimal separator with comma instead of point	Change the configuration of your computer.

Recipes

1. 0.1 M luciferin

Note: In this protocol, we used 0.1 mM luciferin. Too high concentration is toxic. Other protocols can be used for different concentrations of luciferin but they should not exceed 1mM. Be aware that different concentrations of luciferin will lead to different results. For detailed information, refer to Feeney et al. (2016).

- a. Add 1.57 ml of MilliQ water directly in the luciferin jar (50 mg).
- b. Prepare aliquots of it and store them at -20°C in light proof container.

2. HBSS 1x (for 1L)

- a. Add all the component in a sterilized beaker under a clean fume hood (use sterilized materials/equipment only):
100 ml of HBSS 10x

- 4.7 ml of sodium bicarbonate
 - 10 ml of HEPES
 - 10 ml of antibiotics
 - Complete with sterile MilliQ water
 - b. Keep it cold in 1L sterilized bottle in the fridge. You can use it up to 4-5 months if it is still clear/clean
3. DMEM 1x (for 1L)
- a. Add all the components in a sterilized beaker under a clean fume hood (use sterilized materials/equipment only):
 - 10 g of DMEM 10x (all the powder of the jar)
 - 4.7 ml of sodium bicarbonate
 - 10 ml of HEPES
 - 1.5 ml of antibiotics
 - 3.5 g of D (+) glucose
 - 500 ml of sterile MilliQ water
 - b. Homogenize until the powder is fully dissolved by using a clean magnet and complete it with sterile MilliQ water
 - c. Filtrate (0.22 μ m, sterile) and store it in at least 2 sterilized 500ml bottles. We use them up in 4 months since the bottle is opened if the medium remains clear/clean; 2 bottles will be available for 8 months
 - d. On the experiment day, for each sample, prepare 1 ml of DMEM 1x and add 20 μ l of B27, 1 μ l of antibiotics and 1 μ l of luciferin (stock solution 0.1 M) just before use. Keep it at 37°C in a light proof place
- Note: We usually prepare 1 ml extra. For 7 samples, prepare 8 ml in a Falcon tube.*
4. Cleaning solution
- 25 ml of ANIOSYME DD1 in 5 L of tap water

Acknowledgments

The authors have no conflict of interest to declare. Funding sources of the present study were provided by the Agence National de la Recherche (ANR-14-CE13-0002-01 ADDiCLOCK JCJC to JM and NLS Ph.D. fellow) and the Centre National de la Recherche Scientifique (JM).

The authors thank Mr. Guillaume Vanotti for his help with the video production, Dr. Nadia Mazzaro and Mr. Maxime Sartori for their comments and suggestions and Mr. Hikmet Undemir for the proofreading.

This protocol was adapted from the procedures published in Yoo *et al.* (2004) and Yamazaki and Takahashi (2005).

References

1. [Bioluminescent Reporters](#). Promega. (Accessed January 9, 2018)
2. Feeney, K. A., Putker, M., Brancaccio, M. and O'Neill, J. S. (2016). [In-depth characterization of firefly luciferase as a reporter of circadian gene expression in mammalian cells](#). *J Biol Rhythms* 31(6): 540-550.
3. Gould, S. J., and Subramani, S. (1988). [Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology](#). *Anal Biochem* 175: 5-13.
4. Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H. and McDearmon, E. L. (2008). [The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease](#). *Nat Rev Genet* 9(10): 764-775.
5. Yamazaki, S. and Takahashi, J. S. (2005). [Real-time luminescence reporting of circadian gene expression in mammals](#). *Methods Enzymol* 393: 288-301.
6. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. (2000). [Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats](#). *Science* 288(5466): 682-685.
7. Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepk, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M. and Takahashi, J. S. (2004). [PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(15): 5339-5346.

Bibliographie

- Abarca, C.**, Albrecht, U., and Spanagel, R. (2002). Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9026–9030. doi:10.1073/pnas.142039099.
- Abe, M.**, Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., and Block, G.D., (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22, 350–356.
- Abraham, D.**, Dallmann, R., Steinlechner, S., Albrecht, U., Eichele, G., and Oster, H. (2006). Restoration of circadian rhythmicity in circadian clock-deficient mice in constant light. *J. Biol. Rhythms* 21, 169–176. doi:10.1177/0748730406288040.
- Abraham, U.**, Prior, J. L., Granados-Fuentes, D., Piwnica-Worms, D. R., and Herzog, E. D. (2005). Independent circadian oscillations of Period1 in specific brain areas in vivo and in vitro. *J. Neurosci.* 25, 8620–8626. doi:10.1523/JNEUROSCI.2225-05.2005.
- Ahumada-Galleguillos, P.**, Lemus, C. G., Díaz, E., Osorio-Reich, M., Härtel, S., and Concha, M. L. (2017). Directional asymmetry in the volume of the human habenula. *Brain Structure and Function* 222, 1087–1092. doi:10.1007/s00429-016-1231-z.
- Aizawa, H.** (2013). Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anat Sci Int* 88, 1–9. doi:10.1007/s12565-012-0158-6.
- Aizawa, H.**, Amo, R., and Okamoto, H. (2011). Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci* 5, 138. doi:10.3389/fnins.2011.00138.
- Aizawa, H.**, Cui, W., Tanaka, K., and Okamoto, H. (2013a). Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front. Hum. Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnhum.2013.00826.
- Aizawa, H.**, Kobayashi, M., Tanaka, S., Fukai, T., and Okamoto, H. (2012). Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J. Comp. Neurol.* 520, 4051–4066. doi:10.1002/cne.23167.
- Aizawa, H.**, Yanagihara, S., Kobayashi, M., Niisato, K., Takekawa, T., Harukuni, R., McHugh, T. J., Fukai, T., Isomura, Y., and Okamoto, H. (2013b). The Synchronous Activity of Lateral Habenular Neurons Is Essential for Regulating Hippocampal Theta Oscillation. *Journal of Neuroscience* 33, 8909–8921. doi:10.1523/JNEUROSCI.4369-12.2013.
- Akashi, M.**, and Takumi, T. (2005). The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 441–448. doi:10.1038/nsmb925.
- Akashi, M.**, Tsuchiya, Y., Yoshino, T., and Nishida, E. (2002). Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1693–1703.
- Allen Institute.** ISH data mapping on mouse brain. *Allen Brain Atlas*. Available at: <http://mouse.brain-map.org/> [Accessed February 26, 2018].
- Amir, S.**, Cain, S., Sullivan, J., Robinson, B., and Stewart, J. (1999). In rats, odor-induced Fos in the olfactory pathways depends on the phase of the circadian clock. *Neurosci. Lett.* 272, 175–178.
- Amir, S.**, Lamont, E. W., Robinson, B., and Stewart, J. (2004). A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurosci.* 24, 781–790. doi:10.1523/JNEUROSCI.4488-03.2004.

- Amo, R.**, Aizawa, H., Takahoko, M., Kobayashi, M., Takahashi, R., Aoki, T., and Okamoto, H. (2010). Identification of the zebrafish ventral habenula as a homolog of the mammalian lateral habenula. *J. Neurosci.* 30, 1566–1574. doi:10.1523/JNEUROSCI.3690-09.2010.
- Andres, K. H.**, von Düring, M., and Veh, R. W. (1999). Subnuclear organization of the rat habenular complexes. *J. Comp. Neurol.* 407, 130–150.
- Arriza, J. L.**, Simerly, R. B., Swanson, L. W., and Evans, R. M. (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1, 887–900.
- Atweh, S. F.**, and Kuhar, M. J. (1977). Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem. *Brain Res.* 129, 1–12.
- Badr, C. E.** (2014). “Bioluminescence Imaging: Basics and Practical Limitations,” in *Bioluminescent Imaging: Methods and Protocols* Methods in Molecular Biology., ed. C. E. Badr (Totowa, NJ: Humana Press), 1–18. doi:10.1007/978-1-62703-718-1_1.
- Bae, K.**, Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., and Weaver, D. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525–536.
- Baker, P. M.**, Oh, S. E., Kidder, K. S., and Mizumori, S. J. Y. (2015). Ongoing behavioral state information signaled in the lateral habenula guides choice flexibility in freely moving rats. *Front. Behav. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnbeh.2015.00295.
- Baker, P. M.**, Raynor, S. A., Francis, N. T., and Mizumori, S. J. Y. (2017). Lateral habenula integration of proactive and retroactive information mediates behavioral flexibility. *Neuroscience* 345, 89–98. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.02.010.
- Balcita-Pedicino, J. J.**, Omelchenko, N., Bell, R., and Sesack, S. R. (2011). The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J. Comp. Neurol.* 519, 1143–1164. doi:10.1002/cne.22561.
- Baldo, B. A.**, Daniel, R. A., Berridge, C. W., and Kelley, A. E. (2003). Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J. Comp. Neurol.* 464, 220–237. doi:10.1002/cne.10783.
- Balsalobre, A.**, Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G., and Schibler, U. (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344–2347.
- Barker, D. J.**, Root, D. H., Zhang, S., and Morales, M. (2016). Multiplexed neurochemical signaling by neurons of the ventral tegmental area. *J. Chem. Neuroanat.* 73, 33–42. doi:10.1016/j.jchemneu.2015.12.016.
- Bass, C. E.**, Jansen, H. T., and Roberts, D. C. S. (2010). Free-running rhythms of cocaine self-administration in rats held under constant lighting conditions. *Chronobiol. Int.* 27, 535–548. doi:10.3109/07420521003664221.
- Beaulieu, J.-M.**, and Gainetdinov, R. R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217. doi:10.1124/pr.110.002642.
- Behbehani, M. M.** (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.* 46, 575–605.
- Belin, M. F.**, Aguera, M., Nanopoulos, D., Gamrani, H., Maitre, M., Calas, A., and Pujol, J. F. (1982). A radioautographic and immunocytochemical study of the GABA systems of the habenula complex in the rat. *Neurochem. Int.* 4, 303–312.

- Bell-Pedersen, D.**, Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., and Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6, 544–556. doi:10.1038/nrg1633.
- Benarroch, E. E.** (2015). Habenula: Recently recognized functions and potential clinical relevance. *Neurology* 85, 992–1000. doi:10.1212/WNL.0000000000001937.
- Bernard, R.**, and Veh, R. W. (2012). Individual neurons in the rat lateral habenular complex project mostly to the dopaminergic ventral tegmental area or to the serotonergic raphe nuclei. *J. Comp. Neurol.* 520, 2545–2558. doi:10.1002/cne.23080.
- Berridge, K. C.** (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl.)* 191, 391–431. doi:10.1007/s00213-006-0578-x.
- Berson, D. M.**, Dunn, F. A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073. doi:10.1126/science.1067262.
- Bianco, I. H.**, and Wilson, S. W. (2009). The habenular nuclei: a conserved asymmetric relay station in the vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 364, 1005–1020. doi:10.1098/rstb.2008.0213.
- Birnbaumer, M.** (2000). Vasopressin Receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11, 406–410. doi:10.1016/S1043-2760(00)00304-0.
- Bonnin, A.**, Peng, W., Hewlett, W., and Levitt, P. (2006). Expression mapping of 5-HT₁ serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience* 141, 781–794. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.04.036.
- Bouthenet, M. L.**, Souil, E., Martres, M. P., Sokoloff, P., Giros, B., and Schwartz, J. C. (1991). Localization of dopamine D₃ receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D₂ receptor mRNA. *Brain Res.* 564, 203–219.
- Brancaccio, M.**, Patton, A. P., Chesham, J. E., Maywood, E. S., and Hastings, M. H. (2017). Astrocytes Control Circadian Timekeeping in the Suprachiasmatic Nucleus via Glutamatergic Signaling. *Neuron* 93, 1420–1435.e5. doi:10.1016/j.neuron.2017.02.030.
- Brinschwitz, K.**, Dittgen, A., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., and Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.050.
- Brown, P. L.**, and Shepard, P. D. (2016). Functional evidence for a direct excitatory projection from the lateral habenula to the ventral tegmental area in the rat. *J. Neurophysiol.* 116, 1161–1174. doi:10.1152/jn.00305.2016.
- Buijs, R. M.** (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* 192, 423–435.
- Bull, E. J.**, Porkess, V., Rigby, M., Hutson, P. H., and Fone, K. C. F. (2006). Pre-treatment with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) causes long-lasting changes in 5-HT_{2A} receptor-mediated glucose utilization in the rat brain. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 20, 272–280. doi:10.1177/0269881106059583.
- Buonfiglio, D. C.**, Malan, A., Sandu, C., Jaeger, C., Cipolla-Neto, J., Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M.-P. (2014). Rat retina shows robust circadian expression of clock and clock output genes in explant culture. *Mol. Vis.* 20, 742–752.
- Caldecott-Hazard, S.**, Mazziotto, J., and Phelps, M. (1988). Cerebral correlates of depressed behavior in rats, visualized using 14C-2-deoxyglucose autoradiography. *J. Neurosci.* 8, 1951–1961.

- Carlson, J.**, Armstrong, B., Switzer III, R. C., and Ellison, G. (2000). Selective neurotoxic effects of nicotine on axons in fasciculus retroflexus further support evidence that this a weak link in brain across multiple drugs of abuse. *Neuropharmacology* 39, 2792–2798. doi:10.1016/S0028-3908(00)00141-6.
- Challet, E.**, and Mendoza, J. (2010). Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. *Cell Tissue Res.* 341, 1–11. doi:10.1007/s00441-010-1001-9.
- Chastrette, N.**, Pfaff, D. W., and Gibbs, R. B. (1991). Effects of daytime and nighttime stress on Fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula, and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Res.* 563, 339–344.
- Chen, W.**, and Baler, R. (2000). The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81, 43–50.
- Cheng, M. Y.**, Bittman, E. L., Hattar, S., and Zhou, Q.-Y. (2005). Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock. *BMC Neuroscience* 6, 17. doi:10.1186/1471-2202-6-17.
- Cheng, M. Y.**, Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., Weaver, D. R., Leslie, F. M., and Zhou, Q.-Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417, 405–410. doi:10.1038/417405a.
- Cheng, R.-K.**, Krishnan, S., Lin, Q., Kibat, C., and Jesuthasan, S. (2017). Characterization of a thalamic nucleus mediating habenula responses to changes in ambient illumination. *BMC Biol.* 15, 104. doi:10.1186/s12915-017-0431-1.
- Ch'ng, S. S.**, and Lawrence, A. J. (2015). Distribution of the orexin-1 receptor (OX1R) in the mouse forebrain and rostral brainstem: A characterisation of OX1R-eGFP mice. *J. Chem. Neuroanat.* 66–67, 1–9. doi:10.1016/j.jchemneu.2015.03.002.
- Choi, K.**, Lee, Y., Lee, C., Hong, S., Lee, S., Kang, S. J., and Shin, K. S. (2016). Optogenetic activation of septal GABAergic afferents entrains neuronal firing in the medial habenula. *Sci Rep* 6, 34800. doi:10.1038/srep34800.
- Chou, M.-Y.**, Amo, R., Kinoshita, M., Cherg, B.-W., Shimazaki, H., Agetsuma, M., Shiraki, T., Aoki, T., Takahoko, M., Yamazaki, M., Higashijima, S., and Okamoto, H. (2016). Social conflict resolution regulated by two dorsal habenular subregions in zebrafish. *Science* 352, 87–90. doi:10.1126/science.aac9508.
- Christiansen, S. L.**, Bouzinova, E. V., Fahrenkrug, J., and Wiborg, O. (2016). Altered Expression Pattern of Clock Genes in a Rat Model of Depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19, pyw061. doi:10.1093/ijnp/pyw061.
- Christoph, G. R.**, Leonzio, R. J., and Wilcox, K. S. (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat. *J. Neurosci.* 6, 613–619.
- Concha, M. L.**, and Wilson, S. W. (2001). Asymmetry in the epithalamus of vertebrates. *J. Anat.* 199, 63–84.
- Corodimas, K. P.**, Rosenblatt, J. S., Canfield, M. E., and Morrell, J. I. (1993). Neurons in the lateral subdivision of the habenular complex mediate the hormonal onset of maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 107, 827–843.
- Cui, W.**, Mizukami, H., Yanagisawa, M., Aida, T., Nomura, M., Isomura, Y., Takayanagi, R., Ozawa, K., Tanaka, K., and Aizawa, H. (2014). Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance. *J. Neurosci.* 34, 16273–16285. doi:10.1523/JNEUROSCI.1465-14.2014.

- Czeisler, C. A.**, Shanahan, T. L., Klerman, E. B., Martens, H., Brotman, D. J., Emens, J. S., Klein, T., and Rizzo, J. F. (1995). Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N. Engl. J. Med.* 332, 6–11. doi:10.1056/NEJM199501053320102.
- Davies, J.**, Chen, J., Pink, R., Carter, D., Saunders, N., Sotiriadis, G., Bai, B., Pan, Y., Howlett, D., Payne, A., Randevara, H., and Karteris, E. (2015). Orexin receptors exert a neuroprotective effect in Alzheimer's disease (AD) via heterodimerization with GPR103. *Sci Rep* 5, 12584. doi:10.1038/srep12584.
- Davis, M.**, Walker, D. L., Miles, L., and Grillon, C. (2010). Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35, 105–135. doi:10.1038/npp.2009.109.
- Dawson, T. M.**, Barone, P., Sidhu, A., Wamsley, J. K., and Chase, T. N. (1988). The D1 dopamine receptor in the rat brain: quantitative autoradiographic localization using an iodinated ligand. *Neuroscience* 26, 83–100.
- de Vries, G. J.**, Buijs, R. M., and Swaab, D. F. (1981). Ontogeny of the vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain--presence of a sex difference in the lateral septum. *Brain Res.* 218, 67–78.
- D'Hooge, R.**, and De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 36, 60–90.
- Díaz, E.**, Bravo, D., Rojas, X., and Concha, M. L. (2011). Morphologic and immunohistochemical organization of the human habenular complex. *J. Comp. Neurol.* 519, 3727–3747. doi:10.1002/cne.22687.
- Dingledine, R.**, Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 51, 7–61.
- Distel, H.**, and Ebbesson, S. O. (1981). Habenular projections in the monitor lizard (*Varanus benegalensis*). *Exp Brain Res* 43, 324–329.
- Dkhissi-Benyahya, O.**, Coutanson, C., Knoblauch, K., Lahouaoui, H., Leviel, V., Rey, C., Bennis, M., and Cooper, H. M. (2013). The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3435–3447. doi:10.1007/s00018-013-1338-9.
- Dolzani, S. D.**, Baratta, M. V., Amat, J., Agster, K. L., Sadoris, M. P., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2016). Activation of a Habenulo-Raphe Circuit Is Critical for the Behavioral and Neurochemical Consequences of Uncontrollable Stress in the Male Rat. *eNeuro* 3. doi:10.1523/ENEURO.0229-16.2016.
- Dorenbos, R.**, Contini, M., Hirasawa, H., Gustincich, S., and Raviola, E. (2007). Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Vis. Neurosci.* 24, 573–580. doi:10.1017/S0952523807070538.
- D'Ortous de Mairan, J.-J.** (1729). Observation botanique. *Hist. de l'Acad. Royale des Sciences*, 35–36.
- Doyle, S. E.**, Feng, H., Garber, G., Menaker, M., and Lynch, W. J. (2015). Effects of circadian disruption on methamphetamine consumption in methamphetamine-exposed rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 232, 2169–2179. doi:10.1007/s00213-014-3845-2.
- Dreosti, E.**, Vendrell Llopis, N., Carl, M., Yaksi, E., and Wilson, S. W. (2014). Left-right asymmetry is required for the habenulae to respond to both visual and olfactory stimuli. *Curr. Biol.* 24, 440–445. doi:10.1016/j.cub.2014.01.016.
- Dubois, A.**, Savasta, M., Curet, O., and Scatton, B. (1986). Autoradiographic distribution of the D1 agonist [³H]SKF 38393, in the rat brain and spinal cord. Comparison with the distribution of D2 dopamine receptors. *Neuroscience* 19, 125–137.

- Dudley, T. E.,** DiNardo, L. A., and Glass, J. D. (1998). Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 18, 5045–5052.
- Eide, E. J.,** Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., and Virshup, D. M. (2002). The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iε. *J. Biol. Chem.* 277, 17248–17254. doi:10.1074/jbc.M111466200.
- Eide, E. J.,** Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., and Virshup, D. M. (2005). Control of mammalian circadian rhythm by CKIε-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2795–2807. doi:10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005.
- Ellison, G.** (1994). Stimulant-induced psychosis, the dopamine theory of schizophrenia, and the habenula. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19, 223–239.
- Ellison, G.** (2002). Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry. *Eur Neuropsychopharmacol* 12, 287–297.
- Ellison, G.,** Irwin, S., Keys, A., Noguchi, K., and Sulur, G. (1996). The neurotoxic effects of continuous cocaine and amphetamine in Habenula: implications for the substrates of psychosis. *NIDA Res. Monogr.* 163, 117–145.
- Ely, B. A.,** Xu, J., Goodman, W. K., Lapidus, K. A., Gabbay, V., and Stern, E. R. (2016). Resting-state functional connectivity of the human habenula in healthy individuals: Associations with subclinical depression. *Hum Brain Mapp* 37, 2369–2384. doi:10.1002/hbm.23179.
- Evely, K. M.,** Hudson, R. L., Dubocovich, M. L., and Haj-Dahmane, S. (2016). Melatonin receptor activation increases glutamatergic synaptic transmission in the rat medial lateral habenula. *Synapse* 70, 181–186. doi:10.1002/syn.21892.
- Fakhoury, M.** (2017). The habenula in psychiatric disorders: More than three decades of translational investigation. *Neurosci Biobehav Rev* 83, 721–735. doi:10.1016/j.neubiorev.2017.02.010.
- Fernstrom, J. D.,** and Fernstrom, M. H. (2007). Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *The Journal of Nutrition* 137, 1539S-1547S. doi:10.1093/jn/137.6.1539S.
- Fore, S.,** Palumbo, F., Pelgrims, R., and Yaksi, E. (2017). Information processing in the vertebrate habenula. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.08.019.
- Franklin, T. B.,** Saab, B. J., and Mansuy, I. M. (2012). Neural mechanisms of stress resilience and vulnerability. *Neuron* 75, 747–761. doi:10.1016/j.neuron.2012.08.016.
- Freedman, M. S.,** Lucas, R. J., Soni, B., von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., and Foster, R. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 502–504.
- Friedman, A.,** Lax, E., Dikshtein, Y., Abraham, L., Flaumenhaft, Y., Sudai, E., Ben-Tzion, M., Ami-Ad, L., Yaka, R., and Yadid, G. (2010). Electrical stimulation of the lateral habenula produces enduring inhibitory effect on cocaine seeking behavior. *Neuropharmacology* 59, 452–459. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.06.008.
- Friedman, A.,** Lax, E., Dikshtein, Y., Abraham, L., Flaumenhaft, Y., Sudai, E., Ben-Tzion, M., and Yadid, G. (2011). Electrical stimulation of the lateral habenula produces an inhibitory effect on sucrose self-administration. *Neuropharmacology* 60, 381–387. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.10.006.
- Fu, R.,** Mei, Q., Zuo, W., Li, J., Gregor, D., Bekker, A., and Ye, J. (2017). Low-dose ethanol excites lateral habenula neurons projecting to VTA, RMTg, and raphe. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 9, 217–230.

- Fukuhara, C.,** Liu, C., Ivanova, T. N., Chan, G. C.-K., Storm, D. R., Iuvone, P. M., and Tosini, G. (2004). Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J. Neurosci.* 24, 1803–1811. doi:10.1523/JNEUROSCI.4988-03.2004.
- Gaffiot, F.** (1934). Définition de habena. *Dictionnaire Latin Français*, 730. Available at: <https://www.lexilogos.com/latin/gaffiot.php?q=habena> [Accessed March 12, 2018].
- Gallego, M.,** Kang, H., and Virshup, D. M. (2006). Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. *Biochem. J.* 399, 169–175. doi:10.1042/BJ20060678.
- Geisler, S.,** Andres, K. H., and Veh, R. W. (2003). Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 458, 78–97. doi:10.1002/cne.10566.
- Geisler, S.,** and Trimble, M. (2008). The lateral habenula: no longer neglected. *CNS Spectr* 13, 484–489.
- Gill, M. J.,** Ghee, S. M., Harper, S. M., and See, R. E. (2013). Inactivation of the lateral habenula reduces anxiogenic behavior and cocaine seeking under conditions of heightened stress. *Pharmacol Biochem Behav* 111, 24–29. doi:10.1016/j.pbb.2013.08.002.
- Glass, J. D.,** DiNardo, L. A., and Ehlen, J. C. (2000). Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin release and circadian phase-resetting. *Brain Res.* 859, 224–232.
- Golden, S. A.,** Heshmati, M., Flanigan, M., Christoffel, D. J., Guise, K., Pfau, M. L., Aleyasin, H., Menard, C., Zhang, H., Hodes, G. E., Bregman, D., Khibnik, L., Tai, J., Rebusi, N., Krawitz, B., Chaudhury, D., Walsh, J. J., Han, M.-H., Shapiro, M. L., and Russo, S. J. (2016). Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward. *Nature* 534, 688–692. doi:10.1038/nature18601.
- Golombek, D. A.,** and Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews* 90, 1063–1102. doi:10.1152/physrev.00009.2009.
- Gonçalves, L.,** Sego, C., and Metzger, M. (2012). Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 520, 1278–1300. doi:10.1002/cne.22787.
- Good, C. H.,** Wang, H., Chen, Y.-H., Mejias-Aponte, C. A., Hoffman, A. F., and Lupica, C. R. (2013). Dopamine D4 Receptor Excitation of Lateral Habenula Neurons via Multiple Cellular Mechanisms. *J. Neurosci.* 33, 16853–16864. doi:10.1523/JNEUROSCI.1844-13.2013.
- Gottesfeld, Z.** (1983). Origin and distribution of noradrenergic innervation in the habenula: A neurochemical study. *Brain Research* 275, 299–304. doi:10.1016/0006-8993(83)90990-3.
- Gould, S. J.,** and Subramani, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal. Biochem.* 175, 5–13.
- Goutagny, R.,** Loureiro, M., Jackson, J., Chaumont, J., Williams, S., Isope, P., Kelche, C., Cassel, J.-C., and Lecourtier, L. (2013). Interactions between the Lateral Habenula and the Hippocampus: Implication for Spatial Memory Processes. *Neuropsychopharmacology* 38, 2418–2426. doi:10.1038/npp.2013.142.
- Granados-Fuentes, D.,** Prolo, L. M., Abraham, U., and Herzog, E. D. (2004a). The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 24, 615–619. doi:10.1523/JNEUROSCI.4002-03.2004.
- Granados-Fuentes, D.,** Saxena, M. T., Prolo, L. M., Aton, S. J., and Herzog, E. D. (2004b). Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. *Eur. J. Neurosci.* 19, 898–906.

- Granados-Fuentes, D.,** Tseng, A., and Herzog, E. D. (2006). A circadian clock in the olfactory bulb controls olfactory responsivity. *J. Neurosci.* 26, 12219–12225. doi:10.1523/JNEUROSCI.3445-06.2006.
- Grillner, S.,** von Twickel, A., and Robertson, B. (2017). The blueprint of the vertebrate forebrain - With special reference to the habenulae. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2017.10.023.
- Grippe, R. M.,** Purohit, A. M., Zhang, Q., Zweifel, L. S., and Güler, A. D. (2017). Direct Midbrain Dopamine Input to the Suprachiasmatic Nucleus Accelerates Circadian Entrainment. *Curr. Biol.* 27, 2465-2475.e3. doi:10.1016/j.cub.2017.06.084.
- Gruber, C.,** Kahl, A., Lebenheim, L., Kowski, A., Dittgen, A., and Veh, R. W. (2007). Dopaminergic projections from the VTA substantially contribute to the mesohabenular pathway in the rat. *Neurosci. Lett.* 427, 165–170. doi:10.1016/j.neulet.2007.09.016.
- Guilding, C.,** Hughes, A. T. L., and Piggins, H. D. (2010). Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience* 169, 1630–1639. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.015.
- Guilding, C.,** and Piggins, H. D. (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J. Neurosci.* 25, 3195–3216. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05581.x.
- Guillaumond, F.,** Dardente, H., Giguère, V., and Cermakian, N. (2005). Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J. Biol. Rhythms* 20, 391–403. doi:10.1177/0748730405277232.
- Haack, A. K.,** Sheth, C., Schwager, A. L., Sinclair, M. S., Tandon, S., and Taha, S. A. (2014). Lesions of the lateral habenula increase voluntary ethanol consumption and operant self-administration, block yohimbine-induced reinstatement of ethanol seeking, and attenuate ethanol-induced conditioned taste aversion. *PLoS ONE* 9, e92701. doi:10.1371/journal.pone.0092701.
- Hamada, T.,** Sutherland, K., Ishikawa, M., Miyamoto, N., Honma, S., Shirato, H., and Honma, K.-I. (2016). In vivo imaging of clock gene expression in multiple tissues of freely moving mice. *Nat Commun* 7, 11705. doi:10.1038/ncomms11705.
- Han, L. N.,** Zhang, L., Sun, Y. N., Du, C. X., Zhang, Y. M., Wang, T., Zhang, J., and Liu, J. (2016). Serotonin7 receptors in the lateral habenular nucleus regulate depressive-like behaviors in the hemiparkinsonian rats. *Brain Research* 1644, 79–87. doi:10.1016/j.brainres.2016.05.016.
- Hankins, M. W.,** Peirson, S. N., and Foster, R. G. (2008). Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 31, 27–36. doi:10.1016/j.tins.2007.11.002.
- Hannibal, J.** (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 453, 389–417. doi:10.1002/cne.10418.
- Harada, Y.,** Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., and Fukada, Y. (2005). Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.* 280, 31714–31721. doi:10.1074/jbc.M506225200.
- Harbour, V. L.,** Weigl, Y., Robinson, B., and Amir, S. (2013). Comprehensive mapping of regional expression of the clock protein PERIOD2 in rat forebrain across the 24-h day. *PLoS ONE* 8, e76391. doi:10.1371/journal.pone.0076391.
- Hastings, M.,** O’Neill, J. S., and Maywood, E. S. (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of Endocrinology* 195, 187–198. doi:10.1677/JOE-07-0378.

- Hattar, S.**, Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., and Berson, D. M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349. doi:10.1002/cne.20970.
- Hattar, S.**, Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., and Yau, K. W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295. doi:10.1126/science.1069609.
- Heimer, L.**, and Van Hoesen, G. W. (2006). The limbic lobe and its output channels: Implications for emotional functions and adaptive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30, 126–147. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.06.006.
- Hennigan, K.**, D'Ardenne, K., and McClure, S. M. (2015). Distinct midbrain and habenula pathways are involved in processing aversive events in humans. *J. Neurosci.* 35, 198–208. doi:10.1523/JNEUROSCI.0927-14.2015.
- Herkenham, M.**, and Nauta, W. J. (1977). Afferent connections of the habenular nuclei in the rat. A horseradish peroxidase study, with a note on the fiber-of-passage problem. *J. Comp. Neurol.* 173, 123–146. doi:10.1002/cne.901730107.
- Herkenham, M.**, and Nauta, W. J. (1979). Efferent connections of the habenular nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 187, 19–47. doi:10.1002/cne.901870103.
- Hernández, V. S.**, Vázquez-Juárez, E., Márquez, M. M., Jáuregui-Huerta, F., Barrio, R. A., and Zhang, L. (2015). Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. *Front Neuroanat* 9, 130. doi:10.3389/fnana.2015.00130.
- Hernando, F.**, Schoots, O., Lolait, S. J., and Burbach, J. P. (2001). Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin. *Endocrinology* 142, 1659–1668. doi:10.1210/endo.142.4.8067.
- Hervieu, G.**, and Emson, P. C. (1998). The localization of somatostatin receptor 1 (sst1) immunoreactivity in the rat brain using an N-terminal specific antibody. *Neuroscience* 85, 1263–1284.
- Herzog, E. D.**, Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y., and Tei, H. (2004a). Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythms* 19, 35–46. doi:10.1177/0748730403260776.
- Herzog, E.**, Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Giros, B., Gaspar, P., and El Mestikawy, S. (2004b). Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123, 983–1002.
- Hikosaka, O.** (2010). The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 503–513. doi:10.1038/nrn2866.
- Hnasko, T. S.**, Hjelmstad, G. O., Fields, H. L., and Edwards, R. H. (2012). Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *J. Neurosci.* 32, 15076–15085. doi:10.1523/JNEUROSCI.3128-12.2012.
- Honma, K.**, and Honma, S. (2009). The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1707–1717. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06976.x.
- Honma, S.**, Ono, D., Suzuki, Y., Inagaki, N., Yoshikawa, T., Nakamura, W., Honma, K. (2012). “Suprachiasmatic nucleus: Cellular clocks and networks,” in *The Neurobiology of Circadian Timing Progress in Brain Research*, ed. M. M. Andries Kalsbeek Till Roenneberg and Russell G. Foster (Elsevier), 129–141. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00029-0.

- Hood, S.**, Cassidy, P., Cossette, M.-P., Weigl, Y., Verwey, M., Robinson, B., Stewart, J., and Amir, S. (2010). Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *J. Neurosci.* 30, 14046–14058. doi:10.1523/JNEUROSCI.2128-10.2010.
- Hoorneman, E. M.**, and Buijs, R. M. (1982). Vasopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 243, 235–241.
- Hsu, Y.-W. A.**, Wang, S. D., Wang, S., Morton, G., Zariwala, H. A., de la Iglesia, H. O., Turner, E. E. (2014). Role of the Dorsal Medial Habenula in the Regulation of Voluntary Activity, Motor Function, Hedonic State, and Primary Reinforcement. *J. Neurosci.* 34, 11366–11384. doi:10.1523/JNEUROSCI.1861-14.2014.
- Hughes, A. T. L.**, Croft, C. L., Samuels, R. E., Myung, J., Takumi, T., and Piggins, H. D. (2015). Constant light enhances synchrony among circadian clock cells and promotes behavioral rhythms in VPAC2-signaling deficient mice. *Sci Rep* 5, 14044. doi:10.1038/srep14044.
- Huhman, K. L.**, and Albers, H. E. (1994). Neuropeptide Y microinjected into the suprachiasmatic region phase shifts circadian rhythms in constant darkness. *Peptides* 15, 1475–1478.
- Hwang, E.-K.**, and Chung, J. (2014). 5HT(1B) receptor-mediated pre-synaptic depression of excitatory inputs to the rat lateral habenula. *Neuropharmacology* 81, 153–165. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.01.046.
- Iitaka, C.**, Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005). A role for glycogen synthase kinase-3beta in the mammalian circadian clock. *J. Biol. Chem.* 280, 29397–29402. doi:10.1074/jbc.M503526200.
- Ishida, A.**, Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., and Okamura, H. (2005). Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* 2, 297–307. doi:10.1016/j.cmet.2005.09.009.
- Iwahori, N.** (1977). A Golgi study on the habenular nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 72, 319–344.
- Izumo, M.**, Pejchal, M., Schook, A. C., Lange, R. P., Walisser, J. A., Sato, T. R., Wang, X., Bradfield, C. A., and Takahashi, J. S. (2014). Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain Bmal1 mutant. *Elife* 3. doi:10.7554/eLife.04617.
- Jacinto, L. R.**, Mata, R., Novais, A., Marques, F., and Sousa, N. (2017). The habenula as a critical node in chronic stress-related anxiety. *Exp Neurol* 289, 46–54. doi:10.1016/j.expneurol.2016.12.003.
- Jaeger, C.** (2014). Organisation tissulaire de l’horloge dans la rétine de rongeur. (Thèse en Neurosciences). Université de Strasbourg, Strasbourg.
- Jaeger, C.**, Sandu, C., Malan, A., Mellac, K., Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M.-P. (2015). Circadian organization of the rodent retina involves strongly coupled, layer-specific oscillators. *FASEB J.* 29, 1493–1504. doi:10.1096/fj.14-261214.
- Jagota, A.**, de la Iglesia, H. O., and Schwartz, W. J. (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat. Neurosci.* 3, 372–376. doi:10.1038/73943.
- Jennes, L.**, Stumpf, W. E., and Kalivas, P. W. (1982). Neurotensin: topographical distribution in rat brain by immunohistochemistry. *J. Comp. Neurol.* 210, 211–224. doi:10.1002/cne.902100302.
- Jetti, S. K.**, Vendrell-Llopis, N., and Yaksi, E. (2014). Spontaneous activity governs olfactory representations in spatially organized habenular microcircuits. *Curr. Biol.* 24, 434–439. doi:10.1016/j.cub.2014.01.015.
- Jhou, T. C.**, Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B., and Holland, P. C. (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61, 786–800. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.001.

- Jhou, T. C.**, Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A., and Zahm, D. S. (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513, 566–596. doi:10.1002/cne.21891.
- Jhou, T. C.**, Good, C. H., Rowley, C. S., Xu, S.-P., Wang, H., Burnham, N. W., Hoffman, A. F., Lupica, C. R., and Ikemoto, S. (2013). Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *J. Neurosci.* 33, 7501–7512. doi:10.1523/JNEUROSCI.3634-12.2013.
- Ji, H.**, and Shepard, P. D. (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J. Neurosci.* 27, 6923–6930. doi:10.1523/JNEUROSCI.0958-07.2007.
- Jin, X.**, Shearman, L. P., Weaver, D. R., Zylka, M. J., de Vries, G. J., and Reppert, S. M. (1999). A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96, 57–68.
- Jones, B. E.**, and Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res.* 127, 25–53.
- Julius, D.**, and Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210. doi:10.1038/35093019.
- Kalén, P.**, Strecker, R. E., Rosengren, E., and Björklund, A. (1989). Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA. *Brain Res.* 492, 187–202.
- Kalsbeek, A.**, Palm, I. F., La Fleur, S. E., Scheer, F. a. J. L., Perreau-Lenz, S., Ruiter, M., Kreier, F., Cailotto, C., and Buijs, R. M. (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *J. Biol. Rhythms* 21, 458–469. doi:10.1177/0748730406293854.
- Kang, S.**, Li, J., Bekker, A., and Ye, J.-H. (2018). Rescue of glutamate transport in the lateral habenula alleviates depression- and anxiety-like behaviors in ethanol-withdrawn rats. *Neuropharmacology* 129, 47–56. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.11.013.
- Kaufling, J.**, Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M.-J., and Barrot, M. (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 513, 597–621. doi:10.1002/cne.21983.
- Keys, A. S.**, and Ellison, G. D. (1999). Long-term alterations in benzodiazepine, muscarinic and alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor density following continuous cocaine administration. *Pharmacol. Toxicol.* 85, 144–150.
- Khaled, M. A. T. M.**, Pushparaj, A., Di Ciano, P., Diaz, J., and Le Foll, B. (2014). Dopamine D3 receptors in the basolateral amygdala and the lateral habenula modulate cue-induced reinstatement of nicotine seeking. *Neuropsychopharmacology* 39, 3049–3058. doi:10.1038/npp.2014.158.
- Kim, U.**, and Chang, S.-Y. (2005). Dendritic morphology, local circuitry, and intrinsic electrophysiology of neurons in the rat medial and lateral habenular nuclei of the epithalamus. *J. Comp. Neurol.* 483, 236–250. doi:10.1002/cne.20410.
- Kim, U.**, and Chung, L. (2007). Dual GABAergic synaptic response of fast excitation and slow inhibition in the medial habenula of rat epithalamus. *J. Neurophysiol.* 98, 1323–1332. doi:10.1152/jn.00575.2007.
- Kim, Y.**, Morath, B., Hu, C., Byrne, L. K., Sutor, S. L., Frye, M. A., and Tye, S. J. (2016). Antidepressant actions of lateral habenula deep brain stimulation differentially correlate with CaMKII/GSK3/AMPK signaling locally and in the infralimbic cortex. *Behav. Brain Res.* 306, 170–177. doi:10.1016/j.bbr.2016.02.039.

- Kirkpatrick, M. G.**, Haney, M., Vosburg, S. K., Comer, S. D., Foltin, R. W., and Hart, C. L. (2009). Methamphetamine self-administration by humans subjected to abrupt shift and sleep schedule changes. *Psychopharmacology (Berl.)* 203, 771–780. doi:10.1007/s00213-008-1423-1.
- Klemm, W. R.** (2004). Habenular and interpeduncularis nuclei: shared components in multiple-function networks. *Med. Sci. Monit.* 10, RA261-273.
- Ko, C. H.**, and Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15 Spec No 2, R271-277. doi:10.1093/hmg/ddl207.
- Kobayashi, R. M.**, Palkovits, M., Jacobowitz, D. M., and Kopin, I. J. (1975). Biochemical mapping of the noradrenergic projection from the locus coeruleus. A model for studies of brain neuronal pathways. *Neurology* 25, 223–233.
- Kopp, J.**, Xu, Z.-Q., Zhang, X., Pedrazzini, T., Herzog, H., Kresse, A., Wong, H., Walsh, J. H., and Hökfelt, T. (2002). Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience* 111, 443–532.
- Kosobud, A. E. K.**, Gillman, A. G., Leffel, J. K., Pecoraro, N. C., Rebec, G. V., and Timberlake, W. (2007). Drugs of abuse can entrain circadian rhythms. *ScientificWorldJournal* 7, 203–212. doi:10.1100/tsw.2007.234.
- Kowski, A. B.**, Veh, R. W., and Weiss, T. (2009). Dopaminergic activation excites rat lateral habenular neurons in vivo. *Neuroscience* 161, 1154–1165. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.04.026.
- Kraves, S.**, and Weitz, C. J. (2006). A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat. Neurosci.* 9, 212–219. doi:10.1038/nn1633.
- Kurumaji, A.**, Umino, A., Tanami, M., Ito, A., Asakawa, M., and Nishikawa, T. (2003). Distribution of anxiogenic-induced c-Fos in the forebrain regions of developing rats. *J Neural Transm (Vienna)* 110, 1161–1168. doi:10.1007/s00702-003-0023-9.
- Lahouaoui, H.**, Coutanson, C., Cooper, H. M., Bennis, M., and Dkhissi-Benyahya, O. (2016). Diabetic retinopathy alters light-induced clock gene expression and dopamine levels in the mouse retina. *Mol. Vis.* 22, 959–969.
- Lammel, S.**, Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., Deisseroth, K., and Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217. doi:10.1038/nature11527.
- Lammel, S.**, Steinberg, E. E., Földy, C., Wall, N. R., Beier, K., Luo, L., and Malenka, R. C. (2015). Diversity of transgenic mouse models for selective targeting of midbrain dopamine neurons. *Neuron* 85, 429–438. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.036.
- Lamont, E. W.**, Diaz, L. R., Barry-Shaw, J., Stewart, J., and Amir, S. (2005a). Daily restricted feeding rescues a rhythm of period2 expression in the arrhythmic suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 132, 245–248. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.029.
- Lamont, E. W.**, Robinson, B., Stewart, J., and Amir, S. (2005b). The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4180–4184. doi:10.1073/pnas.0500901102.
- Langmesser, S.**, Tallone, T., Bordon, A., Rusconi, S., and Albrecht, U. (2008). Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Mol. Biol.* 9, 41. doi:10.1186/1471-2199-9-41.
- Lavezzi, H. N.**, Parsley, K. P., and Zahm, D. S. (2012). Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculo-pontine tegmental nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Struct Funct* 217, 719–734. doi:10.1007/s00429-011-0368-z.

- Lawson, R. P.**, Seymour, B., Loh, E., Lutti, A., Dolan, R. J., Dayan, P., Weiskopf, N., and Roiser, J.P. (2014). The habenula encodes negative motivational value associated with primary punishment in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 11858–11863. doi:10.1073/pnas.1323586111.
- Lax, E.**, Friedman, A., Croitoru, O., Sudai, E., Ben-Moshe, H., Redlus, L., Sasson, E., Blumenfeld-Katzir, T., Assaf, Y., and Yadid, G. (2013). Neurodegeneration of lateral habenula efferent fibers after intermittent cocaine administration: implications for deep brain stimulation. *Neuropharmacology* 75, 246–254. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.06.034.
- Lecca, S.**, Meye, F. J., and Mameli, M. (2014). The lateral habenula in addiction and depression: an anatomical, synaptic and behavioral overview. *Eur. J. Neurosci.* 39, 1170–1178. doi:10.1111/ejn.12480.
- Lecca, S.**, Meye, F. J., Trusel, M., Tchenio, A., Harris, J., Schwarz, M. K., Burdakov, D., Georges, F., and Mameli, M. (2017a). Aversive stimuli drive hypothalamus-to-habenula excitation to promote escape behavior. *eLife* 6. doi:10.7554/eLife.30697.
- Lecca, S.**, Pelosi, A., Tchenio, A., Moutkine, I., Lujan, R., Hervé, D., and Mameli, M. (2016). Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. *Nature Medicine* 22, 254–261. doi:10.1038/nm.4037.
- Lecca, S.**, Trusel, M., and Mameli, M. (2017b). Footshock-induced plasticity of GABA_B signalling in the lateral habenula requires dopamine and glucocorticoid receptors. *Synapse* 71. doi:10.1002/syn.21948.
- Lecourtier, L.**, and Kelly, P. H. (2007). A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 658–672. doi:10.1016/j.neubiorev.2007.01.004.
- Lecourtier, L.**, Neijt, H. C., and Kelly, P. H. (2004). Habenula lesions cause impaired cognitive performance in rats: implications for schizophrenia. *Eur. J. Neurosci.* 19, 2551–2560. doi:10.1111/j.0953-816X.2004.03356.x.
- Lee, C.**, Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S., and Reppert, S. M. (2001). Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107, 855–867.
- LeGates, T. A.**, Fernandez, D. C., and Hattar, S. (2014). Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. *Nature Reviews Neuroscience* 15, 443–454. doi:10.1038/nrn3743.
- Leonard, C. S.**, and Kukkonen, J. P. (2014). Orexin/hypocretin receptor signalling: a functional perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171, 294–313. doi:10.1111/bph.12296.
- Li, B.**, Piriz, J., Mirrione, M., Chung, C., Proulx, C. D., Schulz, D., Henn, F., and Malinow, R. (2011). Synaptic potentiation onto habenula neurons in the learned helplessness model of depression. *Nature* 470, 535–539. doi:10.1038/nature09742.
- Li, J.**, Kang, S., Fu, R., Wu, L., Wu, W., Liu, H., Gregor, D., Zuo, W., Bekker, A., and Ye, J.-H. (2017). Inhibition of AMPA receptor and CaMKII activity in the lateral habenula reduces depressive-like behavior and alcohol intake in rats. *Neuropharmacology* 126, 108–120. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.08.035.
- Li, J.**, Li, Y., Zhang, B., Shen, X., and Zhao, H. (2016). Why depression and pain often coexist and mutually reinforce: Role of the lateral habenula. *Experimental Neurology* 284, Part A, 106–113. doi:10.1016/j.expneurol.2016.08.010.
- Li, J.-D.**, Hu, W.-P., and Zhou, Q.-Y. (2012). “The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei,” in *The Neurobiology of Circadian Timing Progress in Brain Research.*, ed. M. M. Andries Kalsbeek Till Roenneberg and Russell G. Foster (Elsevier), 119–127. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00028-9.

Li, K.

- Li, K.**, Zhou, T., Liao, L., Yang, Z., Wong, C., Henn, F., Malinow, R., Yates, J. R., and Hu, H. (2013). β CaMKII in lateral habenula mediates core symptoms of depression. *Science* 341, 1016–1020. doi:10.1126/science.1240729.
- Li, Y. Q.**, Takada, M., Shinonaga, Y., and Mizuno, N. (1993). The sites of origin of dopaminergic afferent fibers to the lateral habenular nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 333, 118–133. doi:10.1002/cne.903330110.
- Liang, F.**, Hatanaka, Y., Saito, H., Yamamori, T., and Hashikawa, T. (2000). Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor-1a and -1b mRNA variants in GABA and non-GABAergic neurons of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 416, 475–495.
- Lin, Q.**, and Jesuthasan, S. (2017). Masking of a circadian behavior in larval zebrafish involves the thalamo-habenula pathway. *Sci Rep* 7, 4104. doi:10.1038/s41598-017-04205-7.
- Liu, X.**, Zhang, Z., and Ribelayga, C. P. (2012). Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PLoS ONE* 7, e50602. doi:10.1371/journal.pone.0050602.
- London, E. D.**, Wilkerson, G., Goldberg, S. R., and Risner, M. E. (1986). Effects of L-cocaine on local cerebral glucose utilization in the rat. *Neurosci. Lett.* 68, 73–78.
- Loonen, A. J. M.**, and Ivanova, S. A. (2017). Evolution of circuits regulating pleasure and happiness with the habenula in control. *CNS Spectr*, 1–6. doi:10.1017/S1092852917000748.
- Lucas, R. J.** (2013). Mammalian inner retinal photoreception. *Curr. Biol.* 23, R125-133. doi:10.1016/j.cub.2012.12.029.
- Lucas, R. J.**, Freedman, M. S., Muñoz, M., Garcia-Fernández, J. M., and Foster, R. G. (1999). Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284, 505–507.
- Lucas, R. J.**, Lall, G. S., Allen, A. E., and Brown, T. M. (2012). How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog. Brain Res.* 199, 1–18. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00001-0.
- Lüders, E.**, Steinmetz, H., and Jäncke, L. (2002). Brain size and grey matter volume in the healthy human brain. *Neuroreport* 13, 2371–2374. doi:10.1097/01.wnr.0000049603.85580.da.
- Luo, A. H.**, Georges, F. E., and Aston-Jones, G. S. (2008). Novel neurons in ventral tegmental area fire selectively during the active phase of the diurnal cycle: Novel VTA neurons fire during the dark phase. *European Journal of Neuroscience* 27, 408–422. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05985.x.
- Ma, Z.**, Jiang, W., and Zhang, E. E. (2016). Orexin signaling regulates both the hippocampal clock and the circadian oscillation of Alzheimer's disease-risk genes. *Scientific Reports* 6, 36035. doi:10.1038/srep36035.
- Malinow, R.** (2016). Compartmentalized Disappointment? Long talk presented at the Lateral Habenula under the spotlight Symposium, Paris.
- Mansour, A.**, Meador-Woodruff, J. H., Zhou, Q., Civelli, O., Akil, H., and Watson, S. J. (1992). A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience* 46, 959–971. doi:10.1016/0306-4522(92)90197-A.
- Marcus, J. N.**, Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Chemelli, R. M., Saper, C. B., Yanagisawa, M., and Elmquist, J.K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435, 6–25.
- Maroteaux, M.**, and Mameli, M. (2012). Cocaine evokes projection-specific synaptic plasticity of lateral habenula neurons. *J. Neurosci.* 32, 12641–12646. doi:10.1523/JNEUROSCI.2405-12.2012.

- Mathis, V.** (2016). Implication de l'habénula latérale dans les processus mnésiques chez le rat. (Thèse en Neurosciences). Université de Strasbourg, Strasbourg.
- Mathis, V.,** Barbelivien, A., Majchrzak, M., Mathis, C., Cassel, J.-C., and Lecourtier, L. (2017). The Lateral Habenula as a Relay of Cortical Information to Process Working Memory. *Cereb. Cortex* 27, 5485–5495. doi:10.1093/cercor/bhw316.
- Mathis, V.,** Cosquer, B., Avallone, M., Cassel, J.-C., and Lecourtier, L. (2015). Excitatory Transmission to the Lateral Habenula Is Critical for Encoding and Retrieval of Spatial Memory. *Neuropsychopharmacology* 40, 2843–2851. doi:10.1038/npp.2015.140.
- Mathis, V.,** and Lecourtier, L. (2017). Role of the lateral habenula in memory through online processing of information. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 162, 69–78. doi:10.1016/j.pbb.2017.07.004.
- Matsumoto, M.,** and Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature* 447, 1111–1115. doi:10.1038/nature05860.
- Matsumoto, M.,** and Hikosaka, O. (2009). Representation of negative motivational value in the primate lateral habenula. *Nat. Neurosci.* 12, 77–84. doi:10.1038/nn.2233.
- Matthes, H.,** Boschert, U., Amlaiky, N., Grailhe, R., Plassat, J. L., Muscatelli, F., Mattei, M. G., and Hen, R. (1993). Mouse 5-hydroxytryptamine_{5A} and 5-hydroxytryptamine_{5B} receptors define a new family of serotonin receptors: cloning, functional expression, and chromosomal localization. *Mol. Pharmacol.* 43, 313–319.
- Matthews-Felton, T.,** Corodimas, K. P., Rosenblatt, J. S., and Morrell, J. I. (1995). Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behav. Neurosci.* 109, 1172–1188.
- McMahon, D. G.,** Iuvone, P. M., and Tosini, G. (2014). Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Prog Retin Eye Res* 39, 58–76. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.12.001.
- Meng, H.,** Wang, Y., Huang, M., Lin, W., Wang, S., and Zhang, B. (2011). Chronic deep brain stimulation of the lateral habenula nucleus in a rat model of depression. *Brain Res.* 1422, 32–38. doi:10.1016/j.brainres.2011.08.041.
- Metzger, M.,** Bueno, D., and Lima, L. B. (2017). The lateral habenula and the serotonergic system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 162, 22–28. doi:10.1016/j.pbb.2017.05.007.
- Meye, F. J.,** Lecca, S., Valentinova, K., and Mameli, M. (2013). Synaptic and cellular profile of neurons in the lateral habenula. *Front Hum Neurosci* 7, 860. doi:10.3389/fnhum.2013.00860.
- Meye, F. J.,** Valentinova, K., Lecca, S., Marion-Poll, L., Maroteaux, M. J., Musardo, S., Moutkine, I., Gardoni, F., Haganir, R. L., Georges, F., and Mameli, M. (2015). Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula. *Nat. Neurosci.* 18, 376–378. doi:10.1038/nn.3923.
- Mitchell, E. A.,** and Pratt, J. A. (1991). Neuroanatomical structures involved in the action of the 5-HT₃ antagonist ondansetron: a 2-deoxyglucose autoradiographic study in the rat. *Brain Res.* 538, 289–294.
- Mizumori, S. J. Y.,** and Baker, P. M. (2017). The Lateral Habenula and Adaptive Behaviors. *Trends Neurosci.* 40, 481–493. doi:10.1016/j.tins.2017.06.001.
- Moore, R. Y.,** and Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42, 201–206. doi:10.1016/0006-8993(72)90054-6.

- Morgan, D.**, and Roberts, D. C. S. (2004). Sensitization to the reinforcing effects of cocaine following binge-abstinent self-administration. *Neurosci Biobehav Rev* 27, 803–812. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.004.
- Morimoto, M.**, Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., and Kawata, M. (1996). Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26, 235–269.
- Morris, R. G.**, Garrud, P., Rawlins, J. N., and O’Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683.
- Nagai, K.**, Nishio, T., Nakagawa, H., Nakamura, S., and Fukuda, Y. (1978). Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Research* 142, 384–389. doi:10.1016/0006-8993(78)90648-0.
- Neumann, P. A.**, Ishikawa, M., Otaka, M., Huang, Y. H., Schlüter, O. M., and Dong, Y. (2015). Increased excitability of lateral habenula neurons in adolescent rats following cocaine self-administration. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18. doi:10.1093/ijnp/pyu109.
- Ng, K. Y.**, Leong, M. K., Liang, H., and Paxinos, G. (2017). Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct* 222, 2921–2939. doi:10.1007/s00429-017-1439-6.
- Nicholas, A. P.**, Pieribone, V. A., and Hökfelt, T. (1993). Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 56, 1023–1039.
- Nieh, E. H.**, Vander Weele, C. M., Matthews, G. A., Presbrey, K. N., Wichmann, R., Leppla, C. A., Izadmehr, E. M., and Tye, K. M. (2016). Inhibitory Input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron* 90, 1286–1298. doi:10.1016/j.neuron.2016.04.035.
- O’Dell, T. J.**, Connor, S. A., Guglietta, R., and Nguyen, P. V. (2015). β -Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn. Mem.* 22, 461–471. doi:10.1101/lm.031088.113.
- Okamoto, H.**, and Aizawa, H. (2013). Fear and anxiety regulation by conserved affective circuits. *Neuron* 78, 411–413. doi:10.1016/j.neuron.2013.04.031.
- Omelchenko, N.**, Bell, R., and Sesack, S. R. (2009). Lateral habenula projections to dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 30, 1239–1250. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06924.x.
- Ono, D.**, Honma, S., and Honma, K.-I. (2015). Circadian PER2::LUC rhythms in the olfactory bulb of freely moving mice depend on the suprachiasmatic nucleus but not on behaviour rhythms. *Eur. J. Neurosci.* 42, 3128–3137. doi:10.1111/ejn.13111.
- Orcel, H.**, Albizu, L., Perkovska, S., Durroux, T., Mendre, C., Ansanay, H., Mouillac, B., and Rabié, A. (2009). Differential coupling of the vasopressin V1b receptor through compartmentalization within the plasma membrane. *Mol. Pharmacol.* 75, 637–647. doi:10.1124/mol.108.049031.
- Otsu, Y.**, Lecca, S., Pietrajtis, K., Rousseau, C. V., Marcaggi, P., Dugué, G. P., Mailhes-Hamon, C., Mameli, M., and Diana, M. A. (2018). Functional Principles of Posterior Septal Inputs to the Medial Habenula. *Cell Rep* 22, 693–705. doi:10.1016/j.celrep.2017.12.064.
- Ozburn, A. R.**, Falcon, E., Mukherjee, S., Gillman, A., Arey, R., Spencer, S., and McClung, C. A. (2013). The role of clock in ethanol-related behaviors. *Neuropsychopharmacology* 38, 2393–2400. doi:10.1038/npp.2013.138.

- Ozburn, A. R.**, Falcon, E., Twaddle, A., Nugent, A. L., Gillman, A. G., Spencer, S. M., Arey, R. N., Mukherjee, S., Lyons-Weiler, J., Self, D. W., and McClung, C. A. (2015). Direct regulation of diurnal *Drd3* expression and cocaine reward by NPAS2. *Biol. Psychiatry* 77, 425–433. doi:10.1016/j.biopsych.2014.07.030.
- Ozburn, A. R.**, Larson, E. B., Self, D. W., and McClung, C. A. (2012). Cocaine self-administration behaviors in *Clock Δ 19* mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 223, 169–177. doi:10.1007/s00213-012-2704-2.
- Park, H.**, Rhee, J., Park, K., Han, J.-S., Malinow, R., and Chung, C. (2017). Exposure to Stressors Facilitates Long-Term Synaptic Potentiation in the Lateral Habenula. *J Neurosci* 37, 6021–6030. doi:10.1523/JNEUROSCI.2281-16.2017.
- Partch, C. L.**, Shields, K. F., Thompson, C. L., Selby, C. P., and Sancar, A. (2006). Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10467–10472. doi:10.1073/pnas.0604138103.
- Paul, M. J.**, Indic, P., and Schwartz, W. J. (2011). A role for the habenula in the regulation of locomotor activity cycles. *Eur. J. Neurosci.* 34, 478–488. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07762.x.
- Peirson, S. N.**, Butler, J. N., Duffield, G. E., Takher, S., Sharma, P., and Foster, R. G. (2006). Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 800–807. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.118.
- Perreau-Lenz, S.**, Vengeliene, V., Noori, H. R., Merlo-Pich, E. V., Corsi, M. A., Corti, C., and Spanagel, R. (2012). Inhibition of the casein-kinase-1- ϵ/δ prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology* 37, 2121–2131. doi:10.1038/npp.2012.62.
- Perreau-Lenz, S.**, Zghoul, T., de Fonseca, F. R., Spanagel, R., and Bilbao, A. (2009). Circadian regulation of central ethanol sensitivity by the *mPer2* gene. *Addict Biol* 14, 253–259. doi:10.1111/j.1369-1600.2009.00165.x.
- Pert, C. B.**, Kuhar, M. J., and Snyder, S. H. (1976). Opiate receptor: autoradiographic localization in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3729–3733.
- Petzel, A.**, Bernard, R., Poller, W. C., and Veh, R. W. (2017). Anterior and posterior parts of the rat ventral tegmental area and the rostromedial tegmental nucleus receive topographically distinct afferents from the lateral habenular complex. *J. Comp. Neurol.* 525, 2310–2327. doi:10.1002/cne.24200.
- Peyron, C.**, Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., and Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996–10015.
- Pfeffer, M.**, Korf, H.-W., and Wicht, H. (2018). Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 258, 215–221. doi:10.1016/j.ygcen.2017.05.013.
- Phelps, E. A.**, and LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48, 175–187. doi:10.1016/j.neuron.2005.09.025.
- Pittendrigh, C. S.** (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 16–54. doi:10.1146/annurev.ph.55.030193.000313.
- Pittendrigh, C. S.**, and Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: I. The stability and lability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology ? A* 106, 223–252. doi:10.1007/BF01417856.
- Poller, W. C.**, Bernard, R., Derst, C., Weiss, T., Madai, V. I., and Veh, R. W. (2011). Lateral habenular neurons projecting to reward-processing monoaminergic nuclei express hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated cation channels. *Neuroscience* 193, 205–216. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.07.013.

- Poller, W. C.**, Madai, V. I., Bernard, R., Laube, G., and Veh, R. W. (2013). A glutamatergic projection from the lateral hypothalamus targets VTA-projecting neurons in the lateral habenula of the rat. *Brain Res.* 1507, 45–60. doi:10.1016/j.brainres.2013.01.029.
- Preitner, N.**, Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251–260.
- Provencio, I.**, Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P., and Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 340–345.
- Provencio, I.**, Rodriguez, I. R., Jiang, G., Hayes, W. P., Moreira, E. F., and Rollag, M. D. (2000). A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20, 600–605.
- Pytliak, M.**, Vargová, V., Mechírová, V., and Felšöci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res* 60, 15–25.
- Qu, T.**, Dong, K., Sugioka, K., and Yamadori, T. (1996). Demonstration of direct input from the retina to the lateral habenular nucleus in the albino rat. *Brain Research* 709, 251–258. doi:10.1016/0006-8993(95)01306-7.
- Quina, L. A.**, Tempest, L., Ng, L., Harris, J. A., Ferguson, S., Zhou, T. C., and Turner, E. E. (2015). Efferent pathways of the mouse lateral habenula. *J. Comp. Neurol.* 523, 32–60. doi:10.1002/cne.23662.
- Ralph, M.**, Foster, R., Davis, F., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978. doi:10.1126/science.2305266.
- Raman, I. M.**, Tong, G., and Jahr, C. E. (1996). Beta-adrenergic regulation of synaptic NMDA receptors by cAMP-dependent protein kinase. *Neuron* 16, 415–421.
- Ramón y Cajal, S.** (1911). “CHAPITRE XX - Noyaux internes,” in *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés* (Paris: A. Maloine), 415–420.
- Ray, J. P.**, and Price, J. L. (1990). Postnatal changes in the density and distribution of neurotensin-like immunoreactive fibers in the mediodorsal nucleus of the thalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 292, 269–282. doi:10.1002/cne.902920209.
- Reick, M.**, Garcia, J. A., Dudley, C., and McKnight, S. L. (2001). NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293, 506–509. doi:10.1126/science.1060699.
- Reid, K. J.**, and Abbott, S. M. (2015). Jet Lag and Shift Work Disorder. *Sleep Med Clin* 10, 523–535. doi:10.1016/j.jsmc.2015.08.006.
- Reppert, S. M.**, and Weaver, D. R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 647–676. doi:10.1146/annurev.physiol.63.1.647.
- Reuss, S.**, and Decker, K. (1997). Anterograde tracing of retinohypothalamic afferents with Fluoro-Gold. *Brain Research* 745, 197–204. doi:10.1016/S0006-8993(96)01151-1.
- Ripperger, J. A.**, and Albrecht, U. (2012). “The circadian clock component PERIOD2: From molecular to cerebral functions,” in *The Neurobiology of Circadian Timing Progress in Brain Research.*, ed. M. M. Andries Kalsbeek Till Roenneberg and Russell G. Foster (Elsevier), 233–245. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00014-9.
- Rivera, C.**, Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvoori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K., (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251–255. doi:10.1038/16697.

- Rood, B. D.**, Stott, R. T., You, S., Smith, C. J. W., Woodbury, M. E., and De Vries, G. J. (2013). Site of origin of and sex differences in the vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain. *J. Comp. Neurol.* 521, 2321–2358. doi:10.1002/cne.23288.
- Root, D. H.**, Hoffman, A. F., Good, C. H., Zhang, S., Gigante, E., Lupica, C.R., and Morales, M. (2015). Norepinephrine activates dopamine D4 receptors in the rat lateral habenula. *J. Neurosci.* 35, 3460–3469. doi:10.1523/JNEUROSCI.4525-13.2015.
- Root, D. H.**, Mejias-Aponte, C. A., Qi, J., and Morales, M. (2014a). Role of glutamatergic projections from ventral tegmental area to lateral habenula in aversive conditioning. *J. Neurosci.* 34, 13906–13910. doi:10.1523/JNEUROSCI.2029-14.2014.
- Root, D. H.**, Mejias-Aponte, C. A., Zhang, S., Wang, H.-L., Hoffman, A. F., Lupica, C.R., and Morales, M. (2014b). Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci.* 17, 1543–1551. doi:10.1038/nn.3823.
- Rosenwasser, A. M.**, Fecteau, M. E., and Logan, R. W. (2005). Effects of ethanol intake and ethanol withdrawal on free-running circadian activity rhythms in rats. *Physiology & Behavior* 84, 537–542. doi:10.1016/j.physbeh.2005.01.016.
- Ruan, G.-X.**, Zhang, D.-Q., Zhou, T., Yamazaki, S., and McMahon, D. G. (2006). Circadian organization of the mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9703–9708. doi:10.1073/pnas.0601940103.
- Russo, S. J.**, and Nestler, E. J. (2013). The Brain Reward Circuitry in Mood Disorders. *Nat Rev Neurosci* 14. doi:10.1038/nrn3381.
- Sakamoto, K.**, and Ishida, N. (1998). Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neuroscience Letters* 245, 113–116. doi:10.1016/S0304-3940(98)00189-X.
- Sakhi, K.**, Belle, M. D. C., Gossan, N., Delagrang, P., and Piggins, H. D. (2014a). Daily variation in the electrophysiological activity of mouse medial habenula neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 587–603. doi:10.1113/jphysiol.2013.263319.
- Sakhi, K.**, Wegner, S., Belle, M. D. C., Howarth, M., Delagrang, P., Brown, T. M., and Piggins, H. D. (2014b). Intrinsic and extrinsic cues regulate the daily profile of mouse lateral habenula neuronal activity. *J. Physiol. (Lond.)* 592, 5025–5045. doi:10.1113/jphysiol.2014.280065.
- Salaberry, N. L.**, Mateo, M., and Mendoza, J. (2017). The Clock Gene Rev-Erb α Regulates Methamphetamine Actions on Circadian Timekeeping in the Mouse Brain. *Mol. Neurobiol.* 54, 5327–5334. doi:10.1007/s12035-016-0076-z.
- Salaberry, N. L.**, and Mendoza, J. (2015). Insights into the Role of the Habenular Circadian Clock in Addiction. *Front Psychiatry* 6, 179. doi:10.3389/fpsy.2015.00179.
- Salas, R.**, Baldwin, P., de Biasi, M., and Montague, P. R. (2010). BOLD Responses to Negative Reward Prediction Errors in Human Habenula. *Front Hum Neurosci* 4, 36. doi:10.3389/fnhum.2010.00036.
- Sanchis-Segura, C.**, and Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11, 2–38. doi:10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x.
- Sandu, C.**, Hicks, D., and Felder-Schmittbuhl, M.-P. (2011). Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions. *Eur. J. Neurosci.* 34, 507–516. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07772.x.
- Sartorius, A.**, and Henn, F. A. (2007). Deep brain stimulation of the lateral habenula in treatment resistant major depression. *Med. Hypotheses* 69, 1305–1308. doi:10.1016/j.mehy.2007.03.021.

- Sartorius, A.**, Kiening, K. L., Kirsch, P., von Gall, C. C., Haberkorn, U., Unterberg, A. W., Henn, F. A., and Meyer-Lindenberg, A. (2010). Remission of major depression under deep brain stimulation of the lateral habenula in a therapy-refractory patient. *Biol. Psychiatry* 67, e9–e11. doi:10.1016/j.biopsych.2009.08.027.
- Sato, T. K.**, Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A., and Hogenesch, J.B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 43, 527–537. doi:10.1016/j.neuron.2004.07.018.
- Satoh, K.**, and Fibiger, H. C. (1986). Cholinergic neurons of the laterodorsal tegmental nucleus: Efferent and afferent connections. *The Journal of Comparative Neurology* 253, 277–302. doi:10.1002/cne.902530302.
- Savasta, M.**, Dubois, A., and Scatton, B. (1986). Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. *Brain Research* 375, 291–301. doi:10.1016/0006-8993(86)90749-3.
- Savitz, J. B.**, Bonne, O., Nugent, A. C., Vythilingam, M., Bogers, W., Charney, D. S., and Drevets, W. C. (2011a). Habenula volume in post-traumatic stress disorder measured with high-resolution MRI. *Biol Mood Anxiety Disord* 1, 7. doi:10.1186/2045-5380-1-7.
- Savitz, J. B.**, Nugent, A. C., Bogers, W., Roiser, J. P., Bain, E. E., Neumeister, A., Zarate, C. A., Manji, H. K., Cannon, D. M., Marrett, S., Henn, F., Charney, D. S., and Drevets, W. C. (2011b). Habenula volume in bipolar disorder and major depressive disorder: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Biol. Psychiatry* 69, 336–343. doi:10.1016/j.biopsych.2010.09.027.
- Schade, R.**, Vick, K., Ott, T., Sohr, R., Pfister, C., Bellach, J., Golor, G., and Lemmer, B. (1995). Circadian rhythms of dopamine and cholecystokinin in nucleus accumbens and striatum of rats--influence on dopaminergic stimulation. *Chronobiol. Int.* 12, 87–99.
- Schmidt, E. R. E.**, Brignani, S., Adolfs, Y., Lemstra, S., Demmers, J., Vidaki, M., Donahoo, A.-L.S., Lilleväli, K., Vasar, E., Richards, L. J., Karagogeos, D., Kolk, S. M., and Pasterkamp, R. J. (2014). Subdomain-mediated axon-axon signaling and chemoattraction cooperate to regulate afferent innervation of the lateral habenula. *Neuron* 83, 372–387. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.036.
- Schneider, K.**, Tippmann, S., Spiwoкс-Becker, I., Holthues, H., Wolloscheck, T., Spatkowski, G., Engel, L., Frederiksen, U., and Spessert, R. (2010). Unique clockwork in photoreceptor of rat. *J. Neurochem.* 115, 585–594. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06953.x.
- Schroder, E. A.**, and Esser, K. A. (2013). Circadian rhythms, skeletal muscle molecular clocks, and exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 41, 224–229. doi:10.1097/JES.0b013e3182a58a70.
- Semba, J.**, Toru, M., and Mataga, N. (1984). Twenty-four hour rhythms of norepinephrine and serotonin in nucleus suprachiasmaticus, raphe nuclei, and locus coeruleus in the rat. *Sleep* 7, 211–218.
- Shabel, S. J.**, Proulx, C. D., Piriz, J., and Malinow, R. (2014). Mood regulation. GABA/glutamate co-release controls habenula output and is modified by antidepressant treatment. *Science* 345, 1494–1498. doi:10.1126/science.1250469.
- Shabel, S. J.**, Proulx, C. D., Trias, A., Murphy, R. T., and Malinow, R. (2012). Input to the lateral habenula from the basal ganglia is excitatory, aversive, and suppressed by serotonin. *Neuron* 74, 475–481. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.037.
- Shearman, L. P.**, Jin, X., Lee, C., Reppert, S. M., and Weaver, D. R. (2000a). Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6269–6275.

- Shearman, L. P.**, Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der Horst, G. T., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. (2000b). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013–1019.
- Sheffield, E. B.**, Quick, M. W., and Lester, R. A. (2000). Nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA expression and channel function in medial habenula neurons. *Neuropharmacology* 39, 2591–2603.
- Shi, S.**, Hida, A., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., Yamazaki, S., and Johnson, C. H. (2010). Circadian Clock Gene *Bmal1* Is Not Essential; Functional Replacement with its Paralog, *Bmal2*. *Current Biology* 20, 316–321. doi:10.1016/j.cub.2009.12.034.
- Shieh, K. R.**, Chu, Y. S., and Pan, J. T. (1997). Circadian change of dopaminergic neuron activity: effects of constant light and melatonin. *Neuroreport* 8, 2283–2287.
- Shieh, K.-R.** (2003). Distribution of the rhythm-related genes *rPERIOD1*, *rPERIOD2*, and *rCLOCK*, in the rat brain. *Neuroscience* 118, 831–843.
- Shinoda, K.**, and Tohyama, M. (1987). Analysis of the habenulopetal enkephalinergic system in the rat brain: An immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology* 255, 483–496. doi:10.1002/cne.902550402.
- Shuboni, D. D.**, Cramm, S. L., Yan, L., Ramanathan, C., Cavanaugh, B. L., Nunez, A.A., and Smale, L. (2015). Acute effects of light on the brain and behavior of diurnal *Arvicantis niloticus* and nocturnal *Mus musculus*. *Physiol. Behav.* 138, 75–86. doi:10.1016/j.physbeh.2014.09.006.
- Shumake, J.**, Edwards, E., and Gonzalez-Lima, F. (2003). Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain Res.* 963, 274–281.
- Shumake, J.**, Ilango, A., Scheich, H., Wetzel, W., and Ohl, F. W. (2010). Differential neuromodulation of acquisition and retrieval of avoidance learning by the lateral habenula and ventral tegmental area. *J. Neurosci.* 30, 5876–5883. doi:10.1523/JNEUROSCI.3604-09.2010.
- Silver, R.**, Lehman, M. N., Gibson, M., Gladstone, W. R., and Bittman, E. L. (1990). Dispersed cell suspensions of fetal SCN restore circadian rhythmicity in SCN-lesioned adult hamsters. *Brain Research* 525, 45–58. doi:10.1016/0006-8993(90)91319-C.
- Silver, R.**, LeSauter, J., Tresco, P. A., and Lehman, M. N. (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382, 810–813. doi:10.1038/382810a0.
- Simonneaux, V.**, and Ribelayga, C. (2003). Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. *Pharmacol Rev* 55, 325–395. doi:10.1124/pr.55.2.2.
- Sleipness, E. P.**, Sorg, B. A., and Jansen, H. T. (2007). Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 1129, 34–42. doi:10.1016/j.brainres.2006.10.063.
- Stamatakis, A. M.**, Jennings, J. H., Ung, R. L., Blair, G. A., Weinberg, R. J., Neve, R.L., Boyce, F., Mattis, J., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., and Stuber, G. D. (2013). A unique population of ventral tegmental area neurons inhibits the lateral habenula to promote reward. *Neuron* 80, 1039–1053. doi:10.1016/j.neuron.2013.08.023.
- Stamatakis, A. M.**, and Stuber, G. D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* 15, 1105–1107. doi:10.1038/nn.3145.

- Stamatakis, A. M.**, Swieten, M. V., Basiri, M. L., Blair, G. A., Kantak, P., and Stuber, G. D. (2016). Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward. *J. Neurosci.* 36, 302–311. doi:10.1523/JNEUROSCI.1202-15.2016.
- Stephan, F. K.**, and Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69. doi:10.1073/pnas.69.6.1583.
- Stephenson-Jones, M.**, Floros, O., Robertson, B., and Grillner, S. (2012). Evolutionary conservation of the habenular nuclei and their circuitry controlling the dopamine and 5-hydroxytryptophan (5-HT) systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E164-173. doi:10.1073/pnas.1119348109.
- Stephenson-Jones, M.**, Yu, K., Ahrens, S., Tucciarone, J. M., van Huijstee, A.N., Mejia, L.A., Penzo, M.A., Tai, L.-H., Wilbrecht, L., and Li, B. (2016). A basal ganglia circuit for evaluating action outcomes. *Nature* 539, 289–293. doi:10.1038/nature19845.
- Stoop, R.** (2012). Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. *Neuron* 76, 142–159. doi:10.1016/j.neuron.2012.09.025.
- Stopper, C. M.**, and Floresco, S. B. (2014). What’s better for me? Fundamental role for lateral habenula in promoting subjective decision biases. *Nat Neurosci* 17, 33–35. doi:10.1038/nn.3587.
- Stopper, C. M.**, and Floresco, S. B. (2015). Dopaminergic circuitry and risk/reward decision making: implications for schizophrenia. *Schizophr Bull* 41, 9–14. doi:10.1093/schbul/sbu165.
- Stowie, A. C.**, Amicarella, M. J., Prosser, R. A., and Glass, J. D. (2015a). Chronic cocaine causes long-term alterations in circadian period and photic entrainment in the mouse. *Neuroscience* 284, 171–179. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.08.057.
- Stowie, A. C.**, Prosser, R. A., and Glass, J. D. (2015b). Cocaine modulation of the mammalian circadian clock: potential therapeutic targets. *Ther Targets Neurol Dis* 2, e607. doi:10.14800/ttnd.607.
- Sutherland, R. J.** (1982). The dorsal diencephalic conduction system: a review of the anatomy and functions of the habenular complex. *Neurosci Biobehav Rev* 6, 1–13.
- Takahashi, J. S.** (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* 18, 164–179. doi:10.1038/nrg.2016.150.
- Takahashi, J. S.**, Hong, H.-K., Ko, C. H., and McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775. doi:10.1038/nrg2430.
- Tan, K. R.**, Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., Deisseroth, K., Tye, K. M., and Lüscher, C. (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* 73, 1173–1183. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.015.
- Tavakoli-Nezhad, M.**, and Schwartz, W. J. (2005). c-Fos expression in the brains of behaviorally “split” hamsters in constant light: calling attention to a dorsolateral region of the suprachiasmatic nucleus and the medial division of the lateral habenula. *J. Biol. Rhythms* 20, 419–429. doi:10.1177/0748730405278443.
- Tavakoli-Nezhad, M.**, and Schwartz, W. J. (2006). Hamsters running on time: is the lateral habenula a part of the clock? *Chronobiol. Int.* 23, 217–224. doi:10.1080/07420520500521947.
- Taylor, S. R.**, Badurek, S., Dileone, R. J., Nashmi, R., Minichiello, L., and Picciotto, M. R. (2014). GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 522, 3308–3334. doi:10.1002/cne.23603.

- Tchenio, A.**, Valentinova, K., and Mameli, M. (2016). Can the Lateral Habenula Crack the Serotonin Code? *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 8. doi:10.3389/fnsyn.2016.00034.
- Terenzi, M. G.**, Guimarães, F. S., and Prado, W. A. (1990). Antinociception induced by stimulation of the habenular complex of the rat. *Brain Res.* 524, 213–218.
- Terenzi, M. G.**, and Prado, W. A. (1990). Antinociception elicited by electrical or chemical stimulation of the rat habenular complex and its sensitivity to systemic antagonists. *Brain Res.* 535, 18–24.
- Torres, M.**, Becquet, D., Blanchard, M.-P., Guillen, S., Boyer, B., Moreno, M., Franc, J.-L., and François-Bellan, A.-M. (2017). Paraspeckles as rhythmic nuclear mRNA anchorages responsible for circadian gene expression. *Nucleus* 8, 249–254. doi:10.1080/19491034.2016.1277304.
- Torres, M.**, Becquet, D., Franc, J.-L., and François-Bellan, A.-M. (2018). Circadian processes in the RNA life cycle. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, e1467. doi:10.1002/wrna.1467.
- Tosini, G.**, and Menaker, M. (1996). Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 272, 419–421.
- Tosini, G.**, and Menaker, M. (1998). The tau mutation affects temperature compensation of hamster retinal circadian oscillators. *Neuroreport* 9, 1001–1005.
- Traynelis, S. F.**, Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496. doi:10.1124/pr.109.002451.
- Triqueneaux, G.**, Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M. P., Safi, R., Takahashi, J. S., Delaunay, F., and Laudet, V. (2004). The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 585–608. doi:10.1677/jme.1.01554.
- Tsujino, N.**, and Sakurai, T. (2013). Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci* 7, 28. doi:10.3389/fnbeh.2013.00028.
- Ueyama, T.**, Krout, K. E., Nguyen, X. V., Karpitskiy, V., Kollert, A., Mettenleiter, T. C., and Loewy, A. D. (1999). Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nature Neuroscience* 2, 1051.
- Valentinova, K.**, and Mameli, M. (2016). mGluR-LTD at Excitatory and Inhibitory Synapses in the Lateral Habenula Tunes Neuronal Output. *Cell Rep* 16, 2298–2307. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.064.
- Valjakka, A.**, Vartiainen, J., Tuomisto, L., Tuomisto, J. T., Olkkonen, H., and Airaksinen, M. M. (1998). The fasciculus retroflexus controls the integrity of REM sleep by supporting the generation of hippocampal theta rhythm and rapid eye movements in rats. *Brain Research Bulletin* 47, 171–184. doi:10.1016/S0361-9230(98)00006-9.
- Vandewalle, G.**, Collignon, O., Hull, J. T., Daneault, V., Albouy, G., Lepore, F., Phillips, C., Doyon, J., Czeisler, C. A., Dumont, M., Lockley, S. W., and Carrier, J. (2013). Blue light stimulates cognitive brain activity in visually blind individuals. *J Cogn Neurosci* 25, 2072–2085. doi:10.1162/jocn_a_00450.
- Vanselow, K.**, and Kramer, A. (2007). Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 167–176. doi:10.1101/sqb.2007.72.036.
- Velasquez, K. M.**, Molfese, D. L., and Salas, R. (2014). The role of the habenula in drug addiction. *Front Hum Neurosci* 8, 174. doi:10.3389/fnhum.2014.00174.
- Vertes, R. P.**, and Linley, S. B. (2008). “Efferent and afferent connections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat,” in *Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects* (J.M. Monti, S.R. Pandi-Perumal, B.L. Jacobs, D.J. Nutt), 69–102.

- Vertongen, P.**, Schiffmann, S. N., Gourlet, P., and Robberecht, P. (1997). Autoradiographic visualization of the receptor subclasses for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in rat brain. *Peptides* 18, 1547–1554.
- Vincent, S. R.**, McIntosh, C. H., Buchan, A. M., and Brown, J. C. (1985). Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J. Comp. Neurol.* 238, 169–186. doi:10.1002/cne.902380205.
- Virshup, D. M.**, Eide, E. J., Forger, D. B., Gallego, M., and Harnish, E. V. (2007). Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 413–420. doi:10.1101/sqb.2007.72.048.
- Viswanath, H.**, Carter, A. Q., Baldwin, P. R., Molfese, D. L., and Salas, R. (2013). The medial habenula: still neglected. *Front Hum Neurosci* 7, 931. doi:10.3389/fnhum.2013.00931.
- Viswanathan, N.**, Weaver, D. R., Reppert, S. M., and Davis, F. C. (1994). Entrainment of the fetal hamster circadian pacemaker by prenatal injections of the dopamine agonist SKF 38393. *J. Neurosci.* 14, 5393–5398.
- Vitaterna, M. H.**, King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P.L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., and Takahashi, J. S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719–725.
- Vizuete, M. L.**, Venero, J. L., Traiffort, E., Vargas, C., Machado, A., and Cano, J. (1997). Expression of 5-HT7 receptor mRNA in rat brain during postnatal development. *Neurosci. Lett.* 227, 53–56.
- von Linné, C.** (1751). *Philosophia Botanica*. Stockholm & Amsterdam.
- Wagner, F.**, French, L., and Veh, R. W. (2016). Transcriptomic-anatomic analysis of the mouse habenula uncovers a high molecular heterogeneity among neurons in the lateral complex, while gene expression in the medial complex largely obeys subnuclear boundaries. *Brain Struct Funct* 221, 39–58. doi:10.1007/s00429-014-0891-9.
- Wagner, F.**, Stroh, T., and Veh, R. W. (2014). Correlating habenular subnuclei in rat and mouse by using topographic, morphological, and cytochemical criteria. *J. Comp. Neurol.* 522, 2650–2662. doi:10.1002/cne.23554.
- Wagner, F.**, Weiss, T., and Veh, R. W. (2017). Electrophysiological properties of neurons and synapses in the lateral habenular complex (LHb). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 162, 38–45. doi:10.1016/j.pbb.2017.07.008.
- Wang, D.-G.**, Gong, N., Luo, B., and Xu, T.-L. (2006). Absence of GABA type A signaling in adult medial habenular neurons. *Neuroscience* 141, 133–141. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.03.045.
- Wechsler, L. R.**, Savaki, H. E., and Sokoloff, L. (1979). Effects of d- and l-amphetamine on local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *J. Neurochem.* 32, 15–22.
- Weiss, T.**, and Veh, R. W. (2011). Morphological and electrophysiological characteristics of neurons within identified subnuclei of the lateral habenula in rat brain slices. *Neuroscience* 172, 74–93. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.10.047.
- Welsh, D. K.**, Logothetis, D. E., Meister, M., and Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697–706.
- Welsh, D. K.**, Takahashi, J. S., and Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135919.
- Willner, P.**, Scheel-Krüger, J., and Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev* 37, 2331–2371. doi:10.1016/j.neubiorev.2012.12.007.

- Winter, C.**, Vollmayr, B., Djodari-Irani, A., Klein, J., and Sartorius, A. (2011). Pharmacological inhibition of the lateral habenula improves depressive-like behavior in an animal model of treatment resistant depression. *Behav. Brain Res.* 216, 463–465. doi:10.1016/j.bbr.2010.07.034.
- Wise, R. A.** (1998). Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51, 13–22.
- Wong, J. C. Y.**, Smyllie, N. J., Banks, G. T., Potheary, C. A., Barnard, A. R., Maywood, E.S., Jagannath, A., Hughes, S., van der Horst, G.T.J., MacLaren, R.E., Hankins, M.W., Hastings, M.H., Nolan, P.M., Foster, R.G., and Peirson, S.N. (2018). Differential roles for cryptochromes in the mammalian retinal clock. *FASEB J.*, fj201701165RR. doi:10.1096/fj.201701165RR.
- Wright, D. E.**, Seroogy, K. B., Lundgren, K. H., Davis, B. M., and Jennes, L. (1995). Comparative localization of serotonin1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 351, 357–373. doi:10.1002/cne.903510304.
- Wyse, C. A.**, and Coogan, A. N. (2010). Impact of aging on diurnal expression patterns of CLOCK and BMAL1 in the mouse brain. *Brain Research* 1337, 21–31. doi:10.1016/j.brainres.2010.03.113.
- Xie, G.**, Zuo, W., Wu, L., Li, W., Wu, W., Bekker, A., and Ye, J.-H. (2016). Serotonin modulates glutamatergic transmission to neurons in the lateral habenula. *Sci Rep* 6, 23798. doi:10.1038/srep23798.
- Yadid, G.**, Gispan, I., and Lax, E. (2013). Lateral habenula deep brain stimulation for personalized treatment of drug addiction. *Front Hum Neurosci* 7, 806. doi:10.3389/fnhum.2013.00806.
- Yamaguchi, T.**, Danjo, T., Pastan, I., Hikida, T., and Nakanishi, S. (2013a). Distinct roles of segregated transmission of the septo-habenular pathway in anxiety and fear. *Neuron* 78, 537–544. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.035.
- Yamaguchi, Y.**, Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.-M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., Dong, X., Tsujimoto, G., Okuno, Y., Doi, M., and Okamura, H. (2013b). Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag. *Science* 342, 85–90. doi:10.1126/science.1238599.
- Yang, L.-M.**, Hu, B., Xia, Y.-H., Zhang, B.-L., and Zhao, H. (2008). Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus. *Behav. Brain Res.* 188, 84–90. doi:10.1016/j.bbr.2007.10.022.
- Yang, Y.**, Wang, H., Hu, J., and Hu, H. (2018). Lateral habenula in the pathophysiology of depression. *Curr. Opin. Neurobiol.* 48, 90–96. doi:10.1016/j.conb.2017.10.024.
- Ye, R.**, Selby, C. P., Chiou, Y.-Y., Ozkan-Dagliyan, I., Gaddameedhi, S., and Sancar, A. (2014). Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* 28, 1989–1998. doi:10.1101/gad.249417.114.
- Yin, L.**, Wang, J., Klein, P. S., and Lazar, M. A. (2006). Nuclear receptor Rev-erbalpha is a critical lithium-sensitive component of the circadian clock. *Science* 311, 1002–1005. doi:10.1126/science.1121613.
- Zahm, D. S.** (2006). The evolving theory of basal forebrain functional-anatomical “macrosystems.” *Neurosci Biobehav Rev* 30, 148–172. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.06.003.
- Zahm, D. S.**, and Root, D. H. (2017). Review of the cytology and connections of the lateral habenula, an avatar of adaptive behaving. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 162, 3–21. doi:10.1016/j.pbb.2017.06.004.
- Zhang, C.**, Truong, K. K., and Zhou, Q.-Y. (2009). Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS ONE* 4, e7151. doi:10.1371/journal.pone.0007151.

- Zhang, C.-X., Zhang, H., Xu, H.-Y., Li, M.-X., and Wang, S. (2013). The lateral habenula is a common target of cocaine and dexamethasone. *Neurosci. Lett.* 555, 12–17. doi:10.1016/j.neulet.2013.09.019.
- Zhang, L., Hernández, V. S., Swinny, J. D., Verma, A. K., Giesecke, T., Emery, A. C., Mutig, K., Garcia-Segura, L. M., and Eiden, L. E. (2018). A GABAergic cell type in the lateral habenula links hypothalamic homeostatic and midbrain motivation circuits with sex steroid signaling. *Transl Psychiatry* 8, 50. doi:10.1038/s41398-018-0099-5.
- Zhang, L., Hernández, V. S., Vázquez-Juárez, E., Chay, F. K., and Barrio, R. A. (2016). Thirst Is Associated with Suppression of Habenula Output and Active Stress Coping: Is there a Role for a Non-canonical Vasopressin-Glutamate Pathway? *Front. Neural Circuits*, 13. doi:10.3389/fncir.2016.00013.
- Zhao, H., and Rusak, B. (2005). Circadian firing-rate rhythms and light responses of rat habenular nucleus neurons in vivo and in vitro. *Neuroscience* 132, 519–528. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.01.012.
- Zhao, H., Zhang, B.-L., Yang, S.-J., and Rusak, B. (2015a). The role of lateral habenula-dorsal raphe nucleus circuits in higher brain functions and psychiatric illness. *Behav. Brain Res.* 277, 89–98. doi:10.1016/j.bbr.2014.09.016.
- Zhao, Z., Xu, H., Liu, Y., Mu, L., Xiao, J., and Zhao, H. (2015b). Diurnal Expression of the Per2 Gene and Protein in the Lateral Habenular Nucleus. *Int J Mol Sci* 16, 16740–16749. doi:10.3390/ijms160816740.
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z. S., Eichele, G., Bradley, A., and Lee, C. C. (2001). Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* 105, 683–694.
- Zheng, B., Larkin, D. W., Albrecht, U., Sun, Z. S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C. C., and Bradley, A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 400, 169–173. doi:10.1038/22118.
- Zou, J., Jiang, J. Y., and Yang, J. J. (2017). Molecular Basis for Modulation of Metabotropic Glutamate Receptors and Their Drug Actions by Extracellular Ca²⁺. *Int J Mol Sci* 18. doi:10.3390/ijms18030672.
- Zuo, W., Chen, L., Wang, L., and Ye, J.-H. (2013). Cocaine facilitates glutamatergic transmission and activates lateral habenular neurons. *Neuropharmacology* 70, 180–189. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.01.008.
- Zuo, W., Zhang, Y., Xie, G., Gregor, D., Bekker, A., and Ye, J.-H. (2016). Serotonin stimulates lateral habenula via activation of the post-synaptic serotonin 2/3 receptors and transient receptor potential channels. *Neuropharmacology* 101, 449–459. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.012.

Caractérisation moléculaire et pharmacologique de l'horloge circadienne située dans l'habénula

Résumé

L'habénula (Hb) est une petite structure cérébrale impliquée dans le contrôle des monoamines dont l'horloge circadienne est peu caractérisée. Ces travaux ont permis de prouver que l'Hb exprimait des gènes horloges en condition constante et qu'une déficience dans ces gènes altérait son horloge. De plus, l'Hb possède une horloge robuste qui oscille ex vivo sans l'entraînement du noyau suprachiasmatique (SCN) et même en présence de lumière constante qui affecte l'activité locomotrice et diminue l'amplitude des oscillations du SCN. Cependant, les oscillateurs de l'Hb se retrouvent désynchronisés en obscurité constante. Enfin, nous avons mis en évidence de potentiels synchronisateurs : quatre molécules affectent l'horloge dans l'Hb (dopamine, noradrénaline, vasopressine et orexine). Cette caractérisation de l'Hb pourra amener dans le futur à mieux comprendre son implication dans des maladies psychiatriques mêlant rythmes et monoamines comme la dépression ou l'addiction.

Habénula ; rythme circadien ; bioluminescence ; horloge ; souris

Résumé en anglais

The habenula (Hb) is a key nucleus for monoamine control with circadian properties. However, its clockwork is not fully characterized. In this thesis, we confirm that the Hb harbors a molecular circadian clock which can be disrupted by mutations of clock genes. Furthermore, we showed that the Hb clock was still rhythmic even without the suprachiasmatic nucleus (SCN) or in constant light condition which disrupts locomotor activity rhythms and SCN oscillations. However, Hb oscillators (in the caudal and rostral part) are uncoupled in constant darkness condition. In the last part of the study, we determined the potential internal synchronizers. The results indicated that at least four molecules (dopamine, noradrenaline, vasopressin and orexin) affect the Hb circadian properties (period, amplitude). The characterization of the Hb clock will give us a better understanding of its involvement in psychiatric diseases combining rhythms and monoamine alteration like depression or addiction.

Habenula; circadian rhythms; bioluminescence; clock; mouse