



HAL
open science

Dynamiques temporelles et spatiales des signaux calciques cellulaires dans le noyau suprachiasmatique in vivo

Lama El Cheikh Hussein

► **To cite this version:**

Lama El Cheikh Hussein. Dynamiques temporelles et spatiales des signaux calciques cellulaires dans le noyau suprachiasmatique in vivo. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT076 . tel-03340305

HAL Id: tel-03340305

<https://theses.hal.science/tel-03340305>

Submitted on 10 Sep 2021

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En NEUROSCIENCES

École doctorale des Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé

Institut de Génomique Fonctionnelle
Université Montpellier, CNRS UMR5203, INSERM U1191

DYNAMIQUES TEMPORELLES ET SPATIALES DES SIGNAUX CALCIQUES CELLULAIRES DANS LES NOYAUX SUPRACHIASMATIQUES IN VIVO.

Présentée par Lama EL CHEIKH HUSSEIN
Le 09 Décembre 2020

Sous la direction de Dr Xavier BONNEFONT

Devant le jury composé de

Pr. Michel VIGNES, Professeur, Montpellier

Dr. Anne-Marie FRANCOIS-BELLAN, Chargée de recherche, Marseille

Pr. Anne DUITTOZ, Professeur, Tours

Dr. Patrice MOLLARD, Directeur de recherche, Montpellier

Dr. Xavier BONNEFONT, Chargé de recherche, Montpellier

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Invité

Directeur de Thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

À mes parents, à mes frères...

De quoi rêviez-vous quand vous étiez enfant,

et cela s'est-il réalisé ?

Je voulais être un grand savant, mais je n'étais pas très bon à l'école-
disons d'un niveau moyen. J'étais un peu brouillon et j'écrivais très
mal. Heureusement, j'avais des bons amis. Nous parlions de tout, de
l'origine de l'Univers par exemple. C'est ainsi qu'a commencé ma
recherche, et je suis heureux qu'elle ait abouti.

Stephen Hawking.

REMERCIEMENTS

À l'image d'un générique d'un film, je souhaite exprimer tous mes remerciements et ma reconnaissance à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur aide dans la réalisation de cette thèse.

Je remercie vivement tous les membres du jury qui me font l'honneur de bien vouloir juger cette thèse :

- Mme. **Anne-Marie Francois-Bellan** et Mme. **Anne Duittoz**, pour le temps qu'elles ont consacré à examiner et juger ce travail en tant que rapporteurs, qu'elles trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.
- M. **Michel Vignes** pour avoir accepté de présider le jury et pour l'intérêt qu'il porte pour ce travail.

Un jour je me suis rendu compte que je ne disais jamais « je vais au boulot » mais toujours « je vais au labo » ! Parce que moi aussi, j'ai eu la chance d'avoir des bons amis et de baigner dans un bon environnement où on n'a pas l'impression de travailler, et se lever le matin ou rester la nuit et le weekend n'est (presque) pas une corvée.

D'abord je souhaite sincèrement remercier M. Patrice Mollard pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et offert l'opportunité de faire cette thèse, et ce, dans un environnement de travail de grande qualité. **Patrice**, le grand scientifique que tu es, ta passion, tes ambitions et tes histoires n'ont pas cessé de m'émerveiller.

Et bien sûr j'ai eu la chance d'avoir Xavier : mon chef préféré. **Xavier**, je ne te remercierai jamais assez. Merci pour ta pédagogie, ta bienveillance et ta patience. Je suis fière de la personne que je suis devenue aujourd'hui, et c'est en grande partie grâce à toi. Tu sais être très présent tout en laissant libre ; épauler, encourager et soutenir sans forcer ni freiner ; toujours disponible et à l'écoute, tu t'investis sans compter pour valoriser le meilleur de chacun. Nos discussions étaient, et sont toujours, mes moments favoris. Je remercie le (merveilleux) scientifique et la personne que tu es. Dans mon histoire, tu es le bon ami que je souhaite à chacun d'avoir. Travailler avec toi fut un réel plaisir. Merci.

Je voudrais remercier tout particulièrement mon équipe, de sa configuration 2016 à 2021.

Un énorme merci à **Pierre**, sans qui la majorité des analyses n'aurait pas été possible. Ce travail n'aurait jamais abouti sans ton aide si précieuse (merci Pierrot !). Je remercie tout spécialement **Anne** pour sa présence immuable et serviable, son expertise et nos discussions qui m'ont beaucoup appris (tant professionnellement qu'humainement). **Chrystel**, je te remercie pour tes conseils (tu as toujours une solution pour tout !), ton dynamisme, ta joie et ta bonne humeur. Merci à **Evelyne** pour son aide sur les manips (comme pour les idées d'itinéraires de rando !). Merci **Anthony** d'être un si bon colocataire de bureau (et on sait tous que ce n'était pas gagné !). Merci aux anciens, et aux moins anciens, de l'équipe (**Ségolène, Ombeline, Pauline, Matan, Marie, Agnès et Cassandre**) d'avoir été présents à un moment de ma thèse.

Au centre de cette thèse, il y a bien sûr eu ma chère **Yasmine**. Deux thésardes qui commencent et terminent pratiquement en même temps, ce n'était pas toujours facile, mais jusqu'au bout on a formé une équipe de choc. Les mots ne traduiront jamais la force de l'amitié qui nous unit...alors je rajouterai juste...que ça dure !

Un merci spécial (tout comme eux !) à **Amélie** et **Yann** pour le soutien important que vous avez été et pour les bons moments passés ensemble.

Merci à l'Institut de Génomique Fonctionnelle et aux services communs. Je tiens à remercier particulièrement **Muriel, Sylvain, Elodie**, les **Eric, Robert, Manu** et **Akli** pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée. Un grand merci à toutes les personnes que j'ai croisées et aux amitiés que j'ai pu créer (**Victor, Carmen, Anne Chabannes, Dom**, et tant d'autres...).

Un grand merci à mes amis, **Sabrina** et **Hamouda**, d'avoir toujours été présents pour moi, pour m'avoir tant écoutée et tant encouragée.

Je voudrais enfin, et surtout, remercier mes parents, mes plus grands fans ! Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi, sans vous tout ceci n'aurait pas été possible. Vous m'avez supporté dans tous les sens du terme (presque depuis ma naissance !), merci pour votre soutien, merci de votre confiance, de votre amour et d'être toujours là pour moi. Je remercie mes frères, **Nasser** et **Nour**, mes meilleurs amis pour la vie. Je vous aime. **Gavin**, ta présence est si précieuse pour moi. Merci de m'avoir soutenue et de continuer à me soutenir. Je remercie ma **grande famille au Liban** pour leurs encouragements et leur soutien sans faille.

AVANT-PROPOS

Je commence la rédaction de cette thèse, le 20 mars 2020, exactement une semaine après que la France entière soit confinée à cause de la crise sanitaire Covid-19. Les jours se suivent dans mon petit appartement, assise jour comme nuit devant l'écran de mon ordinateur. Je commence à perdre la notion du temps, je n'arrête pas de grignoter, je suis fatiguée, comme si mon corps avait perdu ses repères chronologiques. Mes **rythmes biologiques** sont-ils déréglés ? Je me pose la question. L'ironie du destin, 4 ans après avoir débuté ce travail de recherche sur **l'horloge biologique** je me rends compte à quel point notre travail, jugé très fondamental et parfois loin de la réalité est proche de chacun d'entre nous. Apparue dans le Monde : « La crise du Covid-19 nous rappelle le caractère vital de la recherche scientifique et la nécessité d'investir massivement pour le long terme ». Cette pandémie montre que l'effort scientifique est essentiel pour répondre rapidement à une crise sanitaire émergente. Mais il l'est tout autant pour répondre aux crises environnementales, climatiques ou sociales dont les conséquences pèsent de plus en plus sur nos sociétés. Nous vivons aujourd'hui dans des sociétés où la vie nous a conduits à nous emparer du monde pour le façonner selon nos désirs. Avec l'introduction des lumières artificielles, la révolution digitale, les commerces ouverts 24h/24h tout est à portée de mains quelle que soit l'heure et participe à bousculer nos rythmes naturels. Toutes les bonnes habitudes, comme se coucher à une heure raisonnable, éteindre les écrans le soir, ou bien manger à des heures fixes sont considérées aujourd'hui comme « old-fashioned ». Et cela a un coût sur notre santé physique et mentale.

L'évolution nous a permis de nous adapter aux variations journalières prévisibles qui nous entourent (intensité lumineuse, température...) en calant nos fonctionnements internes sur les modifications de notre environnement. Concrètement, presque toutes les fonctions de l'organisme sont soumises au **rythme « circadien »**, pour exprimer le fait qu'il se manifeste sur une période proche de 24 heures tels que les rythmes bien connus de température corporelle, de certaines hormones (mélatonine, cortisol, etc.) ou l'alternance veille/sommeil. Ces rythmes sont pour nous une évidence, nous ne pensons à leur existence que lorsqu'ils sont perturbés ! La rythmicité circadienne est une composante essentielle de l'adaptation des êtres vivants sur le cycle jour-nuit de 24 heures. Quand ces rythmes sont déréglés, principalement à cause de notre mode de vie inadapté au cycle jour-nuit terrestre, les effets sur la santé sont parfois graves : insomnie, fatigue, troubles de l'humeur, obésité et cancer...

Mes rythmes biologiques sont-ils déréglés ? probablement oui ! Ainsi que ceux des pompiers, chauffeurs routiers, des policiers, des infirmiers, travailleurs de nuit, des addicts aux jeux vidéo... La question essentielle qui surgit aujourd'hui est celle de savoir si de nouvelles recherches et technologies peuvent nous aider à remédier à la déconnexion entre le cycle jour-nuit du corps et les rythmes de la vie moderne. Pour répondre à cette question, nous devons d'abord faire face à des défis de manque de connaissances sur certains aspects du fonctionnement de l'horloge biologique.

RESUME

Les travaux de ma thèse montrent la possibilité d'observer, pour la première fois, l'activité des réseaux cellulaires au sein du Noyau Suprachiasmaticus (NSC) de l'hypothalamus au plus profond du cerveau de souris éveillées et non-contraintes, sans stress ni douleur. Nous utilisons ici un microscope de fluorescence miniaturisé au point de pouvoir être fixé directement sur la tête d'une souris, et ainsi permettre de procéder à des enregistrements optiques *in vivo*. Cette première approche d'imagerie cellulaire longitudinale des neurones horloges *in vivo* révèle des nouvelles caractéristiques du fonctionnement de l'horloge chez la souris adulte en conditions physiologique et perturbées simulant des situations de dérégulation circadienne.

Nous avons étudié les différentes dynamiques calciques du NSC au niveau cellulaire. Les cellules du NSC au sein du réseau natif *in vivo* présentent des variations lentes du Ca^{2+} cytosolique (ou « CCR » pour Circadian Calcium Rhythm), sur plusieurs cycles jour-nuit. Ces variations lentes sont coordonnées, persistent en condition de libre-cours et sont robustes faces aux perturbations environnementale (Jetlag) et génétique (Souris *Cry*^{-/-}). De plus, ce travail met en évidence l'existence de transitoires calciques rapides au sein des NSC de la souris adulte. Les variations rapides du Ca^{2+} cytosolique sont, elles aussi, régulées de façon journalière, coordonnées au sein du même animal et robuste face aux perturbations. De façon très intéressante, les cellules présentent des transitoires synchrones et forment des clusters d'activité. Le clustering est une propriété émergente du NSC et se produit tout au long du cycle jour-nuit. Un codage spatio-temporel calcique complexe au sein du NSC *in vivo* est donc possible.

Le pacemaker circadien est doté d'une activité calcique cellulaire rapide imbriquée dans le « CCR », révélant une coordination intercellulaire sur plusieurs échelles de temps dans le NSC *in vivo*.

Mots clés

Rythmes circadiens, noyaux suprachiasmaticus, réseaux neuronaux, imagerie *in vivo*, activité calcique, Jetlag, souris.

Laboratoire de rattachement

Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF) « Réseaux et rythmes dans les glandes endocrines »
Univ. Montpellier, CNRS, INSERM
141, rue de la cardonille
34094 Montpellier Cedex 05 – France

Directeur : Xavier Bonnefont

.....	I
REMERCIEMENTS	IV
AVANT-PROPOS	VI
RESUME	VII
LISTE DES FIGURES	11
INTRODUCTION	14
I. PREMIERE PARTIE : LE SYSTEME ENDOGENE DE MESURE DE TEMPS	15
I.1 / INTRODUCTION GENERALE.....	16
I.1.A / <i>Physiologie en harmonie avec la nature ?</i>	16
I.1.B / <i>Bref historique sur la découverte de l'horloge biologique circadienne</i>	19
I.1.C / <i>Entraînement de l'horloge biologique circadienne</i>	21
I.1.D / <i>Les avantages (et désavantages !) de l'horloge circadienne</i>	23
I.2 / RYTHME CIRCADIEN.....	24
I.2.A / <i>L'horloge moléculaire : un mécanisme complexe</i>	24
I.2.A.1 / <i>Une boucle principale</i>	24
I.2.A.2 / <i>Une boucle secondaire et des mécanismes de régulation</i>	26
I.2.B / <i>Les Noyaux suprachiasmatiques (NSC) : horloge centrale des mammifères</i>	29
I.2.B.1 / <i>Bref historique sur la découverte de l'horloge centrale</i>	29
I.2.B.2 / <i>Fonctionnement de l'horloge centrale au niveau tissulaire</i>	32
I.2.B.2.a / <i>Anatomie du NSC</i>	32
I.2.B.2.b / <i>Entraînement de l'horloge centrale par la lumière</i>	33
I.2.B.2.c / <i>Complexité anatomo-fonctionnelle du NSC</i>	36
I.2.B.3 / <i>Fonctionnement de l'horloge centrale au niveau cellulaire</i>	37
I.2.B.3.a / <i>Oscillateurs autonomes : fonctionnement circadien endogène</i>	37
I.2.B.3.b / <i>La synchronisation inter-neuronale au sein du NSC : robustesse et précision du pacemaker central</i>	40
I.3 / CONCLUSION...DE LA PREMIERE PARTIE.....	44
II. DEUXIEME PARTIE : VOYAGER AU CŒUR DU CERVEAU POUR ETUDIER LES RESEAUX NEURONAUX IN VIVO	46
II.1 / NEUROSCIENCES ET TECHNOLOGIE : INDISSOCIABLES.....	47
II.2 / IMAGERIE LONGITUDINALE DE NEURONES IN VIVO EN PROFONDEUR CHEZ L'ANIMAL EVEILLE.....	49
II.2.A / <i>Signalisation calcique neuronale</i>	49
II.2.B / <i>Enregistrer l'activité des neurones avec des indicateurs codés génétiquement : les indicateurs calciques</i>	51
II.2.C / <i>Imagerie des zones profondes du cerveau</i>	51
II.2.C.1 / <i>Outils optiques pour l'imagerie de fluorescence de neurones in vivo en profondeur</i>	51
II.2.C.2 / <i>Imagerie longitudinale de neurones in vivo chez l'animal conscient</i>	53
II.2.C.2.a / <i>Microscope classique : imagerie en configuration « tête fixée »</i>	53
II.2.C.2.b / <i>Miniscopes</i>	54
II.3 / CONCLUSION...DE LA DEUXIEME PARTIE.....	55
III. PROBLEMATIQUE	56
IV. MATERIELS ET METHODES	60
IV.1 / OPERATIONS CHIRURGICALES.....	61
IV.1.A / <i>Anesthésie</i>	61
IV.1.B / <i>Injection intracérébrale de différents vecteurs viraux</i>	61
IV.1.B.1 / <i>Mise au point</i>	62
IV.1.B.1.a / <i>Stéréotaxie</i>	62
IV.1.B.1.b / <i>Détermination des coordonnées stéréotaxiques des NSC</i>	63

IV.1.B.1.c / Infections virales : détermination de la capacité et la qualité d'infection de trois sérotypes différents de virus adéno-associés (AAV)	64
IV.1.B.2 / Expressions des sondes calciques au niveau du NSC	68
IV.1.C / Implantation de lentilles GRIN	69
IV.1.D / Fixation d'une base d'accueil	71
IV.2 / IMAGERIE CALCIQUE : SOURIS VIGILE	71
IV.2.A / Entraînement et habitude des animaux	71
IV.2.B / Etat physiologique de l'animal	72
IV.2.C / Conditions expérimentales et protocoles d'imagerie calcique	73
IV.2.D / Examen post-mortem : traçage et emplacement de la lentille GRIN	74
IV.3 / DOSAGES HORMONAUX	74
IV.3.A / Prélèvements de sang	74
IV.3.B / ELISA GH, CORT	74
IV.4 / IMMUNOFLUORESCENCE	77
IV.4.A / Immunofluorescence sur coupe	77
IV.5 / ANALYSE	79
IV.5.A / Analyse de l'imagerie calcique	79
IV.5.B / Traitement et analyse des données	79
IV.5.C / Rythmicité et calculs de phase des signaux journaliers	80
RESULTATS	82
CHAPITRE 1 : COORDINATION DU RYTHME CIRCADIEN DU CALCIUM (CCR) CELLULAIRE IN VIVO.	83
CHAPITRE 2 : VARIATION JOURNALIERE DE L'ACTIVITE CALCIQUE RAPIDE DANS LES CELLULES DU NSC IN VIVO.	99
Annexe chapitre 2 : Lumière et transitoires calciques	111
CHAPITRE 3 : EVIDENCE DE FOYERS DE CO-ACTIVITE CELLULAIRE RAPIDE SYNCHRONE DANS LES NSC IN VIVO	113
CONCLUSION	134
PUBLICATIONS	135
BIBLIOGRAPHIE	153

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Rythme journalier des fleurs d'Arnica (Arnica montana).</i>	19
<i>Figure 2 : L'actogramme, une représentation de l'activité locomotrice.</i>	20
<i>Figure 3 : La courbe de réponse de phase.</i>	22
<i>Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire de l'horloge : boucle de rétroaction principale.</i>	25
<i>Figure 5 : Rouage secondaire du mécanisme moléculaire de l'horloge.</i>	26
<i>Figure 6 : Oscillations des fibroblastes en cultures.</i>	28
<i>Figure 7 : Localisation des noyaux suprachiasmatiques chez une souris.</i>	30
<i>Figure 8 : Oscillations d'explants de tissus périphériques.</i>	31
<i>Figure 9 : Représentation schématique simplifiée de l'organisation anatomo-chimique des NSC.</i>	33
<i>Figure 10 : Schéma de la transmission de l'information lumineuse de la rétine aux NSC.</i>	35
<i>Figure 11 : Les deux sous parties Shell et Core du NSC sont deux oscillateurs indépendants.</i>	36
<i>Figure 12 : Le fonctionnement circadien endogène est une propriété intrinsèque du NSC.</i>	39
<i>Figure 13 : Désynchronisation des fibroblastes en cultures.</i>	40
<i>Figure 14 : Les communications intercellulaires au sein du NSC assurent la robustesse contre des mutations de l'horloge.</i>	42
<i>Figure 15 : La communication intercellulaire au sein du NSC : robustesse et précision du pacemaker circadien.</i>	42
<i>Figure 16 : Schéma du système d'imagerie en configuration « tête-fixée ».</i>	53
<i>Figure 17 : Système d'imagerie en configuration « freely moving ».</i>	54
<i>Figure 18 : Spécificité topologique des rythmes circadiens du calcium.</i>	58
<i>Figure 19 : Coupes coronales du cerveau au niveau du NSC.</i>	63
<i>Figure 20 : Coupes coronales des cerveaux infectés par l'AAV5, AAV8 et AAV9 au niveau des NSC.</i>	65
<i>Figure 21 : Coupes des cerveaux infectés par l'AAV5, AAV8 et AAV9 au niveau des NSC.</i>	66
<i>Figure 22 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 1^{ère} étape.</i>	68
<i>Figure 23 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 2^{ème} étape.</i>	69
<i>Figure 24 : Système d'implantation de lentilles GRIN.</i>	70
<i>Figure 25 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 3^{ème} étape.</i>	71
<i>Figure 26 : Contrôle de la sécrétion de la corticostérone.</i>	72
<i>Figure 27 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 4^{ème} étape.</i>	73
<i>Figure 28 : Imagerie calcique cellulaire du noyau suprachiasmatique d'une souris sauvage qui exprime la GCamp6f en condition LD (12 :12).</i>	84
<i>Figure 29 : Variations journalières de la fluorescence du champ entier au niveau du noyau suprachiasmatique en condition LD (12 : 12).</i>	85
<i>Figure 30 : Imagerie calcique cellulaire du noyau de l'hypothalamus dorsomédial (DMH) d'une souris sauvage qui exprime la GCamp6f en condition LD (12 :12).</i>	86
<i>Figure 31 : GFP : pas de variations de la fluorescence au sein du champ des NSC.</i>	87
<i>Figure 32 : Rythme journalier de calcium basal unicellulaire.</i>	89
<i>Figure 33 : Co-marquage cellulaire GFP/GFAP au niveau du NSC.</i>	90
<i>Figure 34 : Coordination journalière des phases entre les cellules du NSC.</i>	90
<i>Figure 35 : Distribution des temps au pic du rythme journalier du calcium de toutes les cellules rythmiques, chez 4 souris différentes.</i>	91

<i>Figure 36 : Imagerie calcique cellulaire du NSC de la même souris sauvage qui exprime la GCamp6f en condition LD (12 :12) et DD.</i>	92
<i>Figure 37 : Variations circadiennes du calcium du champ entier au niveau des NSC.</i>	93
<i>Figure 38 : Coordination circadienne des phases entre les cellules du NSC.</i>	94
<i>Figure 39 : Variation du calcium basal du champs global du NSC in vivo lors d'un jetlag.</i>	95
<i>Figure 40 : Périodes du réalignement du CCR du champs global.</i>	96
<i>Figure 41 : Robustesse de la coordination du CCR face au perturbation physique de l'horloge.</i>	96
<i>Figure 42 : Transitoires calciques rapides des cellules du NSC in vivo.</i>	100
<i>Figure 43 : Activité calcique rapide qui se greffe sur les variations calciques lentes au sein du NSC in vivo.</i>	101
<i>Figure 44 : : Analyse des activités calciques rapides : estimation de l'amplitude.</i>	102
<i>Figure 45 : Distribution des phases journalières de l'amplitude des activités cellulaires rapides.</i>	103
<i>Figure 46 : Analyse des activités calciques rapides : estimation de la fréquence des transitoires.</i>	104
<i>Figure 47 : Distribution de l'ensemble des phases journalières des fréquences de transitoires calciques.</i>	105
<i>Figure 48 : Corrélation linéaire des phases des amplitudes et des phases des fréquences.</i>	106
<i>Figure 49 : Variation du 5^{ème} (noir) et 95^{ème} (rouge) percentile du signal GCaMP pour une même cellule pendant 24h.</i>	108
<i>Figure 50 : Distribution des ratios d'amplitude des activités lentes et rapides (24h/1min) sur une échelle Log.</i>	108
<i>Figure 51 : Relation de phase entre le CCR et les transitoires rapides.</i>	109
<i>Figure 52 : Signaux calciques rapides en réponse à un stimuli lumineux au sein des cellules du NSC in vivo pendant la nuit.</i>	111
<i>Figure 53 : Organisation spatiale de l'activité calcique rapide des NSC in vivo.</i>	116
<i>Figure 54 : L'activité calcique rapide organisée des cellules du NSC in vivo rend compte de l'activité du champ global.</i>	117
<i>Figure 55 : Distribution des clusters en fonction du temps.</i>	118
<i>Figure 56 : Imagerie calcique cellulaire ex vivo du NSC d'une souris sauvage adulte qui exprimant la GCamp6f par une approche virale (AAV9-GAG-GCaMP6f).</i>	119
<i>Figure 57 : Imagerie calcique cellulaire ex vivo des neurones AVP du NSC d'une souris transgénique AVP-Cre exprimant la GCamp6f par rapproche transgénique.</i>	120
<i>Figure 58 : L'activité calcique rapide organisée des cellules du NSC in vivo est résiliente face au Jetlag.</i>	121
<i>Figure 59 : Altération du CCR chez la souris Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}.</i>	122
<i>Figure 60 : L'activité calcique rapide organisée des cellules du NSC in vivo est résiliente à la perturbation génétique.</i>	123
<i>Figure 61 : L'étendue des foyers d'activité synchrone est dépendante de l'activité générale.</i>	124

INTRODUCTION

I. Première partie : Le système endogène de mesure de temps

I.1 / Introduction générale

I.1.A / Physiologie en harmonie avec la nature ?

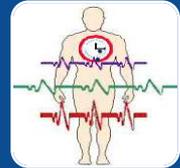
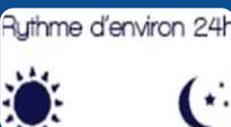
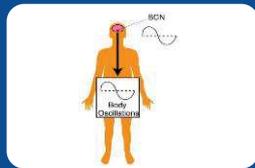
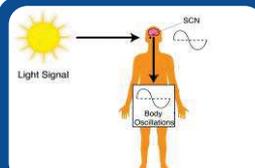
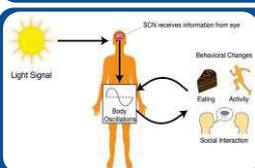
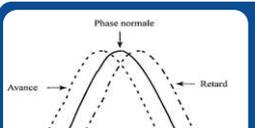
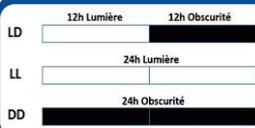
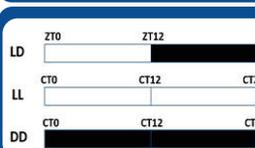
Une expédition de chasse fructueuse, l'évitement des prédateurs ainsi que la protection des petits et leur éducation sont des déterminants clés pour la survie d'une espèce. Au fil du temps, les êtres vivants ont évolué pour être actifs (ou même inactifs) à des moments particuliers du jour et de la nuit, pour assurer leurs besoins. Un bon « timing » est un attribut crucial dans la nature. Être au bon moment au bon endroit augmente la chance de survie. Aussi cruciale et générale que puisse être cette déclaration, ses principes sont partout dans la nature. Les abeilles, par exemple, augmentent leur chance de survie lorsqu'elles sont "conscientes" du moment où leurs fleurs préférées s'ouvrent pour donner accès à leur nectar (Bloch et al., 2017). Les zèbres du parc national de Hwange le font à leur tour lorsqu'ils migrent quotidiennement de leur endroit préféré que leurs prédateurs pourraient partager en même temps (Courbin et al., 2019). Par conséquent, le maintien des activités fondamentales de la vie en fonction du temps est un défi commun pour tous les organismes. Pour les êtres humains, un bon timing est en outre exprimé en termes de vertus sociales (Rappaport, 2002)*. Un bon timing s'agit, par exemple, de la ponctualité et des obligations qui représentent le maintien de notre fiabilité, comme l'exactitude des échéances des projets de travail ou le transfert mensuel du salaire. Ces derniers exemples montrent que les aspects de la survie ne sont pas nécessairement et immédiatement évidents dans les comportements. Ce qu'ils montrent, cependant, c'est que tout dans la nature a son temps.

Le dénominateur commun dans les exemples que je viens de vous citer est la capacité d'un système temporel inné à suivre avec précision les processus temporels environnementaux qui se déroulent avec une fréquence prévisible. Ce système permet de structurer l'existence d'un organisme par la capacité à anticiper (prévoir) les variations temporelles externes, permettant ainsi de mettre en phase de nombreuses fonctions vitales (métaboliques ou comportementales) de l'organisme avec un moment propice du temps extérieur. Sous la pression de la sélection naturelle, la plupart des formes de vie, des cyanobactéries aux humains, se sont équipées **d'horloges internes**, i.e., des mécanismes cellulaires endogènes qui permettent de « suivre le temps » (Takahashi, 2017). Par analogie avec l'horloge fabriquée par l'Homme que nous utilisons pour respecter les délais sociaux, l'horloge interne organise la rythmicité des différentes fonctions biologiques de manière à ce qu'elles soient coordonnées et en accord avec la journée terrestre de 24 heures. Ce système endogène de mesure du temps adapté à la journée

terrestre s'appelle ainsi, **le système « circadien »**. Il est le résultat d'une complexe évolution de la vie au long de quelques milliards d'années et programme notre physiologie en harmonie avec la nature !

**La gestion individuelle du temps est alors, on le sait, tenue pour un important indice de la qualité morale. Il est inutile d'insister sur la nécessité sans cesse soulignée de ne pas gaspiller les heures et les jours. Chacun doit se consacrer entièrement à un travail permettant d'engager un processus d'accumulation, garant à un horizon plus ou moins lointain de l'indépendance. C'est ce que résume parfaitement Théodore Barrau récompensé par l'Académie en 1851 pour ses Conseils aux ouvriers : « L'ouvrier n'a pas d'autre capital que le temps, il n'est pas d'autres revenus que l'emploi de ce fameux temps. En le dissipant, il détruit sciemment ses propres ressources, il devient jusqu'à un certain point homicide de lui-même » (Rappaport S., 2002, Le temps de la vertu : vertu de la lenteur).*

Tableau 1 Termes employés dans l'étude des rythmes biologiques et leurs définitions.

	<p>Chronobiologie</p>
<p>L'étude des rythmes biologiques et de leurs mécanismes.</p>	
<p>Rythmes biologiques</p>	<p>Changements d'une variable biologique qui se répètent avec un profil similaire et à intervalle systématique. Ils sont caractérisés par la période (durée pour compléter un cycle), par la valeur autour de laquelle se produit la variation rythmique, l'amplitude (mesure de l'ampleur de la variabilité prévisible) et la phase (valeurs maximales et minimales par rapport à l'échelle de temps correspondante ou emplacement dans le temps d'une valeur particulière du rythme).</p>
	<p>Rythmes ultradiens</p>
<p>Rythmes physiologiques, métaboliques ou comportementaux endogènes dont la période est inférieure à 20 h (Ex: rythme cardiaque).</p>	
<p>Rythmes infradiens</p>	<p>Rythmes physiologiques, métaboliques ou comportementaux endogènes dont la période est supérieure à 28 h (Ex: cycle ovarien).</p>
	<p>Rythmes circadiens</p>
<p>Rythmes physiologiques, métaboliques ou comportementaux endogènes dont la période est située entre 20-28 h qui persistent dans des conditions constantes de non-entraînement (Ex: cycle veille-sommeil).</p>	
<p>Système circadien</p>	<p>Le système biologique qui génère des rythmes proches de 24 h dans la physiologie cellulaire et de l'organisme et les ajuste aux cycles environnementaux.</p>
	<p>Entraînement</p>
<p>La synchronisation d'un rythme par un signal répétitif (Ex: la lumière).</p>	
<p>Zeitgeber</p>	<p>Littéralement, "donneur de temps". Tout signal qui agit sur l'horloge biologique comme une indication de temps qui a la capacité d'avancer ou de retarder son rythme et ainsi entraîner et synchroniser un rythme biologique.</p>
	<p>Décalage de phase</p>
<p>Changement de l'horaire de la phase d'un rythme.</p>	
<p>Chronotype</p>	<p>Tendance à préférer être du matin ou du soir pour la période active.</p>
	<p>Libre-cours</p>
<p>Conditions constantes de l'environnement : obscurité constante (DD pour dark/dark) ou lumière constante (LL pour light/light).</p>	
<p>Temps circadien</p>	<p>Le passage du temps endogène (en conditions constantes) est décompté en temps circadien (ou CT pour "circadian time") pour être distingué du passage du temps astronomique dit ZT pour "Zeitgeber time" (ZT0 étant défini comme le moment de la transition nuit/jour).</p>

I.1.B / Bref historique sur la découverte de l'horloge biologique circadienne

On part randonner à la montagne, il est 10 h du matin on voit une magnifique fleur aux pétales de couleur jaune vibrant qui prend une teinte orangée, une belle journée d'été qui s'annonce. Au retour il fait presque nuit, la fleur ne rayonne plus ! (Figure 1). On ne se pose pas de question, un vécu qui nous paraît tout à fait habituel. Le monde où nous vivons est un monde rythmique, celui de la succession des jours et des nuits et de la succession des saisons. L'univers semble générer des rythmes dès qu'il peut... Et le vivant n'échappe pas à la règle ! mais quelle est la nature de cette rythmicité ? Comment est-elle produite ? Depuis l'Antiquité, les interrogations sur la notion du rythme n'ont cessé d'être au cœur des réflexions des philosophes, des artistes, des scientifiques qui ont essayé de construire une image cohérente du monde qui nous entoure. Dès 325 avant J.-C. le scribe Androsthènes avait noté que les feuilles de tamarinier (*Tamarindus Indicus*) n'occupaient pas la même position le jour et la nuit.

Observer une fleur qui déploie ses pétales aux premiers rayons de soleil puis les referme à la tombée de la nuit peut sembler une évidence, mais remarquer que le rythme journalier du mouvement des feuilles d'une plante héliotrope (la sensitive : *Mimosa pudica*) persiste lorsque le rythme d'alternance jour/nuit est remplacé par une obscurité permanente l'est nettement moins (D'Ortous de Mairan, J.-J., 1729). Cette simple observation nous montre déjà le **caractère endogène** des rythmes journaliers appelés ainsi **rythmes circadiens** (circa = autour, diem = jour soit d'environ 24 heures). Les variations cycliques des comportements et de la physiologie des êtres vivants ne sont pas uniquement des réponses passives à leur environnement mais peuvent être générés de manière endogène. Bien que ces rythmes n'aient pas été reconnus comme les produits d'un mécanisme de mesure du temps, cette observation a été la première découverte d'un **rythme circadien endogène**.



Figure 1 : Rythme journalier des fleurs d'*Arnica montana*.

Cette fleur s'ouvre pendant la journée (à gauche) et se ferme la nuit (à droite).

(D'après l'association à la croisée des chemins).

C'est au XX^e siècle seulement que l'étude des rythmes biologiques prit son envol, montrant ainsi l'existence d'un fonctionnement rythmique circadien endogène dans différents organismes. En effet, les êtres vivants placés dans un environnement lumineux constant, i.e. en condition de **libre-cours** (Tableau 1), conservent leur rythme d'activité. Par exemple chez les drosophiles (animaux diurnes) l'éclosion des drosophiles adultes à partir des pupes n'a lieu que pendant les cinq premières heures du jour. Lorsqu'elles sont placées en obscurité constante, l'éclosion continue à avoir lieu au même moment (Pittendrigh, 1954). De même, l'étude de l'activité locomotrice des souris (animaux nocturnes), en condition de lumière constante, montre qu'il existe aussi un rythme circadien endogène chez les mammifères (Johnson, 1939). Dans un environnement lumineux rythmique avec 12 heures de lumière (L) et 12 heures d'obscurité (D pour Darkness) (12L : 12D), l'enregistrement de l'activité locomotrice de ces animaux nocturnes montrent que celle-ci suit une période d'exactly 24 heures, en phase avec la période de la nuit (Figure 2).

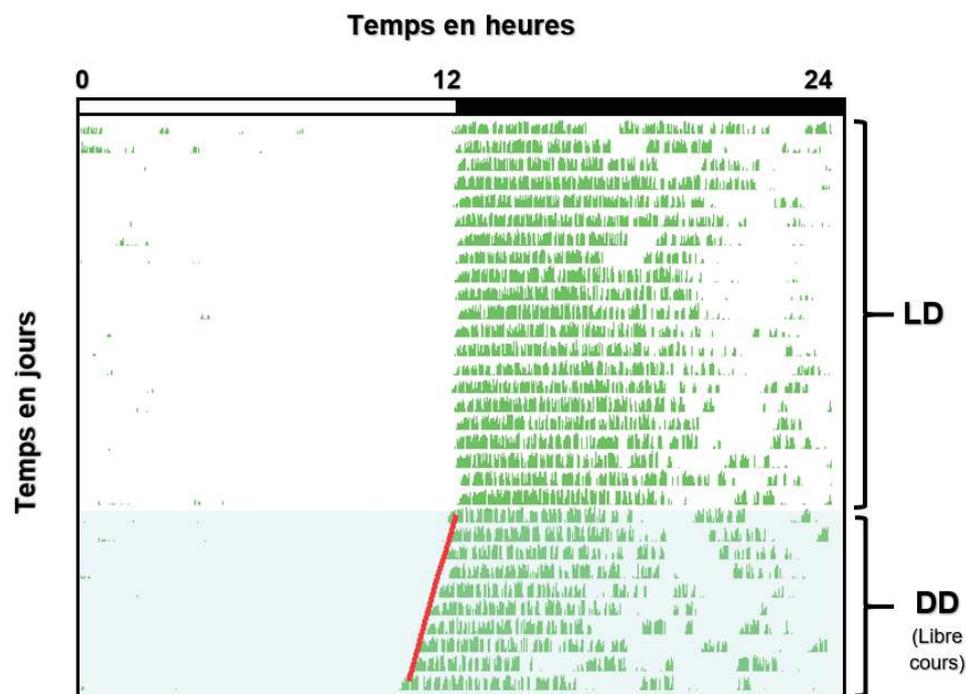


Figure 2 : L'actogramme, une représentation de l'activité locomotrice.

L'animal (une souris C57BL/6J) est placé dans une cage équipée d'une roue reliée à un système informatique d'enregistrement. L'activité locomotrice de la souris entraînée par un cycle LD 12/12 (l'alternance des phases obscures et lumineuses est représentée en haut de l'actogramme) montre que les souris sont inactives le jour et actives la nuit. Placées en obscurité constante DD, les souris maintiennent une activité rythmique, mais d'une période inférieure à 24 h qui déclenche le début de l'activité chaque jour un peu plus tôt (trait rouge).

Lorsque les animaux sont ensuite placés en obscurité constante (DD), même s'ils ne disposent plus des repères temporels de leur environnement, le rythme de l'activité locomotrice persiste pendant la nuit subjective qui correspond à la période de libre cours de l'animal. Fait intéressant, l'enregistrement de l'activité locomotrice des souris placées en obscurité constante dérive vers la gauche (Figure 3). Chaque jour le rongeur se met à courir un peu plus tôt que la veille. Cette dérive démontre que l'animal possède une horloge endogène dont la période n'est pas rigoureusement de 24 heures mais légèrement inférieure. Ce système est le **système circadien endogène** ou **horloge circadienne interne**.

En résumé, les rythmes circadiens sont contrôlés par une horloge circadienne interne dont la fonction est de générer de manière endogène des oscillations de leur mécanisme selon une périodicité « d'environ » 24 heures. A l'heure actuelle, les nombreuses études en chronobiologie ont montré l'existence d'horloges circadiennes dans une multitude d'organismes vivants multi ou unicellulaires.

I.1.C / Entraînement de l'horloge biologique circadienne

Mais si les périodes endogènes générées par l'horloge circadienne sont proches mais pas exactement de 24 heures, l'heure interne (circadienne) n'est alors jamais en phase avec l'heure externe (terrestre) ! Cette réunion d'équipe du vendredi matin à 9h30 ne se tiendra jamais, ayant chacun un rythme veille/sommeil différent qui n'est pas aligné avec le cycle jour/nuit terrestre. Heureusement, les différents donneurs de temps **ou Zeitgebers** (en allemand Zeit : Temps ; Geben : Donne) synchronisent l'horloge circadienne interne sur son environnement (Aschoff, 1954). Ce sont des synchroniseurs qui permettent de « remettre à l'heure » l'horloge endogène pour que l'heure interne soit en phase avec l'heure externe. Notons que ces synchroniseurs ne créent pas les rythmes, ne sont pas à leur origine mais les calibrent et en modifient les paramètres. Divers facteurs environnementaux externes (repères astronomiques) et sociaux, comme des changements dans la lumière, les horaires de la prise alimentaire et l'activité physique jouent un rôle important dans la synchronisation de l'horloge interne. La lumière est le synchroniseur le plus puissant du système circadien chez les animaux. L'entraînement par la lumière permet d'adapter le fonctionnement rythmique aux variations de luminosité externes, dépendantes du cycle jour-nuit et des saisons.

Curieusement, la sensibilité d'une horloge à un Zeitgeber varie en fonction du moment du cycle (Hastings and Sweeney, 1958; Pittendrigh, 1958). Ainsi, une exposition à la lumière

en début de la nuit déplace l'oscillateur circadien vers des heures plus tardives (Figure 3), entraînant un retard de phase. Alors qu'une exposition à la lumière en fin de nuit avance l'oscillateur circadien vers des heures plus précoces. Cela met en évidence le rôle crucial que jouent les moments de transitions nuit/jour et jour/nuit dans la remise à l'heure des horloges circadiennes, tout en permettant une mesure de la durée du jour qui sert à l'entraînement des rythmes saisonniers.

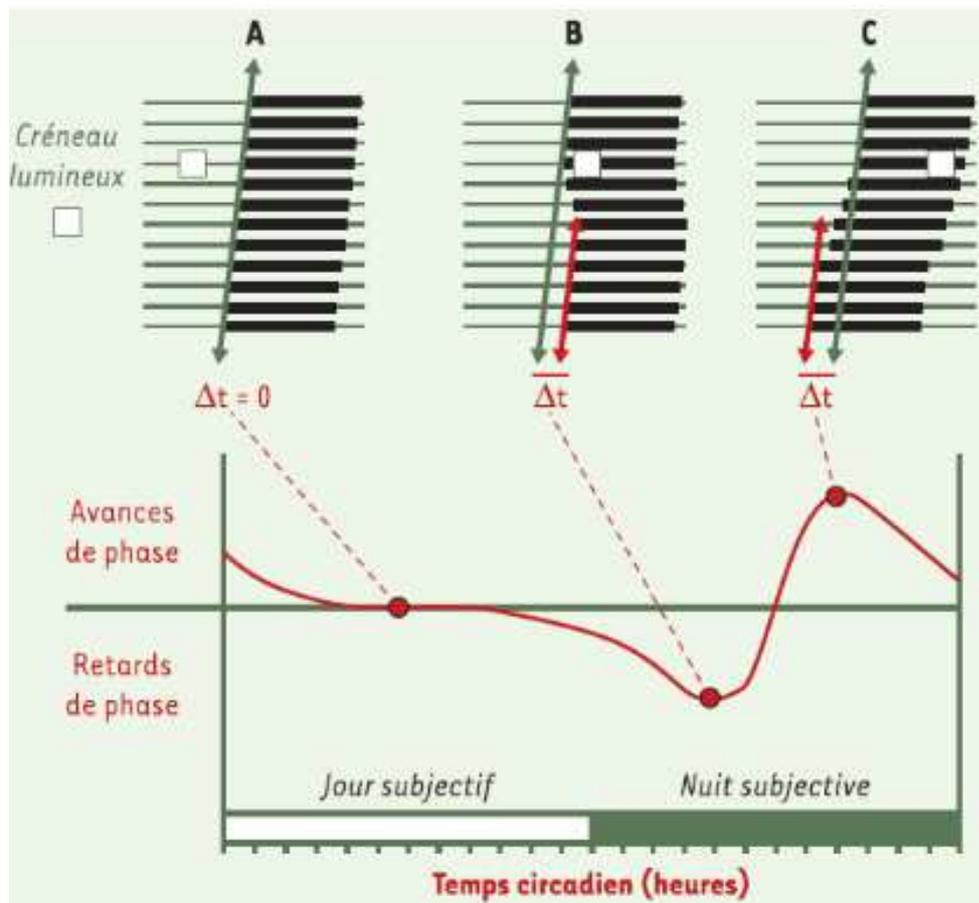


Figure 3 : La courbe de réponse de phase.

Exemple de courbe de réponse de phase du rythme circadien d'activité locomotrice d'un rongeur à l'administration d'un même créneau de lumière à différents moments de son cycle endogène lorsque l'animal est placé en obscurité constante.

(D'après Dardente, 2008).

I.1.D / Les avantages (et désavantages !) de l'horloge circadienne

Les possesseurs d'horloges circadiennes, et il s'agit en fait de presque tous les organismes vivants des cyanobactéries aux humains, sont des heureux bénéficiaires. Et oui ! en général qui est capable d'**anticiper** les variations cycliques de son environnement bénéficie incontestablement d'un avantage adaptatif, puisqu'à chaque moment de la journée sa physiologie et son comportement sont en parfait adéquation. Chez les humains, les personnes dotées d'une horloge circadienne avec une périodicité plus proche des 24 heures du cycle lumière-obscurité bénéficieraient d'un gain en aptitude par rapport aux individus dotés d'horloges plus lentes ou plus rapides, qui ne peuvent pas « s'accorder » aussi bien avec l'environnement temporel (Hastings et al., 2003).

Mais avoir une horloge circadienne ne s'avère pas toujours bénéfique ! Paradoxalement, en tant qu'êtres humains avoir une horloge interne est devenu un désavantage dans notre société occidentale moderne. En effet, notre société nous expose fréquemment aux contraintes de cette horloge à travers les voyages et l'adaptation au décalage horaire (Jetlag). De même, les contraintes de travail nous amènent parfois à faire des heures de nuit (parce qu'on fait une thèse par exemple !) impliquant des symptômes de fatigue, de désorientation, des troubles de l'humeur et d'insomnie (Jetlag social). De plus un large spectre de **pathologies** sont associées à des dysfonctionnements des horloges biologiques, telles que les désordres du sommeil, l'obésité, le cancer, ... (Roenneberg and Merrow, 2016).

Les enjeux de l'horloge et de la chronobiologie semblent toucher différents aspects de la vie quotidienne : le médical (la chronothérapie) (Lévi et al., 2010), le social (la réglementation concernant les rythmes de travail) (Légifrance, Code de travail 2020), mais aussi la recherche elle-même qui se doit dans toute expérimentation de prendre en compte le paramètre "rythmes biologiques". Ce constat nous pousse à étudier plus précisément les mécanismes de fonctionnement de l'horloge biologique et ses implications physiologiques.

Depuis une ou deux décennies, les découvertes s'enchaînent sur de nombreux aspects du fonctionnement de l'horloge circadienne chez les organismes vivants. Une myriade de nouveaux composants et de mécanismes sont identifiés. Dans la suite de l'introduction je vais essentiellement continuer sur l'exemple de l'évolution de ces connaissances chez les mammifères, et en particulier chez nos dévoués rongeurs.

I.2 / Rythme Circadien

I.2.A / L'horloge moléculaire : un mécanisme complexe

Les **rythmes circadiens** sont générés de manière **endogène**, l'horloge interne étant à l'origine de son propre tempo. Oui, mais **comment** ? C'est ce qu'ont découvert trois chercheurs généticiens américains, Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash et Michael W. Young, qui viennent il y a 3 ans de cela de recevoir le prix Nobel de Physiologie et Médecine pour leurs recherches. Des expériences de mutagenèse et de clonage ont fait émerger un ensemble de gènes, baptisés « **gènes horloges** », contrôlant des rythmicités circadiennes. Au moment où l'identification du premier gène horloge « *Period* » célébrait chez la drosophile son 10^{ème} anniversaire (Bargiello and Young, 1984), la même approche aboutissait à l'identification de « *Clock* » (circadian locomotor output cycles kaput), l'un des gènes centraux de l'horloge chez les mammifères (Vitaterna et al., 1994). Les découvertes successives d'une dizaine d'autres gènes derrière (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Reverb- α* , *Ror- α* , ...) permettent aujourd'hui de proposer un modèle d'horloge moléculaire basé **sur des boucles de rétrocontrôle fonctionnant sur 24 heures**, exprimée dans une multitude de cellules, tissus et organes.

I.2.A.1 / Une boucle principale

De manière simplifiée, pour générer une oscillation l'horloge a besoin d'un activateur, d'un répresseur et d'un mécanisme pour ralentir l'action du répresseur sur l'activateur. D'un point de vue moléculaire, il s'agit d'un réseau interconnecté de boucles de rétroaction transcriptionnelles/translationnelles, avec une composante négative et une positive (*transcription-translation feedback loop*, *TTFL*, ou *transcription-translation oscillator loop*, *TTO*).

Chez les mammifères, la boucle principale de l'horloge moléculaire (Figure 4) fait intervenir les facteurs de transcription **CLOCK** (ou son homologue NPAS2) et **BMAL1**, dont les hétérodimères (**complexes activateurs**) migrent dans le noyau et activent la transcription des gènes *Per1-2-3* et *Cry1-2* (*cryptochrome*) en se liant à l'ADN (via leur domaine bHLH-PAS : basic-Helix-Loop-Helix) au niveau des **séquences « E-box »** localisées dans leurs régions promotrices. Les protéines PERs et CRYs s'hétérodimérisent à leur tour (**complexes**

inhibiteurs), sont phosphorylées par les caséines kinases (CK) puis adressées dans le noyau où elles inhibent l'activité transcriptionnelle du dimère CLOCK/BMAL1, et donc leur propre expression. A l'aide des mécanismes de dégradation des ARNm et des protéines, la diminution de la quantité du complexe protéique PER/CRY entraîne une levée d'inhibition, le complexe activateur BMAL1/CLOCK lance ainsi un nouveau cycle (Takahashi, 2017). Une expression rythmique des ARNm *Per* et *Cry* et de leurs protéines avec une périodicité proche de 24 heures résulte de ce mécanisme.

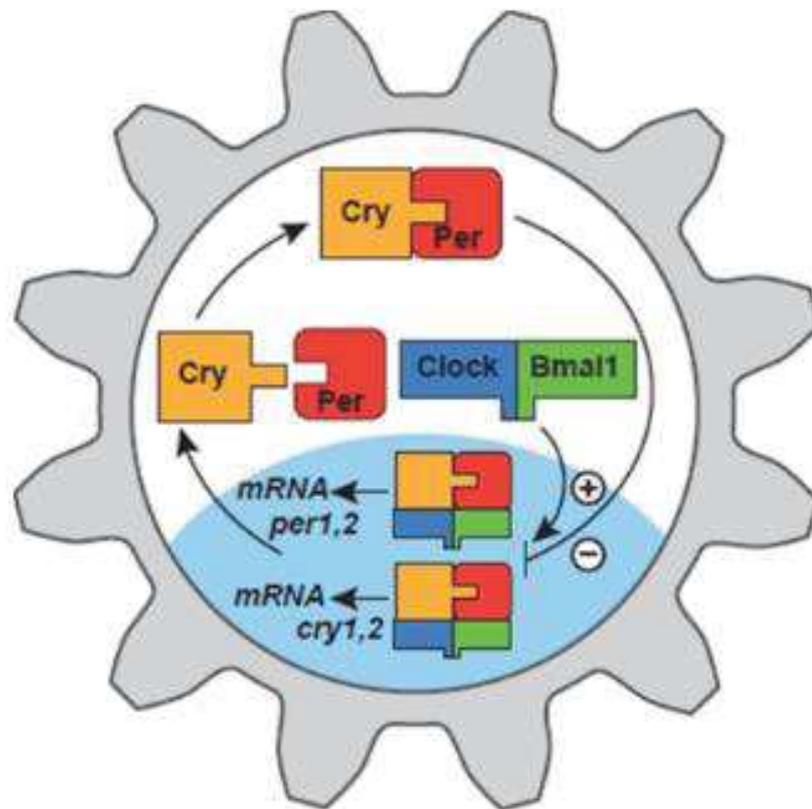


Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire de l'horloge : boucle de rétroaction principale.

Les activateurs CLOCK et BMAL1 augmentent l'expression des répresseurs Per et Cry qui, lorsqu'ils sont en quantité suffisante, entrent dans le noyau pour réprimer CLOCK/BMAL1.

(D'après Hastings et al., 2019).

I.2.A.2 / Une boucle secondaire et des mécanismes de régulation

La seconde boucle (Figure 5) est une boucle de rétroaction additionnelle qui assure la **régulation transcriptionnelle** des gènes de la boucle principale. Elle garantit le contrôle rythmique de l'expression de *Bmal1* de la manière suivante : Les récepteurs nucléaires REV-ERB α - β et ROR α - γ , répriment et activent respectivement l'expression de *Bmal1* par fixation compétitive sur les mêmes séquences RRE (R-response element). Et pour que la boucle soit bouclée, les dimères CLOCK/BMAL1 activent la transcription de *Rev-Erb* et *Ror* en se liant sur leur séquences « E-box » avant d'être réprimés par PER et CRY.

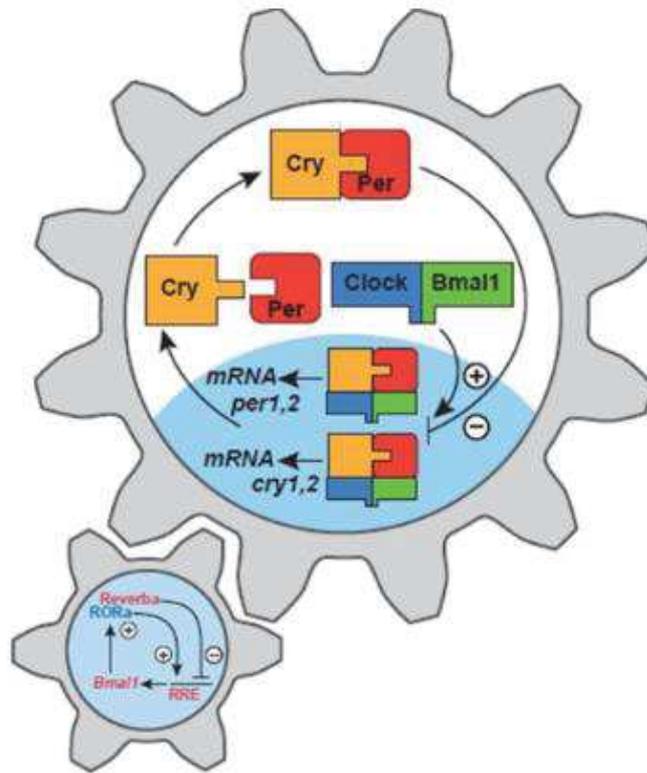


Figure 5 : Rouage secondaire du mécanisme moléculaire de l'horloge.

Une deuxième boucle transcriptionnelle se superpose à la première : CLOCK/BMAL1 active l'expression de Rev-erba et ROR qui, à leur tour, régulent CLOCK et BMAL1.

(D'après Hastings et al., 2019).

Les protéines horloge de la boucle principale subissent aussi de nombreuses autres **régulations post-traductionnelles** (phosphorylations, ubiquitinylation, SUMOylation, acétylation...) qui offrent un niveau supplémentaire d'affinement et sont tout aussi cruciaux pour le fonctionnement harmonieux de l'horloge moléculaire sur 24 heures que les phénomènes

transcriptionnels (Takahashi, 2017). Imaginons pour deux secondes que les répresseurs PER et CRY entrent trop tôt dans le noyau, l'horloge tournera trop vite ! et s'ils ne sont pas suffisamment dégradés une fois leur rôle répressif exercé, l'horloge reste bloquée et ne peut pas commencer un nouveau cycle. Ainsi, de la stabilité des protéines horloge et leurs transferts entre le noyau et le cytoplasme assurés par les kinases et les phosphatases, dépend la période de l'horloge moléculaire. La phosphorylation des protéines PER par les caséines kinases 1δ et 1ϵ régule leur adressage au protéasome (Camacho et al., 2001; Akashi et al., 2002; Eide et al., 2005) comme au noyau (Takano et al., 2004) et les déphosphorylations effectuées par l'antagoniste la protéine phosphatase 1 (PP1) stabilisent les protéines et favorisent leur accumulation nucléaire (Gallego et al., 2006; Schmutz et al., 2011). Les changements dans la dynamique spatio-temporelle de la vie des protéines PER, tout comme le dysfonctionnement des CK 1δ et 1ϵ , conduisent à des modifications de la cinétique de l'horloge. En effet, chez l'humain des phénotypes similaires ont été observés dans le cadre de pathologies appelées syndrome familial d'avance de phase du sommeil (Jones et al., 1999) deux mutations ont été décrites chez les patients : l'une qui affecte la CK 1δ (Xu et al., 2005) et l'autre qui touche un acide-aminé phosphoaccepteur (S662G) de la séquence de PER2 (Toh et al., 2001) qui est une cible des CK 1δ et 1ϵ . C'est aussi le cas chez le Hamster Syrien dont la période de l'activité locomotrice est raccourcie par la mutation spontanée tau sur le gène de la CK 1ϵ (Lowrey, 2000).

Quand il n'y en plus, il y en a encore ! on trouvera encore et toujours un niveau supplémentaire de régulation et du coup, de complexité dans le fonctionnement circadien. Il est devenu évident que les **mécanismes post-transcriptionnels** régissent la stabilité et la traduction des ARNm horloge (Kojima et al., 2011). Dans le foie murin par exemple, les 70% des ARNm qui sont rythmiques ne le sont pas suite à une transcription rythmique mais grâce à des mécanismes post-transcriptionnels (Koike et al., 2012; Menet et al., 2012). Une étude récente a permis de décrire un nouveau mécanisme post-transcriptionnel original comme prenant part au ballet régulateur qui gravite autour de l'horloge, montrant que des corpuscules nucléaires appelés paraspeckles dont le constituant principal est un long ARN non-codant, (Neat1), grâce à leur expression circadienne peuvent contrôler la rythmicité circadienne d'expression des ARNm qui leur sont associés par rétention nucléaire lorsque ceux-ci présentent dans leur région 3'UTR des séquences répétées et inversées de type Alu (IRAlu) ce qui empêche leur export cytoplasmique et permet le contrôle de leur niveau d'expression (Torres et al., 2016).

La combinaison des deux boucles de rétroaction, principale et secondaire, ainsi que les différents niveaux et outils de régulations génère une horloge oscillante aussi régulièrement qu'un métronome pour elle-même mais surtout elle donne le tempo à toute la cellule. La transmission s'effectue directement par les protéines horloge (CLOCK, BMAL1, REV-ERB α) qui contrôlent la transcription de gènes dits gènes contrôlés par l'horloge (CCG, Clock Controlled Genes) qui sont les voies de sortie des messages rythmiques, puis par des transcriptions en cascade qui permettent de décliner les phases d'expression et les gènes cibles de deuxième et troisième ordre à loisir influençant ainsi une large variété de processus biologiques (Takahashi, 2017). + tous les gènes régulés aux niveaux post-transcriptionnel et traductionnel (ton paragraphe précédent)

En conclusion, ce mécanisme cellulaire autonome est le mécanisme de base du fonctionnement circadien chez les mammifères. L'expression robuste des gènes de l'oscillateur moléculaire est ubiquitaire, il a pu être observé dans de nombreux explants de tissus (Cœur, poumon, foie, estomac, rate, reins, pancréas, muscles squelettiques, hypophyse, glande thyroïde, glande surrénale) (Yamazaki, 2000; Yamamoto et al., 2004), ainsi que dans plusieurs lignées cellulaires comme les lignées de fibroblastes de souris et des rats (Figure 6) (Akashi and Nishida, 2000; Balsalobre et al., 1998).

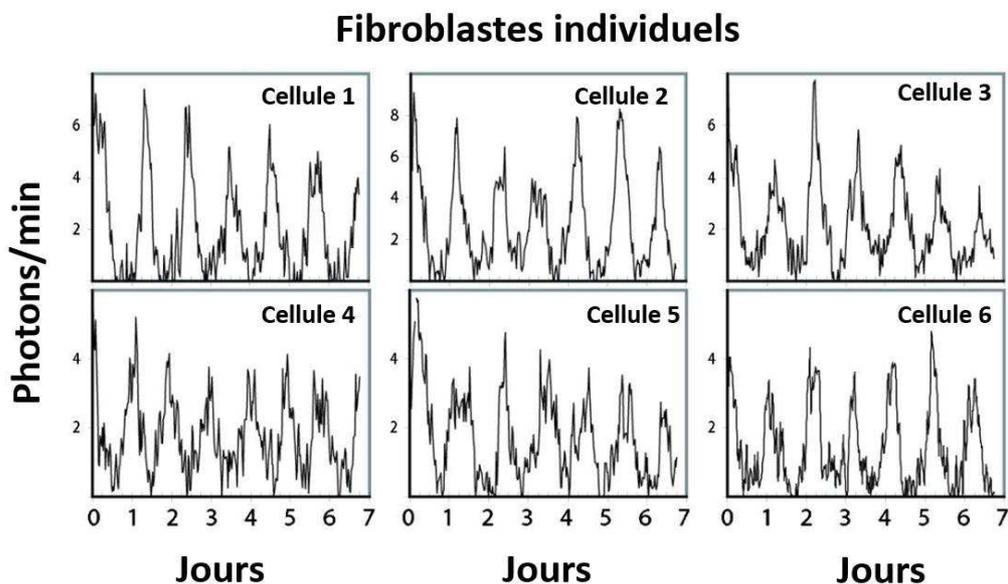


Figure 6 : Oscillations des fibroblastes en cultures.

Une caméra photosensible permet l'enregistrement des rythmes de PER2 : LUC des cellules. L'enregistrement de 6 fibroblastes différents, montre que chaque cellule oscille de façon autonome pendant 7 jours.

(Adaptée d'après Liu et al., 2007).

I.2.B / Les Noyaux suprachiasmatiques (NSC) : horloge centrale des mammifères

Chez les mammifères, l'horloge moléculaire est exprimée dans une multitude de cellules, tissus et organes, responsables de l'existence de plusieurs oscillateurs, engendrant une organisation complexe du système circadien. Mais comment un organisme doté d'un tas d'oscillateurs arrive-t-il à garder un tempo interne uniforme ? l'horloge moléculaire est aussi exprimée dans les **Noyaux Suprachiasmatiques (NSC)** de l'hypothalamus, identifiés et localisés comme le site de l'horloge centrale, ou le principal chef d'orchestre d'innombrables horloges distribuées dans tout l'organisme.

I.2.B.1 / Bref historique sur la découverte de l'horloge centrale

Et si nous remontons l'horloge quelques années en arrière ? eh oui, les tentatives de Stephen Hawking pour prouver l'impossibilité de voyager dans le passé n'ont pas abouties ! En fait, quelques années avant la découverte que les gènes de l'horloge, acteurs de l'oscillateur moléculaire, sont exprimés et rythment toutes les cellules de l'organisme, la tendance générale était à envisager une horloge unique impliquée dans la genèse des rythmes circadiens endogènes (1^{ère} intuition d'un « pacemaker » par Pittendrigh en 1960). Oui, mais **où** ? A cet égard, une série d'expériences neuroanatomiques a permis en effet la mise en évidence d'un **centre rythmique** considéré comme le site de l'horloge circadienne chez les mammifères. Celui-ci se situe à la base de l'hypothalamus, plus précisément dans les **noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus « NSC »** (Figure 6).

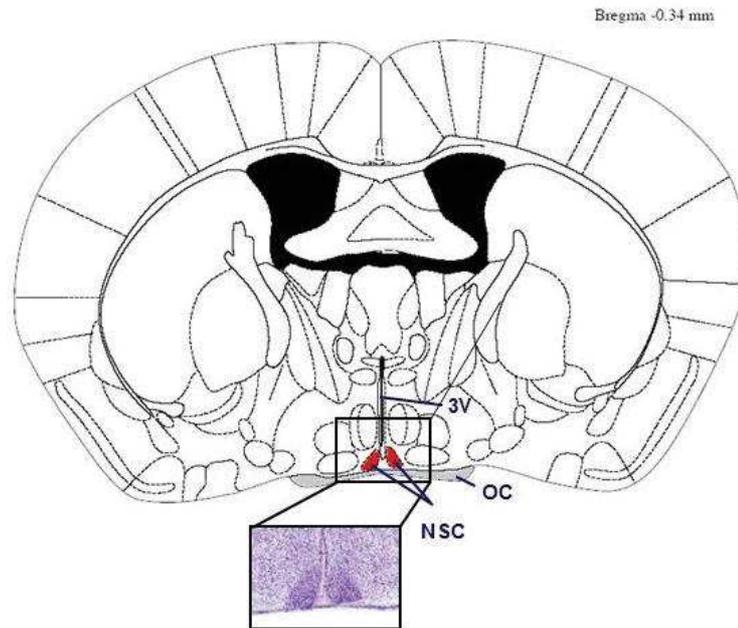


Figure 7 : Localisation des noyaux suprachiasmatiques chez une souris.
 3V : 3^{ème} ventricule ; OC : chiasma optique ; NSC : noyaux suprachiasmatiques.

(D'après Goede et al., 2018).

La plupart des rythmes circadiens physiologiques et comportementaux sont contrôlés par cette structure hypothalamique (Moore and Eichler, 1972; Rusak and Zucker, 1979). La destruction complète des noyaux suprachiasmatiques chez les mammifères supprime les rythmes d'activité-repos, de la prise alimentaire, de la température corporelle, et le rythme de la sécrétion de mélatonine (Stephan and Zucker, 1972). A l'inverse, la transplantation des tissus ou de cellules de NSC fœtaux à un animal dont les NSC ont été préalablement détruits restaure les rythmes abolis (Ralph and Lehman, 1991). La preuve définitive de l'implication des NSC dans les fonctions rythmiques endogènes est apportée en démontrant que la période des rythmes en libre cours est imposée par les NSC. Effectivement, les rythmes présentent toujours la période du génotype donneur et pas celle du génotype de l'animal hôte (Ralph et al., 1990; Ralph and Menaker, 1988). De plus, les greffes ayant les meilleurs résultats étaient celles formant le plus de contact avec des projections en provenance du tractus rétino-hypothalamique et développant le plus de projections vers les structures environnantes (Lehman et al., 1987), montrant ainsi l'importance des projections vers et à partir du NSC dans le maintien des rythmes.

Le consensus actuel considère que l'horloge centrale n'est plus l'horloge unique, ainsi qu'étaient auparavant considérés les NSC, mais au contraire le principal chef d'orchestre

d'innombrables horloges, appelés ainsi horloges périphériques (en opposition à l'horloge centrale des NSC) distribuées dans tout l'organisme. En effet, outre les cellules isolées, un bon nombre de tissus périphériques, tels que le foie, le rein, ou les poumons, présente aussi des oscillations auto-entretenues (Abe et al., 2002; Yamazaki, 2000) (Figure 8a). L'absence du NSC n'induit pas la perte de la rythmicité dans ces tissus périphériques, mais en cause une désynchronisation entre eux (Figure 8b) ainsi qu'une plus grande variabilité des rythmes circadiens entre les animaux (Yoo et al., 2004). Un NSC fonctionnel est nécessaire pour maintenir la cohérence de phase entre les tissus, mais aussi entre les cellules d'un même tissu rythmique (Guo et al., 2006).

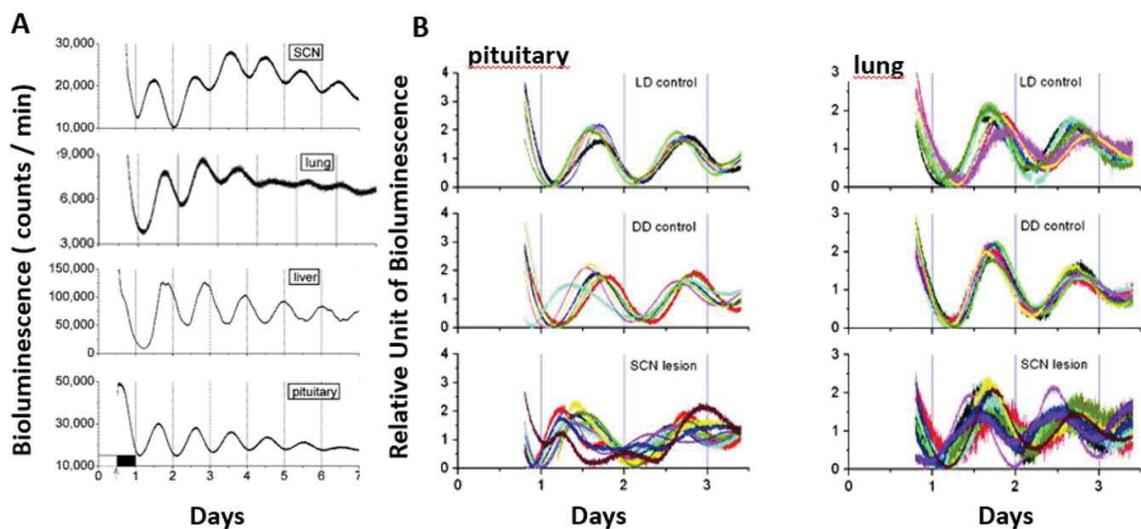


Figure 8 : Oscillations d'explants de tissus périphériques.

- A- Les tissus sont prélevés au moment de l'extinction de la lumière. Ils sont ensuite mis en culture et la bioluminescence émise par le système PER2 : LUC est enregistrée par un système d'acquisition. L'ensemble des tissus enregistrés a un fonctionnement rythmique autonome qui persiste plusieurs jours.
- B- La bioluminescence émise par le système PER2 : LUC des hypophyses et des poumons des animaux contrôlés (LD et DD) et des animaux lésés pour le NSC est enregistré. Chaque couleur représente un animal différent. La désynchronisation des phases est évidente dans les enregistrements individuels des animaux lésés du NSC pour les deux tissus.

(D'après Yoo et al., 2004).

I.2.B.2 / Fonctionnement de l'horloge centrale au niveau tissulaire

I.2.B.2.a / Anatomie du NSC

L'horloge centrale est constituée par la structure des noyaux suprachiasmatiques (NSC). Il s'agit d'une paire de noyaux hypothalamiques disposés bilatéralement de part et d'autre du 3^{ème} ventricule au-dessus du chiasma optique (Klein D et al., 1991). Chacune des parties unilatérales du NSC contient environ 10000 neurones, qui sont majoritairement GABAergiques ainsi que des cellules gliales, en particulier des astrocytes. Le corps cellulaire des neurones du NSC est relativement petit et possède des arborifications dendritiques simples et qui semblent disposées de façon très compacte. Le NSC est une structure hétérogène qui peut être subdivisée en plusieurs sous-régions (Figure 9) :

- Une partie **ventro-latérale (vlNSC)** appelée « **core** ».
- Une partie **dorso-médiane (dmNSC)** appelée « **shell** ».

La distinction majeure entre les neurones du core et de la shell se trouve notamment dans leur contenu neurochimique. Les neurones de la partie core sont de forme ovale ou ronde, leur nombre représente approximativement un quart des neurones du NSC et expriment majoritairement le « vasoactive intestinal polypeptide » (VIP), le « gastrin releasing peptide » (GRP), la neurotensine (NT) et la calrétinine. Les projections synaptiques de ces neurones se font principalement vers les neurones du shell mais aussi vers leurs voisins dans la région core du NSC (Leak et al., 1999). La partie shell se compose de neurones de forme ronde présents en plus grande densité que ceux du core et expriment principalement l'arginine vasopressine (AVP), l'angiotensine II et la met-enképhaline ; une grande majorité coexprime également le GABA, et quelques-uns le glutamate (Welsh et al., 2010).

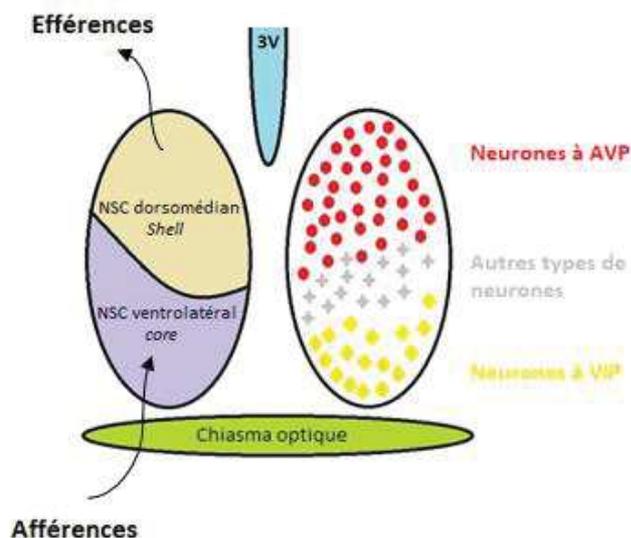


Figure 9 : Représentation schématique simplifiée de l'organisation anatomo-chimique des NSC.

La partie core est localisée ventro-latéralement en contact avec le chiasma optique. Elle est impliquée dans l'intégration de signaux afférents des NSC. La partie shell est dorso-médiane et est à l'origine de la plupart des signaux efférents des NSC (Abrahamson and Moore, 2001).

I.2.B.2.b / Entrainement de l'horloge centrale par la lumière

L'entraînement de l'horloge circadienne par la lumière remet le système circadien à 24 heures chaque jour, l'empêchant de sortir de phase et de passer en libre-cours. L'information lumineuse provenant de l'extérieur doit donc parvenir aux structures capables d'intégrer l'information et d'envoyer des signaux appropriés aux divers tissus. De par leur position anatomique, les NSC reçoivent l'immense majorité des projections rétiniennes vers l'hypothalamus et constituent la composante centrale du système de la régulation photique.

La lumière est perçue par la rétine. La voie impliquée dans le traitement de l'information photique pour la vision (constitution d'images) et celle impliquée dans le photo-entraînement sont anatomiquement et fonctionnellement différentes. En effet, la rétine contient des **photorécepteurs** visuels (cônes et bâtonnets), ainsi que des cellules ganglionnaires contenant un photopigment, la **mélanopsine**, qui transmettent directement l'information lumineuse aux NSC via le **tractus rétino-hypothalamique (RHT)** (Cermakian and Sassone-Corsi, 2002). Le RHT est la voie principale d'entrée de l'entraînement photique. Sa destruction n'entraîne pas de cécité mais une perte de la capacité de photo-entraînement de l'activité locomotrice chez le hamster (Johnson et al., 1988). Lors d'une stimulation lumineuse, les projections rétiniennes du

RHT libèrent du **glutamate** et du **PACAP** (« Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide ») au niveau du contact synaptique avec les neurones du NSC (Morin and Allen, 2006). La libération des deux neurotransmetteurs module l'expression de certains gènes horloges, notamment les gènes *Per* qui font partie des principaux gènes qui répondent à l'information lumineuse dans la partie ventro-latérale du NSC (Figure 10). Si on prend comme exemple le gène *Per1* qui est induit dans les 5 à 15 minutes après une exposition lumineuse et est impliqué directement dans la boucle principale de l'horloge circadienne, son induction mène à l'entraînement de toute la machinerie moléculaire et pourrait être largement responsable de la remise à zéro de l'horloge. En effet, l'inhibition de *Per1* induit la perte des modifications de la phase des rythmes comportementaux par la lumière chez la souris (Akiyama et al., 1999). Ainsi, c'est la partie ventro-latérale du NSC qui est majoritairement impliquée dans l'intégration des signaux lumineux en provenance de la rétine via le RHT.

Une autre voie est aussi impliquée par la transmission des signaux de synchronisation photiques vers le NSC depuis la rétine, c'est une voie indirecte, qui fait relais dans le thalamus, plus précisément dans le corps géniculé latéral, pour se terminer par le **tractus géniculohypothalamique (GHT)** (Hisano et al., 1988b). Les fibres du tractus géniculohypothalamique forment principalement des contacts synaptiques avec les neurones VIP dans la partie ventro-latérale du NSC chez le rat et libèrent le neuropeptide Y (NPY) et le GABA (« acide- γ -aminobutyrique ») (Hisano et al., 1988a; Francois-Bellan et al., 1990) induisant une réduction des niveaux d'expression de *Per1* et *Per2* durant le jour (Maywood et al., 2002).

Grâce aux projections synaptiques des neurones de la partie ventro-latérale vers les neurones de la partie dorso-médiane, l'information est propagée à l'ensemble du NSC pour réguler l'organisation temporelle globale (Herzog et al., 2017). En effet, après un changement de phase de la photopériode de l'environnement (retard ou avance), le changement de rythmes s'opère rapidement et en premier dans les NSC (Yamazaki, 2000) qui utilisent par la suite des signaux variés par des voies directes (limités à des structures toutes localisées dans l'hypothalamus) ainsi que des voies indirectes (humorale, hormonale ou nerveuse) pour réinitialiser les rythmes dans l'organisme entier.

L'horloge centrale n'est donc jamais isolée : elle comporte des voies d'entrée qui véhiculent les repères temporels et qui la remettent quotidiennement à l'heure, ainsi que des voies de sortie par lesquelles elle régule les rythmes corporels, à plusieurs niveaux (biochimie, physiologie, comportement). **Les NSC servent ainsi de centre de relai entre l'environnement et la physiologie** (Dibner et al., 2010).

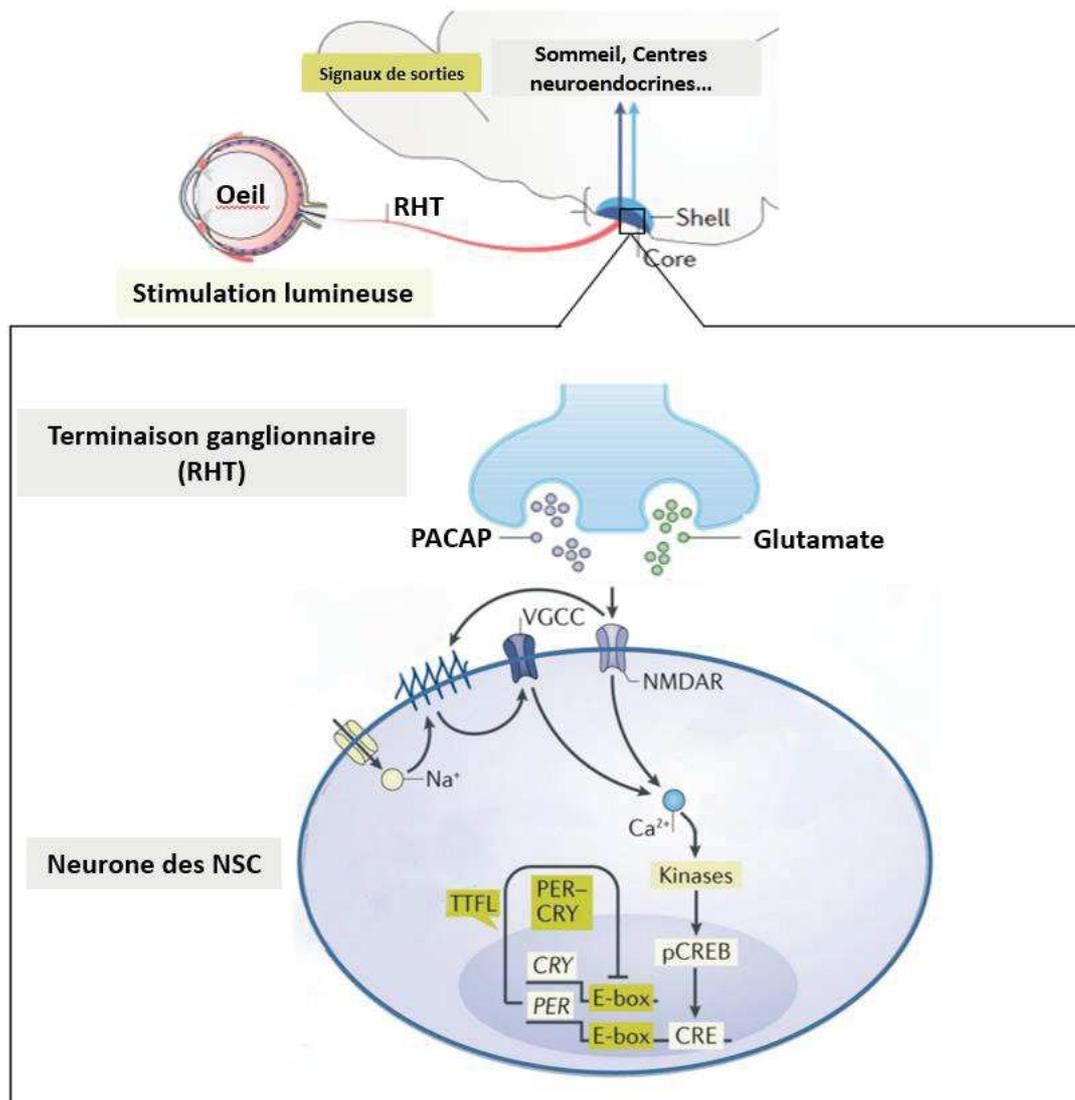


Figure 10 : Schéma de la transmission de l'information lumineuse de la rétine aux NSC.

Lors d'une stimulation lumineuse, les projections rétiniennes du RHT libèrent du glutamate et du PACAP au niveau du contact synaptique avec les neurones du NSC, principalement avec les neurones VIP de la partie core du NSC. Le glutamate agit sur les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-Aspartate) et AMPA (acide alpha-amino-3-hydroxyl-5-méthyl-4-isoxazolepropionique) ce qui dépolairiser la membrane, et mène directement (à travers le récepteur AMPA) et indirectement (à travers les canaux sensibles au voltage) à un influx de calcium. L'augmentation intracellulaire de calcium aboutit à l'activation de toute une cascade de kinases ce qui mène notamment à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein). Enfin, cette activation par phosphorylation du facteur de transcription CREB aboutit à l'expression de nombreux gènes dans le NSC qui portent une séquence CRE (« Calcium and cAMP response element ») dans leur promoteur et à l'entraînement de l'horloge moléculaire. Ce système permet à la lumière de « réinitialiser » l'horloge.

(Adaptée d'après Hastings et al., 2018)

I.2.B.2.c / Complexité anatomo-fonctionnelle du NSC

La livraison d'un colis au bon destinataire dans les meilleurs délais repose en grande partie sur la qualité et la performance des différentes entités au sein du centre de relai. Et c'est tout pareil pour le NSC ! pour exceller dans son rôle de relai entre l'environnement et la physiologie, il compte sur la performance et les relations extrêmement étroites entre ses subdivisions. Le NSC est constitué par les parties ventrales (Shell) et dorsales (core) qui sont deux structures anatomiquement différentes, mais qui sont également deux oscillateurs indépendants possédant une activité synchrone soutenue par le GABA (Albus et al., 2005) (Figure 11). La partie shell, dont le rôle est de battre la mesure pour tout l'organisme exprime une horloge robuste, tandis que le core exprime une horloge plus facilement perturbable capable ainsi d'intégrer les informations synchronisantes entrant dans les NSC pour les transmettre au shell (Yan et al., 1999). Et effectivement, les rythmes du shell sont plus robustes que ceux du core, mais c'est le core qui répond à la lumière (Hamada et al., 2001; Shigeyoshi et al., 1997; Yan and Okamura, 2002).

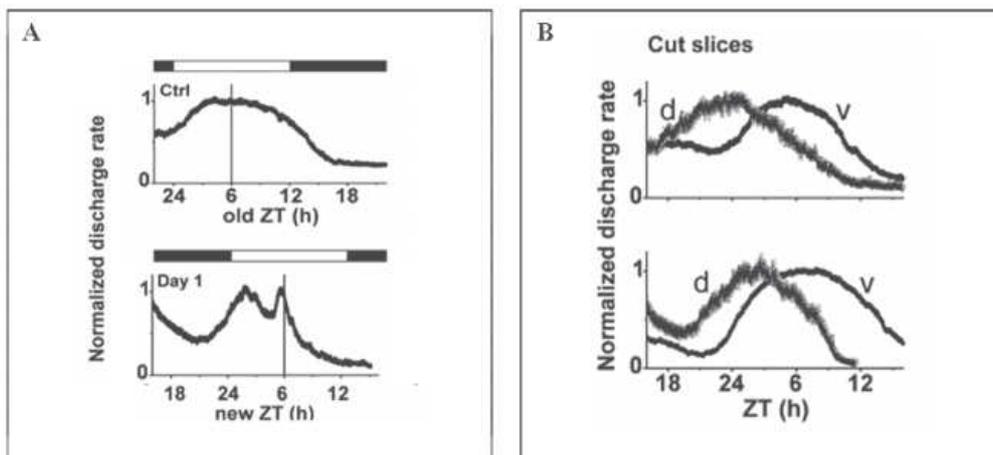


Figure 11 : Les deux sous parties Shell et Core du NSC sont deux oscillateurs indépendants.

- A- Un décalage de 6 heures dans le cycle LD entraîne un découplage des neurones, identifiant 2 populations distinctes.
- B- Les 2 parties vNSC (v) et dmNSC (d) des NSC sont séparées et reflètent clairement un fonctionnement indépendant.

(Adaptée d'après Albus et al., 2015).

Un manque de communication entre l'entité qui a réceptionné votre colis et votre livreur, se traduit par un retard et une période d'attente désagréable ! C'est probablement ce qui se passe dans notre corps lors d'un jetlag. Lorsque les deux sous-régions du NSC sont artificiellement découplées par un protocole de décalage de phase abrupte, le core se resynchronise rapidement sur le nouveau cycle LD tandis que le shell met 6 à 13 jours pour se remettre à l'heure (Nagano et al., 2003), une désynchronisation interne temporaire qui suggère un mécanisme pour les symptômes physiologiques qui surviennent chez l'Homme après une traversée rapide des fuseaux horaires (Nakamura, 2005) et qui pourrait reposer sur une action différentielle du GABA dans les deux régions (Albus et al., 2005).

La présence d'autres oscillateurs au sein des NSC ajoute un degré de complexité qui présente une réalité fonctionnelle. En effet, la subdivision dorso-ventrale des SCN qui assure la transmission des informations synchronisantes à tout l'organisme n'est pas l'unique, il existe aussi une subdivision antéro-postérieure (Jagota et al., 2000) qui encode la durée de la phase de lumière dans la journée (la photopériode). Plus la photopériode est longue, plus le décalage de phase entre la partie antérieure et la partie postérieure augmente (Hazlerigg et al., 2005; Inagaki et al., 2007).

Le nombre et l'organisation des différents oscillateurs (groupes neuronaux) au sein des NSC en font une structure complexe, aussi bien d'un point de vue anatomique que fonctionnelle. En effet, cette complexité a un rôle fonctionnel concernant les entrées et les sorties du NSC, assurant l'équilibre entre les rythmes environnementaux et les rythmes circadiens au sein de l'organisme.

I.2.B.3 / Fonctionnement de l'horloge centrale au niveau cellulaire

I.2.B.3.a / Oscillateurs autonomes : fonctionnement circadien endogène

Les neurones du NSC présentent un fonctionnement circadien intrinsèque qui module de façon circadienne une myriade de processus cellulaires, allant du métabolisme cellulaire à la synthèse, régulation et dégradations des protéines (Mure et al., 2018; Panda et al., 2002). En effet, la plupart des facteurs sécrétés, tels que l'AVP, et le VIP (Jin et al., 1999; Hurst et al., 2002), ainsi que des acteurs moléculaires impliqués dans la sécrétion vésiculaire sont eux aussi soumis à une régulation circadienne dans le NSC, soit au niveau transcriptomique, soit au niveau protéomique. De ce fait, la machine de sécrétion et le cargo vésiculaire qui sont censés

transmettre le rythme circadien aux autres régions du cerveau sont eux même sous le contrôle de l'horloge des neurones du NSC.

La physiologie des cellules du NSC présentent également une modulation circadienne. Un trait caractéristique des neurones du NSC, est que leur activité électrique oscille spontanément tout au long du cycle jour-nuit (Brown and Piggins, 2007; Colwell, 2011; Belle, 2015). Autrement dit, ces neurones sont électrophysiologiquement plus actifs pendant la journée (un potentiel membranaire dépolarisé) que la nuit (un potentiel membranaire complètement hyperpolarisé-silencieux). Les neurones du NSC en plus d'être capables de générer une activité électrique spontanée, cette activité est modulée de façon rythmique. Au sein d'un circuit, le taux de cette activité électrique spontanée peut être régulée soit via une modulation d'origine synaptique (Smith and Otis, 2003) ou intrinsèque, comme c'est le cas pour les neurones du NSC (Pennartz et al., 2002; Kuhlman and McMahon, 2004). Effectivement, l'activité électrique circadienne des neurones du NSC persiste *ex-vivo* sur tranches (Figure 12A) ainsi que dans des neurones isolés issus des NSC (Figure 12B) pendant plusieurs semaines même en absence d'un synchroniseur (Welsh et al., 1995; Herzog et al., 1998; Honma et al., 1998; Shirakawa et al., 2000; Aton et al., 2005; Webb et al., 2009). Le potentiel d'action et son rythme d'impulsion suivent ainsi un rythme cellulaire autonome de 24 heures, cela démontre que la plupart des neurones individuels du NSC sont des **oscillateurs circadiens intrinsèques**.

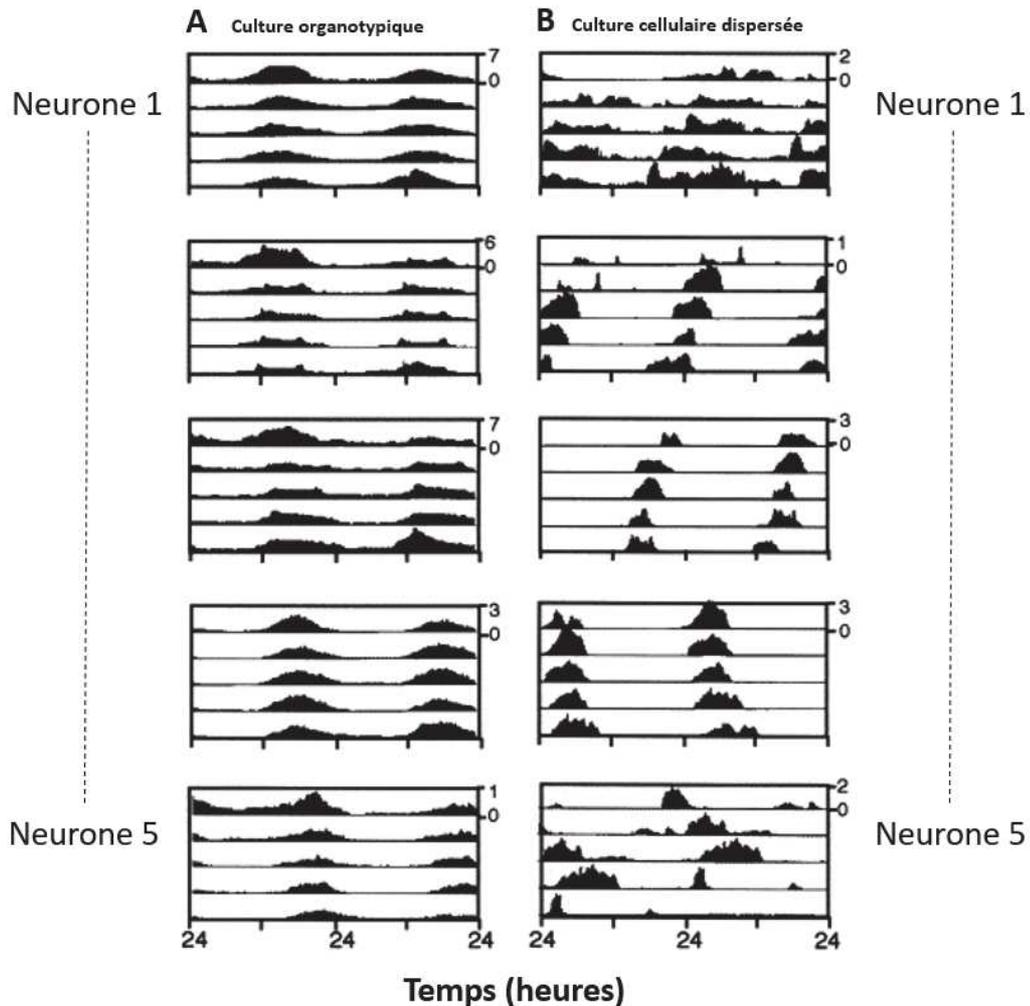


Figure 12 : Le fonctionnement circadien endogène est une propriété intrinsèque du NSC.

- A- Rythmes circadiens de l'activité électrique de 5 neurones différents enregistrés à partir de la même culture organotypique d'une tranche de NSC du rat. Un rythme reproductible entre les différents neurones enregistrés avec une période circadienne proche : 23,9, 23,9, 24,0, 24,0 et 24,1 h du neurone 1 au neurone 5 respectivement.*
- B- Dispersés en culture, les neurones du NSC présentent une rythmicité circadienne assez claire même si elle est peu reproductible d'un neurone à l'autre. La période circadienne est plus étendue allant de 21.3, 21.8, 22.6, 24.5 jusqu'à 25.6 h du neurone 1 au neurone 5 respectivement.*

(Adaptée d'après Honma et al., 2004)

En résumé, au niveau cellulaire, les NSC ont un fonctionnement circadien intrinsèque. La plupart des rythmes persistent lorsque le NSC est isolé de l'environnement et du reste du cerveau. Mais il semblerait que ces rythmes sont plus reproductibles au sein de la tranche, i.e. au sein du réseau du NSC.

I.2.B.3.b / La synchronisation inter-neuronale au sein du NSC : robustesse et précision du pacemaker central

Si la majorité des cellules du NSC sont des oscillateurs autonomes, les rythmes physiologiques et comportementaux générés par le NSC sont la résultante du réseau ou de la cellule ? Nous venons de voir que les travaux pionniers ont démontré que les neurones individuels du NSC sont capables de maintenir des rythmes cellulaires même lorsqu'ils sont dispersés. En se basant sur ces résultats, les neurones du NSC sont des horloges intrinsèques auto-entretenues. En réalité, la situation est un peu plus complexe parce que les neurones du NSC communiquent entre eux de manière à renforcer les rythmes cellulaires unitaires pour générer un rythme robuste et précis au sein du réseau neuronal du NSC. De manière tout à fait intéressante, le NSC est unique dans sa capacité intrinsèque à générer des oscillations circadiennes robustes et précises de l'expression génique et de l'activité électrophysiologique dépendantes de la TTFL. Ces oscillations autonomes peuvent persister indéfiniment *in vivo* et *ex vivo* en culture de tranches organotypiques (Noguchi et al., 2017; Patton et al., 2016). La robustesse de la rythmicité du NSC dépend fortement du réseau formé entre ses neurones, contrairement aux tissus périphériques. C'est typiquement le cas de fibroblastes en culture qui expriment un rythme d'ensemble qui s'amortit très rapidement, alors que le suivi de cellules individuelles indique que leurs rythmes se maintiennent mais se désynchronisent progressivement les uns des autres (Nagoshi et al., 2004; Welsh et al., 2004) (Figure 13).

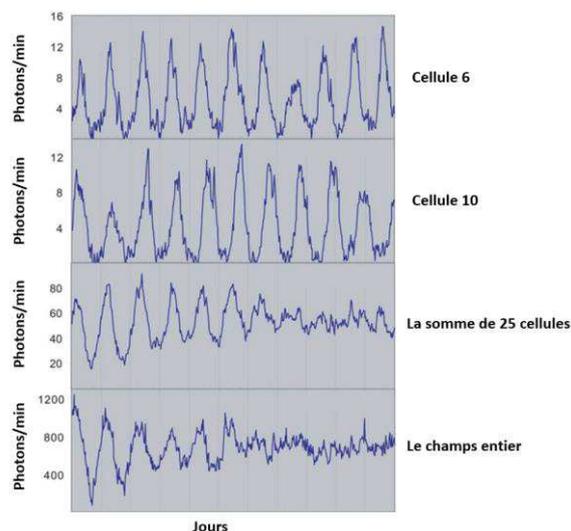


Figure 13 : Désynchronisation des fibroblastes en cultures.

Contrairement aux cellules individuelles (les deux panneaux du haut), l'enregistrement de la bioluminescence émise par le système PER2 : LUC de 25 cellules ou d'un champ entier (les 2 panneaux du bas) en même temps, montre que les oscillations sont amorties au bout de 6 jours.

(Adaptée d'après Welsh DK et al., 2004).

Mais ce n'est pas le cas du NSC. L'une des plus importantes propriétés du NSC est la remarquable coordination de ses oscillateurs cellulaires qui produisent une oscillation circadienne cohérente au niveau tissulaire. En effet, contrairement aux oscillations indépendantes des cellules dissociées, les neurones du NSC présentent une période circadienne identique dans une phase similaire. Lorsque les cellules sont cultivées de manière dissociée, les périodes de leurs rythmes de décharge sont plus dispersées que lorsqu'elles sont maintenues en explant (Herzog et al., 1998; Honma et al., 2004), soulignant que **de la coordination des cellules du NSC dépend la précision du rythme généré au niveau tissulaire** (Herzog et al., 2016).

Il existe une communication en réseau au sein des cellules du NSC qui permet une synchronisation de ces cellules (Liu and Reppert, 2000). Le VIP est le neuropeptide le plus important pour le maintien de la synchronie des cellules et de l'amplitude des rythmes (Patton et al., 2020), tandis que le GABA a un rôle essentiel dans la communication entre les parties dorsale et ventrale des SCN (Slat et al., 2013). L'utilisation de tétrodotoxine (TTX), une drogue communément utilisée pour annihiler les potentiels d'action en bloquant les canaux sodium voltage dépendant (Welsh et al., 1995), dans des coupes intactes du NSC montre une perte de la synchronisation des neurones (Yamaguchi et al., 2003). Cela suggère que les potentiels d'action et la conséquence des transmissions neuronales sont requis dans le maintien de la synchronisation du NSC. Cette remarquable propriété montre qu'il y a un effet réseau qui assure l'harmonisation des rythmes neuronaux au sein du NSC. De plus, les progrès apportés par les enregistrements en bioluminescence, qui permettent de suivre directement la machinerie moléculaire de l'horloge, montrent que plus la densité des cellules est élevée, plus la proportion de cellules oscillantes est importante (Webb et al., 2009).

Parmi les structures oscillantes, le NSC est particulièrement robuste et résilient face à diverses perturbations grâce à son organisation au niveau tissulaire. En effet, les interactions intercellulaires au sein du NSC sont en mesure de compenser la perte du phénotype d'horloge autonome à l'échelle cellulaire, causée par la perte de fonction des gènes horloges. La perte de rythmes de certains neurones peut être compensée par des interactions de ce réseau de neurones, préservant ainsi le rythme global dans le NSC et le rythme comportemental (Liu et al., 2007) (Figure 13). Ainsi, **les communications intercellulaires au sein du NSC sont essentielles à la robustesse du pacemaker central.**

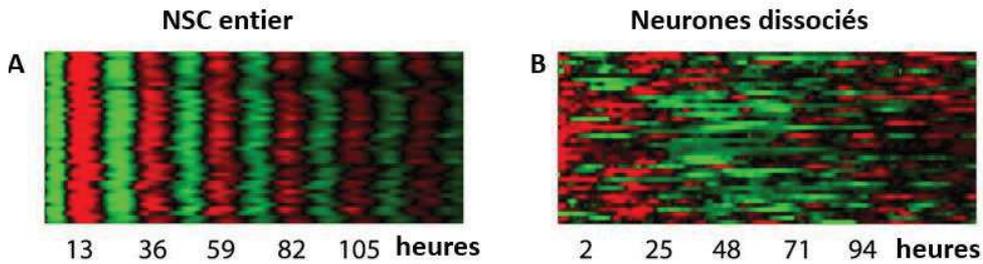


Figure 14 : Les communications intercellulaires au sein du NSC assurent la robustesse contre des mutations de l'horloge.

L'enregistrement des rythmes de PER2 : LUC des souris mutantes Cry1^{-/-} montre que la perte de la rythmicité moléculaire observée dans les cultures cellulaires des neurones dispersés (B) semble être complètement stabilisée et synchronisée au sein des tranches intactes de NSC (A).

(D'après Liu et al., Cell, 2007).

Enfin, il est évident que la robustesse et la précision des rythmes générés par le NSC sont des propriétés émergentes (c'est-à-dire au niveau du réseau) résultant des interactions cellulaires. Ses propriétés émergentes du réseau sont essentielles au rôle primordial circadien du NSC.

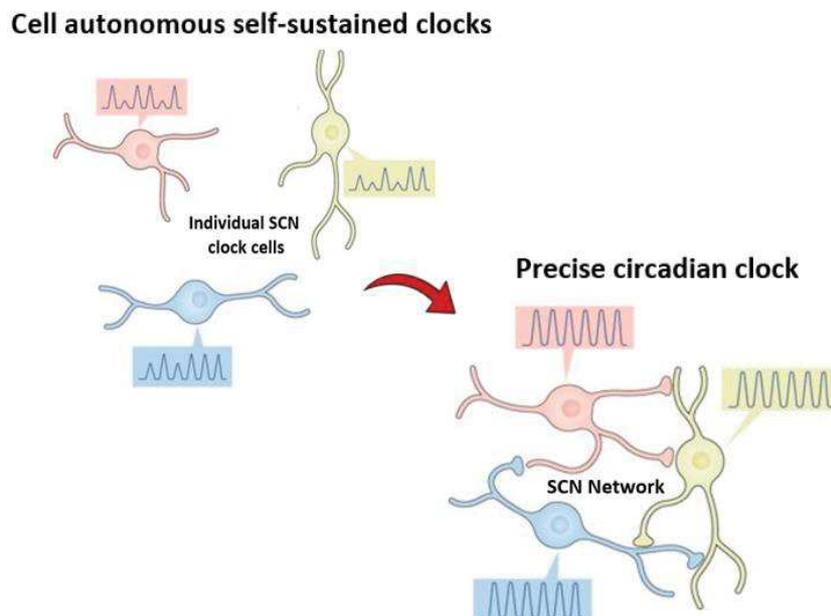


Figure 15 : La communication intercellulaire au sein du NSC : robustesse et précision du pacemaker circadien.

Isolés en culture, les rythmes générés par les neurones du NSC sont mal organisés et de faibles amplitudes. Dans le NSC intact, les interactions cellulaires synchronisent les cellules individuelles de l'horloge, conduisant à des rythmes plus stables, précis, cohérents et de meilleure amplitude.

Une question qui se pose aujourd'hui, quels sont les modules fonctionnels de cohésion et d'organisation qui confèrent les caractéristiques de résilience et de robustesse à ces ensembles de cellules d'horloge qui, individuellement, n'ont pas ces propriétés ? les mécanismes de régulation et d'architecture qui sous-tendent ce mode rythmique robuste restent à élucider (Hastings et al., 2018).

I.3 / Conclusion...de la première partie

Si les chronobiologistes ont bien démêlé les rouages moléculaires de l'horloge biologique, cette grande réalisation, aussi prodigieuse soit-elle, n'est qu'un premier pas vers une compréhension complète des mécanismes de la mesure du temps circadien. Il reste encore à élucider comment les gènes horloges contribuent à la rythmicité cellulaire des neurones du NSC, comment ces activités unitaires sont harmonisées au sein des réseaux neuronaux des NSC et comment l'ensemble s'intègre dans le fonctionnement d'un organisme complexe, lorsque les rythmes environnementaux sont perturbés. L'une des raisons de cette situation est que les efforts de la recherche dans le domaine de la chronobiologie ont tout simplement été entravés par la complexité et l'inaccessibilité des noyaux suprachiasmatiques. D'où la large utilisation des sorties du NSC comme témoin pour étudier l'horloge circadienne, car elles sont souvent plus facilement accessibles, observables et mesurables. C'est d'ailleurs le rythme de l'activité locomotrice qui est le plus souvent utilisé dans le cas de nos dévoués rongeurs de laboratoire. Une autre raison aussi est que l'étude de la fonction circadienne a été d'un autre côté largement dominée par des techniques qui consistent à étudier le NSC dans des préparations *in vitro* ou *ex vivo*. De telles approches réductionnistes sont un excellent moyen pour multiplier les données sur les processus cellulaires, biochimiques au sein de la cellule et même du réseau du NSC, mais qui ne permet pas toujours d'établir un lien très clair avec la fonction physiologique. De même, les efforts récents en transcriptomique cellulaire du NSC ont documenté un NSC encore plus hétérogène qu'on ne le pensait, encore plus complexe (Wen et al., 2020). Cette grande hétérogénéité cellulaire met en évidence des caractéristiques topologiques potentielles du réseau du NSC comprenant plusieurs axes de signalisation dont chacun est constitué de populations cellulaires exprimant des neuropeptides et des récepteurs différents (Wen et al., 2020; Park et al., 2016), mais pour l'instant leurs implications dans la fonction physiologique restent difficiles à interpréter sans outils appropriés. Malgré les précieuses informations qu'on a aujourd'hui sur l'implication du réseau du NSC dans la fonction circadienne, aucune technique encore n'a permis aux chronobiologistes d'étudier l'activité neuronale dans une population à l'échelle cellulaire (pour caractériser par exemple l'hétérogénéité ou la synchronicité entre les cellules) et de relier ensuite cette activité à des fonctions spécifiques (El Cheikh Hussein et al., 2019). Les drosophilistes circadiens ont ouvert la voie et commencent à étudier la topologie fonctionnelle des réseaux cellulaires qui sous-tendent la rythmicité circadienne et l'entraînement photique dans des préparations du cerveau entier ou des mouches

vivantes (Guo et al., 2017; Liang et al., 2017). La traduction de ces approches sur des modèles murins révélera l'architecture des circuits du NSC chez les mammifères. Il y a peu de temps, aller au cœur de l'horloge, étudier ses rouages moléculaires et cellulaires dans son contexte natif n'était qu'un rêve, mais aujourd'hui, ce rêve devient une réalité.

II. Deuxième partie : Voyager au cœur du cerveau pour étudier les réseaux neuronaux in vivo

Ne dit-on pas que le cerveau est l'objet le plus complexe de l'Univers ? Le cerveau et son fonctionnement fascinent depuis l'Antiquité au moins. D'après le Pr Yves Agid, neurologue et membre fondateur de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, *"Le cerveau est en petite ce que l'univers est en grand"*. En tant qu'une fan d'astronomie, cet énoncé ne me laisse pas indifférente. La beauté du cerveau réside dans cette complexité. Malgré les années de recherche qui lui ont été consacrées, le cerveau reste l'un des secrets les plus impénétrables de la nature, en partie parce que **les laboratoires en ont étudié les différents aspects et échelles temporelles indépendamment les uns des autres, faute de moyens technologiques suffisants**. Les avancées incroyables en neurosciences, où la technologie rencontre les récentes découvertes en biologie, sont en train de changer notre façon d'aborder le cerveau et ont rendu ce qui paraissait autrefois impossible (presque) possible. D'après le comité national de la recherche scientifique du CNRS (Rapports du Comité National, 2015), l'un des grands enjeux scientifiques de la prochaine décennie sera de **comprendre le fonctionnement du cerveau dans son ensemble, au niveau cellulaire**. L'Europe décide alors de financer sur 10 ans (un total de 1,2 milliards d'euros) le « **Human Brain Project** », qui vise à simuler par ordinateur le fonctionnement du cerveau. La même année, le National Institute of Health aux États-Unis lance « Brain Initiative », doté de 3 milliards de dollars sur 10 ans, afin de cartographier le fonctionnement de chaque neurone du cerveau (Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC), 2014). Ces actions mises ensemble, notre nouveau siècle ne sera-t-il pas ainsi le siècle de la compréhension du cerveau, comme nous avons connu le siècle du déchiffrement de la matière, puis celui de la maîtrise de la vie ?

II.1 / Neurosciences et technologie : indissociables

Comment le cerveau a-t-il été abordé au fil du temps ? Pour en étudier le fonctionnement, les méthodes ne manquent pas. La première, évidemment, est l'anatomie descriptive. Du moyen âge à la renaissance on a pu décrire le cerveau, siège de « l'âme dirigeante » selon Galien, en ouvrant le crâne des morts. La connaissance du cerveau se limitait à son anatomie globale. En étudiant ensuite le comportement des patients qui souffraient de lésions localisées du cerveau on a mis en évidence le fait que certaines zones ont des fonctions particulières. Comme les premières localisations de certaines fonctions au niveau du cortex et, en premier lieu, les recherches du chirurgien Français Paul Broca sur les aires cérébrales responsables du langage. En le découpant en tranches et en examinant ces tranches au microscope on a découvert qu'il était composé de cellules particulières. Grâce à une nouvelle

technique de coloration par Golgi et Cajal en 1880 une étape cruciale dans l'histoire des neurosciences fut ainsi franchie : la mise en évidence des neurones.

Dès la fin du 19^{ème} siècle, presque tous les développements de la révolution scientifique (les progrès de l'électromagnétisme, de la microscopie, de la chimie organique, etc. ...) donnent lieu à application dans l'étude du cerveau offrant de nouveaux instruments et permettant ainsi de renouveler les méthodes de recherche reposant jusqu'alors sur la seule anatomie descriptive. De la mise au point de l'électroencéphalogramme, la cartographie fonctionnelle du cortex (1ères visualisations des synapses grâce à la microscopie électronique en 1950), l'identification et clonage des neuromédiateurs, des récepteurs et des canaux ioniques (essor de la biologie moléculaire, années 1990), à la mise en évidence de la plasticité cérébrale, il devient alors possible de mieux comprendre les dysfonctionnements, et d'enrichir les connaissances scientifiques sur les bases théoriques de la physiologie intracellulaire et des mécanismes intimes du fonctionnement du cerveau à l'échelle de chaque cellule nerveuse.

En ce début du 21^{ème} siècle, le monde évolue de plus en plus rapidement et les découvertes se succèdent désormais au rythme des percées technologiques. Cependant, les questions quant à elles, deviennent de plus en plus précises : comme par exemple corréler l'activité d'un **réseau neuronal** du cerveau à une tâche comportementale donnée (prise alimentaire par exemple) (Meffre et al., 2019) tout en prenant en compte les modifications anatomo-fonctionnelles éventuelles résultant de cette tâche (plasticité neuronale, les synapses évoluent in-vivo) (Gross et al., 2013) ? Décrire et comprendre un tel réseau nécessite d'abord de relever un défi expérimental dont la difficulté provient de la diversité des échelles rencontrées. L'idéal résiderait dans la fusion des données acquises simultanément par plusieurs techniques, combinant les avantages des unes et des autres.

De technologies émergentes comme l'imagerie fonctionnelle (qui couple l'optique, la génétique et la chimie) à l'aide des indicateurs sensibles aux ions Ca^{2+} , permettent d'accéder à des données précieuses au sein des **réseaux neuronaux natifs**, à l'échelle de la milliseconde, chez l'animal anesthésié ou éveillé.

II.2 / Imagerie longitudinale de neurones in vivo en profondeur chez l'animal éveillé

L'étude du fonctionnement du cerveau nécessite l'enregistrement de l'activité neuronale. La propagation du signal dans un neurone étant de nature électrique, décrypter les potentiels d'action (PA) d'un groupe de neurones et les relier à des fonctions physiologiques spécifiques apparaît comme un devoir primordial. Un crépitement de flashes lumineux parcourant des réseaux de neurones : un grand classique qui schématise l'activité électrique cérébrale souvent adressé à l'attention du grand public. Bien que totalement fantaisiste, cette représentation correspond toutefois à un vieux rêve des neurobiologistes : trouver une méthode permettant une lecture optique de l'activité neuronale pour s'affranchir des limitations inhérentes aux techniques qui ne permettent pas toujours d'identifier avec certitude les types neuronaux enregistrés. Les techniques telles que l'électrophysiologie extracellulaire ne donnent pas d'informations précises sur l'activité électrique de chaque neurone et ne permettent pas toujours d'identifier avec certitude les types neuronaux enregistrés. Quant aux enregistrements de patch-clamp le nombre de neurones qui peuvent être étudiés en même temps est limité, sont invasives et difficiles à réaliser in vivo (Kodandaramaiah et al., 2018). Aujourd'hui, l'imagerie optique nous permet d'observer simultanément une centaine de neurones in vitro ou in vivo, tandis que les indicateurs d'activité codés génétiquement, en particulier les **sondes sensibles au calcium** nous déchiffrent la dynamique spatio-temporelle sous-jacente au réseau neuronal (Lin and Schnitzer, 2016).

II.2.A / Signalisation calcique neuronale

Au sein d'un réseau neuronal les cellules communiquent entre elles principalement via des synapses ou de façon paracrine à distance. Ces deux modes de communication participent au fonctionnement du réseau impliquant des augmentations de Ca^{2+} dans les cellules. Le Ca^{2+} est un messager secondaire universel permettant le contrôle de nombreuses facettes de la physiologie neuronale. Une augmentation de la concentration de Ca^{2+} présynaptique suite à un afflux par les canaux calciques dépendants du voltage (l'une des voies principales d'entrée du Ca^{2+} dans la cellule nerveuse) déclenche la libération de neurotransmetteurs. Les signaux de Ca^{2+} peuvent entraîner des modifications dans la fonction neuronale qui durent de quelques secondes à quelques jours, par le biais d'effets sur les canaux ioniques et la neurotransmission, et peuvent également influencer l'expression des gènes, la croissance neuronale, le

développement neuronal, la survie et la mort. Ces signaux sont organisés dans le temps, l'espace et la magnitude, ce qui leur permet de contrôler de divers événements et d'assurer une signalisation cellulaire spécifique et robuste (Berridge et al., 2000). Au repos et en dehors de toute stimulation, les neurones maintiennent une concentration intracellulaire de Ca^{2+} comprise entre 40 et 100 nM (Sabatini et al., 2002). La réception d'un signal peut entraîner des modifications de la concentration de Ca^{2+} allant d'une élévation très localisée et transitoire à des changements plus durables et globaux dans l'ensemble du neurone (Augustine et al., 2003). Le Ca^{2+} peut pénétrer dans les cellules par les canaux de la membrane plasmique, tels que les canaux calciques dépendants du voltage ou les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), ou être libéré à partir des réserves intracellulaires en réponse à des messagers tels que l'inositol-1,4,5-trisphosphate (Berridge, 1998). L'existence de sites d'entrée locale du Ca^{2+} dans le cytoplasme (à partir de sources externes ou internes) a donné naissance au concept de nanodomains et microdomains du Ca^{2+} (Augustine et al., 2003), dans lesquels la concentration intracellulaire effective de Ca^{2+} pourrait atteindre transitoirement des centaines de micromolaires près de l'embouchure des canaux du Ca^{2+} . Dans les terminaisons nerveuses présynaptiques, les élévations locales des niveaux de Ca^{2+} sont impliquées, par exemple, dans le déclenchement de la libération de neurotransmetteurs par exocytose des vésicules synaptiques en moins de 100 μsec après l'entrée du Ca^{2+} (Sabatini and Regehr, 1996). L'entrée post-synaptique de Ca^{2+} après la neurotransmission peut ensuite générer des élévations localisées de Ca^{2+} dans les épines dendritiques. La concentration de Ca^{2+} peut être augmentée dans les épines dendritiques sans modification de la dendrite adjacente en raison de la diffusion limitée du Ca^{2+} à travers les cols étroits des épines (Sabatini et al., 2002). Un apport synaptique plus important ou plus soutenu à un neurone peut entraîner des vagues de Ca^{2+} dans les dendrites ou des élévations globales de Ca^{2+} dans tout le neurone.

Enfin, dans les neurones, un PA déclenche un afflux important et rapide des ions Ca^{2+} via les canaux membranaires voltages-dépendants. La présence d'un PA peut donc être évalué en mesurant les variations de concentrations de Ca^{2+} intracellulaire (Yasuda et al., 2004). De même, l'activation des récepteurs membranaires par les neurotransmetteurs pendant la transmission synaptique provoque des transitoires de Ca^{2+} dans les épines dendritiques. Ainsi, la mesure des variations de concentrations de Ca^{2+} intracellulaire permet de mesurer indirectement l'activité cellulaire dans des populations neuronales *in vitro* et *in vivo*.

II.2.B / Enregistrer l'activité des neurones avec des indicateurs codés génétiquement : les indicateurs calciques

La mise au point d'indicateurs calciques pour la microscopie à fluorescence a ouvert un large champ de recherche sur les signaux calciques. Ces indicateurs sont générés à partir de molécules sensibles au calcium couplés à des protéines fluorescentes, permettant de voir l'activité des neurones en temps réel, grâce à des méthodes optiques. Aujourd'hui, les sondes calciques encodées génétiquement (ou **GECIs** pour « Genetically Encoded Ca²⁺ Indicators ») et les petites molécules synthétiques sensibles au calcium (Cobbald and Rink, 1987), comme fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985), sont utilisés pour suivre les fluctuations de la concentration de calcium intracellulaire induites par l'activité neuronale. Mais parce qu'il y a toujours un favori, les GECIs l'emportent cette fois ! leur grand avantage comparé aux marqueurs synthétiques est qu'ils permettent de suivre répétitivement sur de longues périodes l'activité calcique d'un type cellulaire spécifique ou d'un compartiment de cellules par imagerie non-invasive (Mao et al., 2008).

II.2.C / Imagerie des zones profondes du cerveau

Alors que l'activité neuronale au niveau du cortex peut être enregistrée directement à travers des fenêtres optiques dans le crâne, la description détaillée de la dynamique de neurones dans des régions profondes du cerveau des mammifères adultes reste insaisissable. Au cours de ces dix dernières années, parallèlement au développement des indicateurs de Ca²⁺ codés génétiquement, de nouvelles techniques innovantes ont rendu possible l'imagerie calcique dans les zones sous-corticales du cerveau in vivo chez l'animal conscient.

II.2.C.1 / Outils optiques pour l'imagerie de fluorescence de neurones in vivo en profondeur

Après avoir remplacé le crâne par une pièce de verre, Kim et al. ont pu imager le cortex cérébral et étudier ainsi l'activité calcique de 25000 à 50000 neurones pyramidaux corticaux sur plusieurs plans focaux (Kim et al., 2016). Cependant cette technique n'est pas adaptable à l'étude de structures cérébrales profondes. Théoriquement, avec des sondes calciques fluorescentes il est possible de mesurer l'activité neuronale partout dans le cerveau. Pratiquement, il n'existe pas de système d'imagerie efficace pouvant atteindre des neurones profonds dans le cerveau sans causer de dommages importants au tissu. Heureusement, des

outils qui permettent à l'expérimentateur de voir "au plus profond" du cerveau ont été développés. Des lentilles à gradient d'indice (lentille GRIN) sont aujourd'hui utilisées afin d'étudier des structures neuronales profondes. Ces petites lentilles de verre ayant des diamètres millimétriques assurent le lien optique entre l'objectif d'un microscope et la structure étudiée. Ces lentilles peuvent permettre la visualisation des épines dendritiques de neurones de l'hippocampe à l'aide d'un microscope optique (Barretto et al., 2009). Leurs caractéristiques leur permettent de relayer les images optiques d'une extrémité à l'autre, avec de très faibles aberrations pour les objets proches de l'axe optique (Antonini et al., 2018). L'utilisation de ces lentilles a permis de faire des études chroniques chez l'animal anesthésié. Les lentilles GRIN sont l'outil parfait pour réaliser des images *in vivo* dans les régions profondes du cerveau, en relayant les signaux à un point au-dessus du crâne où l'acquisition des images peut avoir lieu. La lentille est introduite dans la boîte crânienne de l'animal et est cimentée. Grâce à cette approche, il a été possible d'étudier les gliomes et plus précisément la croissance de la tumeur, l'étude de la vascularisation en 3D et la mesure du flux (Barretto et al., 2011) ce qui a mis en évidence la diminution de la vitesse du flux à mesure que la maladie progresse et ce malgré une augmentation du diamètre des capillaires.

Ainsi, l'imagerie calcique *in vivo*, grâce aux lentilles GRIN, permet d'analyser le fonctionnement du circuit avec une résolution cellulaire et subcellulaire dans le cerveau profond.

II.2.C.2 / Imagerie longitudinale de neurones in vivo chez l'animal conscient

L'utilisation de lentilles GRIN implantées de façon chronique chez l'animal anesthésié permet l'accès aux régions en profondeur du cerveau et d'enregistrer l'activité neuronale dans ses structures. Mais comment établir les relations existantes entre des séquences d'activité neuronale définies et le comportement ? les techniques optiques doivent alors permettre d'appréhender des groupes de neurones avec une résolution cellulaire **chez l'animal conscient**.

II.2.C.2.a / Microscope classique : imagerie en configuration « tête fixée »

Afin d'effectuer de l'imagerie cérébrale profonde chez les animaux conscients, les rongeurs sont maintenus sous un microscope à épifluorescence par une pièce métallique cimentée au crâne (Figure 16). Les animaux conservent la capacité de se déplacer sur une roue ou un cylindre afin d'avoir une impression de mouvement et de réduire le stress due à la contention sous le microscope pendant les expériences. Cette approche a été utilisée pour faire de l'imagerie calcique dans des zones profondes du cerveau (Bocarsly et al., 2015), et même dans deux zones en même temps : le cortex visuel primaire et la zone visuelle latérale. Cette étude a permis d'enregistrer l'activité calcique de 100 à 300 neurones et de montrer la dépendance de la zone visuelle latérale sur le cortex visuel primaire (Lecoq et al., 2014). Un grand avantage de l'imagerie du cerveau profond en configuration tête fixée est que les microscopes conventionnels "de table" offrent une excellente qualité d'image, et qu'il est même possible d'enregistrer l'activité des structures subcellulaires (Meng et al., 2019). Mais d'un autre côté, ce système est inadapté pour des études nécessitant un suivi longitudinal de long durée et incompatible avec des études sur le stress par exemple.



La souris est sur une roue, elle est maintenue par un système fixé à la pièce métallique collé sur son crâne avec le ciment dentaire. L'objectif du microscope est aligné avec la lentille GRIN implantée.

(D'après Hoa et al., 2019).

Figure 16 : Schéma du système d'imagerie en configuration « tête-fixée ».

II.2.C.2.b / Miniscopes

Aujourd'hui, l'imagerie cérébrale profonde peut être réalisée chez l'animal éveillé avec un microscope classique sur des animaux vigiles restreint dans leurs mouvements, mais aussi sur des animaux éveillés et mobiles à l'aide d'un microscope miniaturisé monté sur la tête.

En 2011, le groupe de Mark Schnitzer a présenté pour la première fois le microscope miniaturisé (miniscope) à épifluorescence (Ghosh et al., 2011). Il est petit, léger et facile à monter sur la tête d'une souris, permettant enfin de réaliser des études comportementales en les reliant à l'activité des circuits neuronaux chez des animaux conscients et mobiles (Figure 17). Des études longitudinales, sur de longues durées sans stress ni douleur sont ainsi devenues faisables. Grâce à cette avancée technologique, des études extraordinaires sont en train de voir le jour. Par exemple, la faim et la soif influencent toutes les deux l'ingestion, mais on ignore si les circuits sous-jacents à ces états sont reliés. Pour répondre à cette question, Gong et al. (Gong et al., 2020), ont utilisé l'imagerie calcique pour évaluer les réponses de la circuiterie neuronale lors du comportement alimentaire. Ils ont montré qu'une population de neurones glutamatergiques dans le péri-*locus caeruleus* (periLC), réagit pendant la consommation d'aliments ou de boissons appétissants. L'augmentation des réponses de ces cellules induit par l'appétence favorise à son tour la faim hédonique. Ainsi, l'imagerie calcique à résolution cellulaire in vivo, chez la souris vigile et libre de ses mouvements, nous éclaire sur *des nouveaux aspects de* la physiologie cellulaire de cerveau en lien avec l'environnement externe.



La souris est libre de ses mouvements. L'objectif du miniscope est aligné avec la lentille GRIN implantée et fixé sur la tête de la souris.

Figure 17 : Système d'imagerie en configuration « freely moving ».

II.3 / Conclusion...de la deuxième partie

Combiné à une lentille GRIN implantée de façon chronique au-dessus de la zone à étudier, le microscope miniature permet d'enregistrer l'activité calcique d'une centaine de neurones dans les régions profondes du cerveau pendant des mois. Le fait de pouvoir étudier l'activité de neurones spécifiques dans des zones inaccessibles chez des animaux éveillés et en temps réel offre une opportunité incroyable et inestimable d'élargir notre compréhension de la façon dont le cerveau contrôle différentes fonctions. En outre, l'imagerie cérébrale in vivo chez des animaux conscients permet des études longitudinales, offrant ainsi la possibilité d'utiliser des animaux (et même des neurones individuels) comme contrôles internes avant un défi (par exemple, stress, grossesse, perturbation circadienne).

III. Problématique

Comme nous venons de le voir, les propriétés émergentes du circuit du NSC sont à l'origine de la précision des rythmes physiologiques et comportementaux. Bien que les neurones individuels du NSC puissent fonctionner comme des oscillateurs circadiens indépendants (Welsh et al., 1995), le réseau du NSC contribue à renforcer la rythmicité cellulaire (Webb et al., 2009). Malgré les précieuses informations que nous avons aujourd'hui sur l'origine de la rythmicité circadienne, la nature et les propriétés de la remarquable coordination cellulaires au sein du NSC (Hastings et al., 2018) restent toujours à élucider. En effet, les chronobiologistes n'ont pas encore pu étudier la physiologie du réseau cellulaire du NSC avec une résolution cellulaire *in vivo* afin de pouvoir caractériser les propriétés qui rendent les cellules horloges individuelles un véritable pacemaker circadien. Néanmoins, l'évolution technologique en génétique et en neurosciences nous permet aujourd'hui de visualiser l'activité d'une cellule au sein du tissu natif *in vivo*. L'application de ces approches en chronobiologie pourrait aider à révéler l'architecture des circuits du NSC chez les mammifères. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse **d'imagerie des NSC *in vivo*, chez la souris vigile et libre de ses mouvements, rendu possible grâce à l'utilisation du mini-microscope nVista adapté à la souris, permettant de pratiquer de l'imagerie de fluorescence *in vivo* avec une résolution cellulaire.**

Les neurones du système circadien des vertébrés et des invertébrés présentent des variations de calcium intracellulaire sur 24h, appelé le « CCR » (Circadian Calcium Rhythm). En effet, chez les mammifères la concentration en calcium cytosolique dans les neurones du NSC fluctue spontanément de manière circadienne (Colwell, 2000; Ikeda et al., 2003a). Une des premières études mesurant le calcium intracellulaire libre a rapporté un rythme circadien du $[Ca^{2+}]_i$ qui dépend de l'activité neuronale (Colwell, 2000). Des études ultérieures ont révélé des rythmes du $[Ca^{2+}]_i$ qui persistent en l'absence de décharge neuronale (Enoki et al., 2012) mais qui sont supprimés par des bloqueurs des réserves de calcium intracellulaire sensibles à la ryanodine (Ikeda et al., 2003). Bien que les mécanismes qui pourraient contribuer à la variation de calcium intracellulaire sur 24 heures dans les neurones du NSC ne sont pas encore bien compris, le CCR est autonome au niveau cellulaire. En effet, dans des cellules dispersées le $[Ca^{2+}]_i$ présente un rythme circadien autonome, mais ce rythme est renforcé au sein du réseau du NSC (Noguchi et al., 2017), renforçant l'intérêt d'étudier la physiologie du réseau cellulaire du NSC. En outre, le CCR dépend de l'horloge moléculaire. En effet, le CCR est perturbé lorsque l'horloge moléculaire n'est plus fonctionnelle chez des souris mutantes pour les gènes horloges *CRY* et *Bmal1* (Enoki et al., 2017a; Ikeda and Ikeda, 2014). De plus, des études

antérieures ont montré que des taux adéquats de calcium extracellulaires étaient essentiels pour maintenir la rythmicité moléculaire dans le NSC (Lundkvist, 2005; Harrisingh et al., 2007). Ainsi, le CCR forme une boucle noyau-cytoplasme conservée au cours de l'évolution et est au cœur du fonctionnement de l'horloge puisqu'il est à la fois en amont et en aval de la boucle des gènes horloges. Les pics de $[Ca^{2+}]_i$ précèdent les pics de PER2 dans les tranches de NSC (Brancaccio et al., 2013; Enoki et al., 2017a) et semblent suivre un parcours spatiotemporel bien déterminé similaire à celui précédemment décrit pour *Per1* et PER2 (Yamaguchi et al., 2003; Foley et al., 2011; Enoki et al., 2012). En effet, un profilage/mapping des acrophases au sein de la tranche du NSC montre qu'il existe une hétérogénéité régionale dans le rythme circadien du calcium (Figure 18a), avec une plus grande amplitude et une phase plus retardée dans la région ventrale que dans la région dorsale (Enoki et al., 2012, 2017b) (Figure 18b).

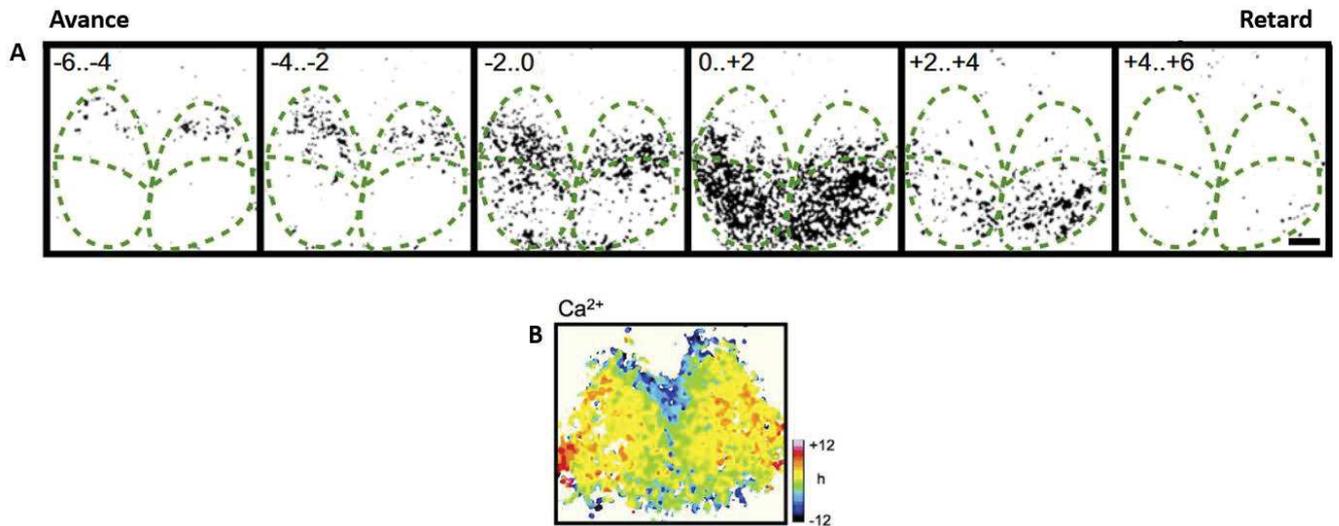


Figure 18 : Spécificité topologique des rythmes circadiens du calcium.

A- Hétérogénéité régionale dans le rythme circadien du calcium. Images prises toutes les heures montrant la distribution de l'acrophase du calcium cellulaire au sein de la tranche du NSC.

B- Carte spatiotemporelle montrant l'acrophase du calcium.

(D'après Enoki et al, 2012, 2017b).

Ainsi, bien que le CCR des neurones des NSC apparaisse coordonné, toutes les cellules ne sont pas synchrones dans les tranches, et des différences de phase existent entre les différentes zones. Nous avons utilisé l'imagerie cellulaire in vivo pour étudier la phase du CCR cellulaire dans les NSC intacts de souris adultes. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la relation de phase du CCR par rapport au cycle jour-nuit, normal ou perturbé.

En plus de notre intérêt pour le CCR, nous nous sommes intéressés aussi à un autre aspect du calcium intracellulaire dans les NSC. Dans les systèmes neuronaux le Ca^{2+} code de nombreuses fonctions cellulaires (grâce notamment à une modulation en fréquence et en amplitude) (Gu and Spitzer, 1995), via des fluctuations qui sont relativement rapides, sur des échelles de temps allant de 100 millisecondes à quelques secondes. Toutefois, pour les NSC de mammifères, la dynamique rapide du calcium reste encore paradoxalement une question sans réponse claire : Est-ce que l'activité calcique des cellules du NSC repose uniquement sur le rythme circadien du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ou d'autres cinétiques, offrant un codage plus complexe, sont présentes ? Notre compréhension actuelle de la physiologie du réseau cellulaire du NSC à partir des études sur tranches aiguës ou en culture organotypiques témoigne que l'horloge centrale repose sur le couplage intercellulaire pour produire des rythmes cellulaires hautement coordonnés. Des voies cellulaires, impliquant du Ca^{2+} (Brancaccio et al., 2013), assurent la coordination circadienne dans l'ensemble du NSC. Ces données suggèrent une transduction calcique rapide du signal dans les cellules connectées. Pourtant, l'existence de signaux calciques rapides, reste incertaine dans les NSC (Hong et al., 2010). **Nous avons donc recherché la présence d'éventuelles fluctuations rapides du Ca^{2+} cytosolique dans les NSC in vivo, en prêtant une attention particulière à leur régulation spatio-temporelle au cours du cycle jour-nuit.** Notre approche expérimentale nous permet ainsi d'aborder les signaux calciques sur plusieurs échelles de temps avec une résolution cellulaire dans les NSC de souris adultes libres de leurs mouvements.

IV. MATERIELS ET METHODES

IV.1 / Opérations chirurgicales

Toutes les expériences ont été faites en accord avec les comités d'éthique et la saisine suivante : APAFIS#15032-2018050918181227 v2.

IV.1.A / Anesthésie

Pour toutes les expériences de chirurgie, les souris mâles sauvages de fond génétique C57Bl/6 et transgéniques âgées de 8 semaines ont été anesthésiées à l'aide d'une injection intrapéritonéale (i.p.) combinée de xylazine (Rompun, 10 mg/kg) et de kétamine (Imalgène 500, 75 mg/kg) en règle avec des conditions aseptiques. Cet anesthésique a été choisi car il permet un endormissement rapide et de courte durée, compatible avec la durée des interventions chirurgicales pratiquées dans cette expérimentation. Ce mélange est très bien toléré par les animaux, et grâce à l'effet analgésique de la xylazine qui dure plusieurs heures, il permet un bon réveil de ces derniers.

IV.1.B / Injection intracérébrale de différents vecteurs viraux

Injection intracérébrale de différents vecteurs viraux dans le but d'une manipulation génétique conditionnelle dans les noyaux suprachiasmatiques des souris.

Une injection intracérébrale d'un vecteur viral permet la manipulation génétique de populations distinctes de neurones ou des régions particulières du système nerveux central. L'AAV (virus adéno-associés) est un parvovirus humain déficient, non pathogène. Aucune maladie ne lui est associée. Les parvovirus sont parmi les plus petits et les plus simples virus à ADN infectant les animaux. Plusieurs sérotypes d'AAV ont été identifiés, et sont classés selon des différences se situant au niveau des protéines de la capsid virale. Par définition un nouveau sérotype est un virus qui ne réagit pas avec des anticorps neutralisants dirigés contre les sérotypes existants et déjà caractérisés. A ce jour, douze sérotypes ont été identifiés et classés d'AAV1 à AAV12. Chaque sérotype possède un tropisme préférentiel d'infection bien que pas exclusif pour un organe ou un type cellulaire.

Pendant mon stage de Master 2, j'ai déterminé les coordonnées stéréotaxiques des NSC et comparé la capacité et la qualité d'infection de trois sérotypes différents de AAV (AAV5, AAV8 et AAV9) dans ces noyaux.

IV.1.B.1 / Mise au point

IV.1.B.1.a / Stéréotaxie

Les souris sont placées sur un cadre de stéréotaxie (KOPF instruments) après anesthésie. L'horizontalité entre bregma (coordonnées : 0, 0, 0) et lambda (croisement des sutures) est vérifiée. La différence d'horizontalité ne doit pas excéder 0,05mm. La distance bregma-lambda est une donnée reflétant la taille du cerveau et permettant si besoin de modifier les coordonnées stéréotaxiques en fonction de cette évaluation de la taille du cerveau. Un gel ophtalmique est appliqué sur les yeux pour éviter leur dessèchement. La chirurgie se fait sous une loupe binoculaire (Stemi 508, Zeiss). Le scalp est incisé le long de la ligne médiane et un petit trou est réalisé grâce à un outil de fraisage au-dessus de la zone d'intérêt en utilisant les coordonnées stéréotaxiques appropriées. Une aiguille de 200µm de diamètre (NF33BV-2, WPI) montée sur une seringue Hamilton (NANOFIL, WPI) de 10µl est utilisée. Cette seringue est reliée au bras stéréotaxique et est montée sur un micro-injecteur (WPI-Micro4). La descente de l'aiguille vers le site d'injection se fait lentement et progressivement. Dix minutes d'attente sont nécessaires avant de procéder à l'injection pour permettre à l'aiguille de transpercer les méninges et au cerveau de reprendre sa forme initiale. La solution souhaitée est alors injectée à un débit de 0,05 µl/min. En fin d'expérience le même délai est nécessaire pour permettre la diffusion de la solution injectée dans le tissu avant de retirer l'aiguille (pour éviter un risque d'aspiration de la solution déposée hors de la structure). Après injection, la peau est suturée à l'aide de fil de soie (FK941, Ethicon). Afin d'éviter toute douleur, les souris reçoivent un antalgique : du Kétoprofène (1mg/ml, injection de 50µl en intra-musculaire).

Les souris sont placées sur une couverture chauffante (à 37°C) pendant et après chirurgie jusqu'au réveil complet et un suivi post-opératoire est mis en place (vérification de l'état général de la souris et de la cicatrisation). Lorsque l'animal est complètement réveillé, il retourne dans l'animalerie.

IV.1.B.1.b / Détermination des coordonnées stéréotaxiques des NSC

La première étape de mise au point était de déterminer les coordonnées stéréotaxiques des noyaux suprachiasmatiques (NSC). Des injections soient uni-latérales soient bilatérales de différents volumes (μl) du colorant bleu de méthylène à des vitesses différentes aux différentes coordonnées stéréotaxiques ont été réalisées. Des souris sauvages qui ont subi une injection de ce colorant bleu préalablement filtré dans le cerveau, ont été ensuite sacrifiées et les cerveaux ont été fixés immédiatement post-injection par immersion dans du PFA 4%. Les coordonnées stéréotaxiques sont prises à partir du croisement des sutures antérieures sur le point bregma (coordonnées : 0 ;0 ;0). En utilisant les coordonnées stéréotaxiques du NSC citées dans la littérature : -0,30 mm en antéro-postérieur (AP), +/- 0,35 mm en médio-latéral (ML) et entre -5,5 mm en dorso-ventral (DV) nous retrouvons une diffusion de bleu nette parallèle au troisième ventricule mais qui reste très dorsale par rapport au NSC (Figure 19A). En réajustant ces coordonnées (0 mm en AP ; -0,25 mm en ML ; -5,7 mm en DV), l'injection de bleue se trouve exactement au-dessus du NSC (Figure 19B). Ces coordonnées stéréotaxiques permettent de déposer la solution souhaitée (vecteur viral pour notre cas) au niveau des NSC sans les léser. J'ai utilisé ces coordonnées-là qui ont été utilisées dans la suite de mes expérimentations.

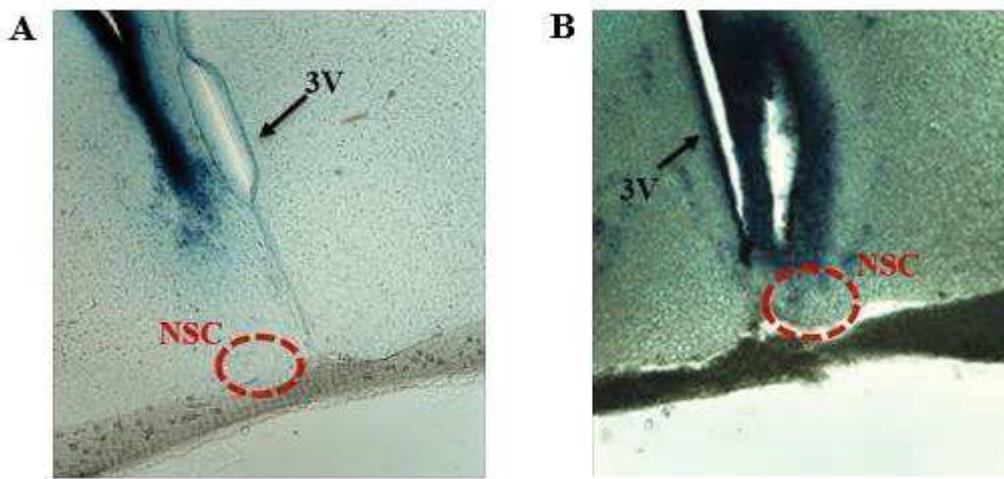


Figure 19 : Coupes coronales du cerveau au niveau du NSC.
Coupes d'épaisseur de 50 μm coupées au vibratome.

IV.1.B.1.c / Infections virales : détermination de la capacité et la qualité d'infection de trois sérotypes différents de virus adéno-associés (AAV)

La deuxième étape de mise au point était de trouver le vecteur viral le mieux efficace pour notre zone d'intérêt.

Les trois sérotypes testés sont les suivant :

- rAAV5 / sspEMBOL-CBA-GFP (8×10^{12} GC / mL ; UNC)
- rAAV8 / sspEMBOL-CBA-GFP (8×10^{12} GC/mL ; UNC Vector Core)
- AAV9-CAG-GFP ($\geq 7 \times 10^{12}$ vg/mL ; Addgene).

Ces AAV expriment la GFP (Green Fluorescent Protein) sous contrôle d'un promoteur fort (CBA, Chiken Beta Actin). Différentes populations de cellules se trouvent dans les NSC de rongeurs. Ces types cellulaires sont distribués de façon dissymétrique dans les NSC et permettent de définir une partie dorso-médiane constituée de neurones exprimant la vasopressine (AVP) et une partie ventro-latérale qui renferme les neurones exprimant le peptide intestinal vasoactif (VIP). Nous avons donc vérifié quelle (s) population neuronale était préférentiellement infectée par chaque sérotype AAV.

Après un temps d'infection de trois semaines nécessaires pour l'expression de la GFP, les souris infectées par l'AAV5 (n=5), par l'AAV9 (n=6) et l'AAV8 (n=5) ont été sacrifiées. Les coupes de cerveaux refermant notre zone d'intérêt réalisées pour chaque sérotype d'AAV ont été immunomarquées. Nous avons utilisé un marquage anti-GFP pour amplifier le signal endogène de l'infection, et des marquages anti-AVP et anti-VIP pour pouvoir déterminer la qualité de l'infection de chaque AAV au niveau des NSC, et un marquage Dapi pour marquer les noyaux. Nous remarquons que les deux virus AAV5 et AAV9 suite à une injection unilatérale sont capables d'infecter les NSC des deux côtés. Nous observons une infection nette et précise, sauf du côté de l'injection due forcément au reflux de virus au moment de la remontée de la seringue (Figure 20). Nous remarquons aussi que les virus présentent une spécificité géographique. Les AAV5 et AAV8 semblent infectés la partie ventrale et le AAV9 la partie dorsale (Figure 20).

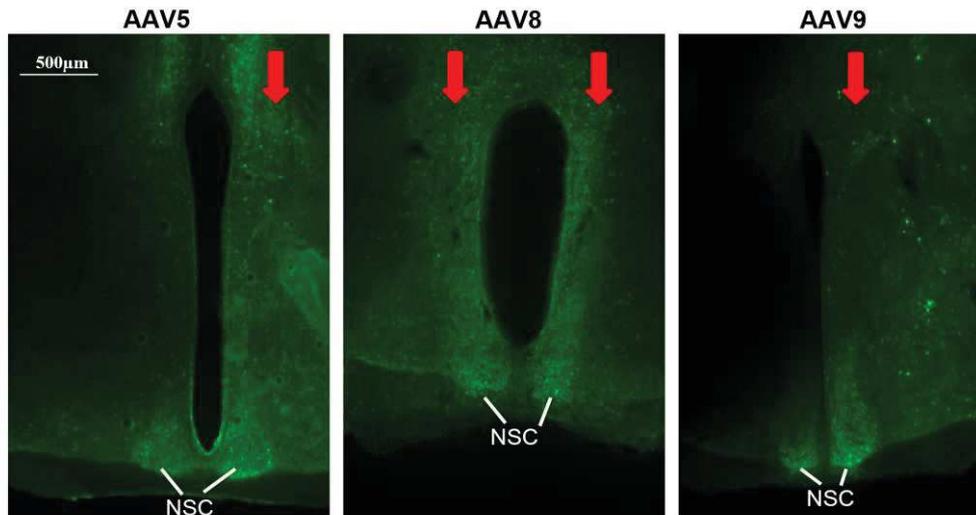


Figure 20 : Coupes coronales des cerveaux infectés par l'AAV5, AAV8 et AAV9 au niveau des NSC.

Imagées en microscopie (Zeiss apotome) 10x. Flèche blanche pour montrer les NSC. Flèche rouge pour montrer si infection unilatérale ou bilatérale et de quel côté.

Les doubles marquages GFP-AVP et GFP-VIP nous ont permis de tirer plusieurs informations concernant la qualité d'infection de chaque sérotype au niveau des NSC. Nous avons observé que l'AAV5 et l'AAV8 ne pénètrent pas dans les neurones à AVP et infectent majoritairement les neurones à VIP partie dorsale du NSC (Figure 21A-B). Contrairement à ces deux sérotypes, l'AAV9 infecte les deux types neuronaux, à AVP et à VIP et donc la quasi-totalité du NSC (Figure 21C).

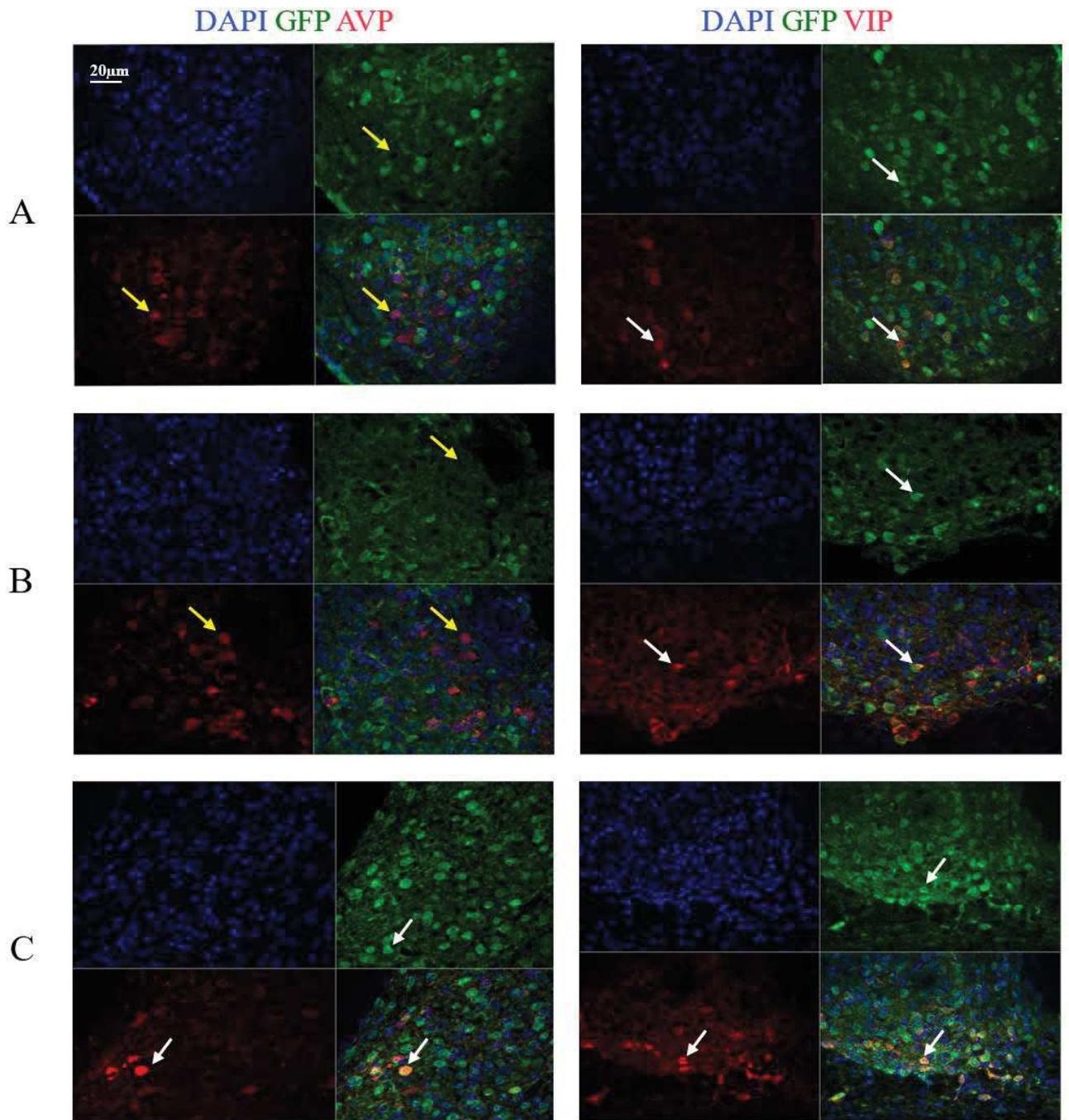


Figure 21 : Coupes des cerveaux infectés par l'AAV5, AAV8 et AAV9 au niveau des NSC.

En (A) AAV5, (B) AAV8 et (C) AAV9. Imagées en microscopie (Zeiss apotome) 40x. En bleue coloration DAPI, en vert GFP, en rouge AVP ou VIP. Les flèches blanches montrent les neurones AVP ou VIP qui sont comarqués avec la GFP, et donc qui sont infectés par les virus. Les flèches jaunes montrent les neurones AVP ou VIP qui n'ont pas été infectés par les virus.

Cette mise au point d'outils pour étudier les NSC m'a permis de tirer quelques informations intéressantes pour la suite :

- 1- Une injection unilatérale semble suffisante pour infecter les deux NSC, ce qui permettra une diminution de nombres de lésions au niveau cérébrale et une diminution de la quantité d'AAV injectée.
- 2- Les sérotypes AAV5 et AAV8 infectent tous les deux préférentiellement les neurones à VIP et donc infecte plutôt la partie ventro-latérale des NSC.
- 3- Le sérotype AAV9 infecte les deux types cellulaires et donc permet d'infecter tout le NSC.

Sur la base de cette mise au point faite durant mon stage de Master 2, le vecteur AAV9 nous semblait être le meilleur candidat pour suivre l'activité neuronale par imagerie calcique de tout le NSC.

Les souris utilisées pour les expériences suivantes doivent faire au minimum 20g afin de résister à l'anesthésie, l'injection du virus et à la pose de la lentille.

IV.1.B.2 /Expressions des sondes calciques au niveau du NSC

Pour suivre l'activité neuronale des NSC par imagerie calcique, différents AAV ont été utilisés lors de cette thèse :

- AAV9-CAG-GCaMP6f-WPRE-SV40 ($\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL; Addgene).
- AAV9-CAG-Flex-GCaMP6m-WPRE-SV40 ($\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL; Addgene).
- AAV9-SYN-GCaMP6m-WPRE-SV40 ($\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL; Addgene).

Les souris sont placées sur un cadre de stéréotaxie (KOPF instruments) après anesthésie. L'horizontalité entre bregma et lambda (croisement des sutures) est vérifiée ainsi que le rapport entre bregma et lambda pour modifier si besoin les coordonnées stéréotaxiques en fonction de cette évaluation de la taille du cerveau. Un gel ophtalmique est appliqué sur les yeux pour éviter leur dessèchement. La chirurgie se fait sous une loupe binoculaire (Stemi 508, Zeiss). La peau est coupée et enlevée sur une large partie du crâne afin de dégager une base importante pour l'injection du virus et la pose de la lentille par la suite. Une injection de 1 μ l du virus à 50 nl/seconde est réalisée à l'aide d'une seringue Hamilton (A) fixée à un microinjecteur, par approche stéréotaxique, aux coordonnées (0 mm ; +/- 0,25 mm ; -5,7 mm) (Figure 22).



Figure 22 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 1^{ère} étape. Injection de la sonde calcique au sein du NSC.

IV.1.C /Implantation de lentilles GRIN

Une lentille GRIN (Graded-Index (GRIN) (diamètre : 0,6mm, longueur : 7,45mm, distance de travail : 0,15mm, ouverture numérique (NA) : 0,5, référence : NEM-060-15-15-520-S-1.5p, GRINTECH GmbH) est ensuite insérée au niveau de la craniotomie aux coordonnées stéréotaxiques suivantes : 0 mm en antéro-postérieur, +/- 0,25 mm en latéral et -5,5 mm en dorso-ventral, 200 µm au-dessus du site de dépôt du virus pour respecter la distance de travail (Figure 23). Cette lentille est placée dans un système élaboré au laboratoire permettant d'insérer verticalement la lentille à travers le tissu et directement aux bonnes coordonnées (Figure 24). Du peroxyde d'oxygène est passé sur le crâne pour assainir l'os. Deux solutions photopolymérisables (Optibond FL, Kerr) utilisées en chirurgie dentaire sont ensuite enduites sur l'os, l'une pour le préparer et la seconde pour permettre l'adhésion du ciment dentaire à la surface du crâne. La lumière bleue nécessaire pour la photopolymérisation provient d'une lampe à usage dentaire (Lampe Bluephase 635153, Ivoclar Vivadent). L'os est séché après chaque étape. Les souris sont placées sur une couverture chauffante (à 37°C) pendant et après chirurgie jusqu'au réveil complet et un suivi post-opératoire est mis en place (vérification de l'état général de la souris et de la cicatrisation).



Figure 23 : Imagerie calcique du cerveau profond *in vivo* chez la souris vigile, 2^{ème} étape. Implantation d'un relais optique (lentille GRIN) au-dessus du NSC.

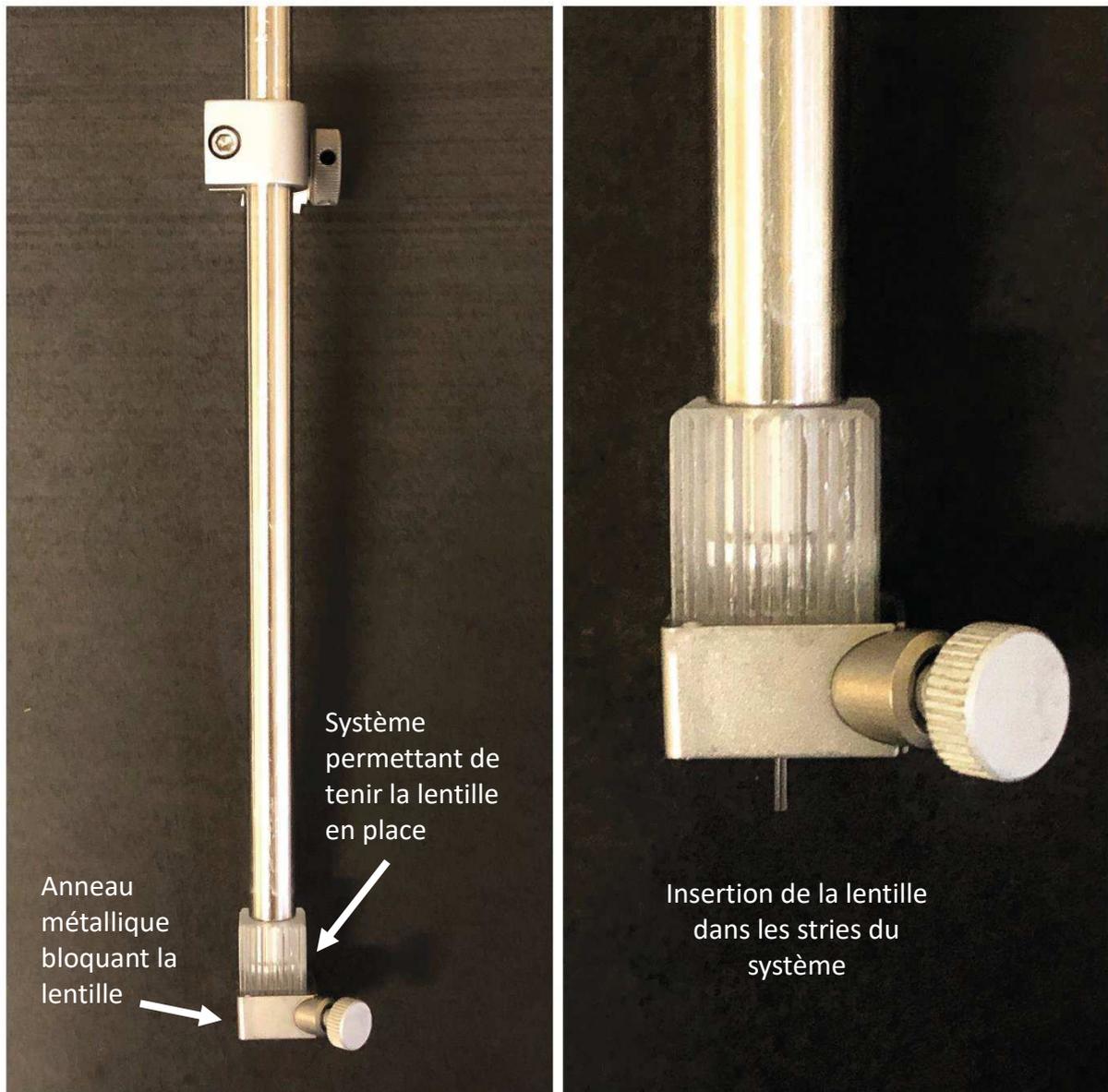


Figure 24 : Système d'implantation de lentilles GRIN.

1. La GRIN est insérée dans les stries du système d'implantation.
2. Les coordonnées de bregma sont refaites avec la GRIN (0 ;0 ;0)
3. En faisant plusieurs allers-retours dans le tissu, la lentille est ensuite positionnée aux coordonnées suivantes (0 mm en antéro-postérieur, +/-0,25 mm en latéral et 5,5 mm en dorso-ventral).
4. La lentille se situe maintenant aux bonnes coordonnées stéréotaxiques.
5. La lentille est séchée et un point de ciment dentaire permet de la coller à l'os.
6. L'anneau métallique est ensuite desserré pour pouvoir sceller la lentille au crâne avec du ciment dentaire. Toute la surface du crâne qui a été mise à nue est recouverte de ciment dentaire.
7. Un fond d'Eppendorf (200µl) est collé (glue, Loctite) au-dessus de la lentille.

IV.1.D / Fixation d'une base d'accueil

Une base d'accueil est ensuite fixée sur le crâne de la souris. Elle est magnétisée sur les quatre côtés, et permet au mini-microscope d'être fixé facilement sur la tête de la souris au moment de l'enregistrement (Figure 25).

Les souris sont placées sur un cadre de stéréotaxie (KOPF instruments) après anesthésie. La base d'accueil est placée dans un système fourni avec le miniscope permettant de la poser à la bonne distance de la lentille. L'expérimentateur est libre de choisir le champ et le focus qu'il souhaite enregistrer. La base d'accueil est ensuite scellée au crâne avec du ciment dentaire.



Figure 25 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 3ème étape.

IV.2 / Imagerie calcique : souris vigile

IV.2.A / Entraînement et habituation des animaux

Les expériences sont effectuées chez des souris vigiles, conscientes, libres de leurs mouvements. Ces souris sont manipulées tous les jours, avec le même expérimentateur, pour réduire le stress lié aux expériences faites sur souris conscientes. Lors de ces périodes journalières d'habituation, les souris sont mises dans les conditions expérimentales à de nombreuses reprises (plusieurs fois par semaines) avant et après chirurgie toujours dans l'optique de diminuer le stress pendant les expériences. L'entraînement consiste à habituer la souris à être manipulée, soulevée par le même utilisateur et à être mise dans les conditions de l'expérimentation : elle est mise en cage d'expérimentation, avec les appareils allumés (ex : ordinateur, lampe...) pour s'habituer au bruit. De plus, elles sont mises en contact avec le

matériel utilisé : un mini-endoscope leurre qui fait exactement le même poids que le vrai microscope est fixé sur la tête de la souris pour s’y habituer et sont entraînées à accepter la prise de sang nécessaire au dosage des hormones.

IV.2.B / Etat physiologique de l’animal

Des prélèvements de sang en mimant les conditions expérimentales (mini-endoscope fixé sur la tête de la souris) ont été effectués à la queue de la souris pour un dosage hormonal de la corticostérone (CORT), pour évaluer l’état physiologique de l’animal. Chez les rongeurs, la CORT est la plus importante et la plus abondante hormone de stress. La sécrétion de la CORT par la glande surrénale augmente progressivement à partir de son minimum au cours de la journée pour atteindre son maximum début de la nuit (Spiga et al., 2014). Des niveaux élevés de CORT sanguin reflète un état de stress chez l’animal. Les profils de sécrétion de la CORT chez 6 souris différentes, montrent une nette variation circadienne sur la période de 24 heures avec des niveaux normaux et ils continuent à avoir l’élévation qui correspond au début de la phase d’activité (Figure 26).

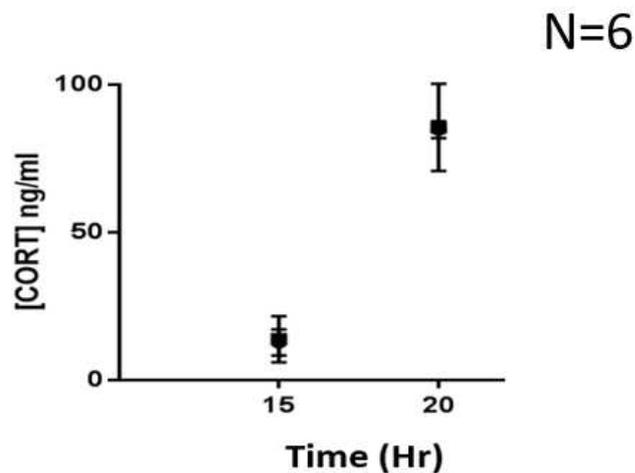


Figure 26 : Contrôle de la sécrétion de la corticostérone.

IV.2.C / Conditions expérimentales et protocoles d'imagerie calcique

Les souris ont eu au préalable une injection stéréotaxique d'AAVs exprimant la GCaMP6 et une implantation de lentille GRIN au-dessus des noyaux suprachiasmatiques. Des expériences permettant de visualiser l'activité calcique des cellules neuronales du NSC à travers la lentille GRIN sont alors possibles. Quatre semaines après l'opération et l'habituation nécessaire, le miniscopie est fixé sur la tête de l'animal (Figure 27). La longueur d'onde d'excitation est de 480nm et la longueur d'onde d'émission de 520nm.

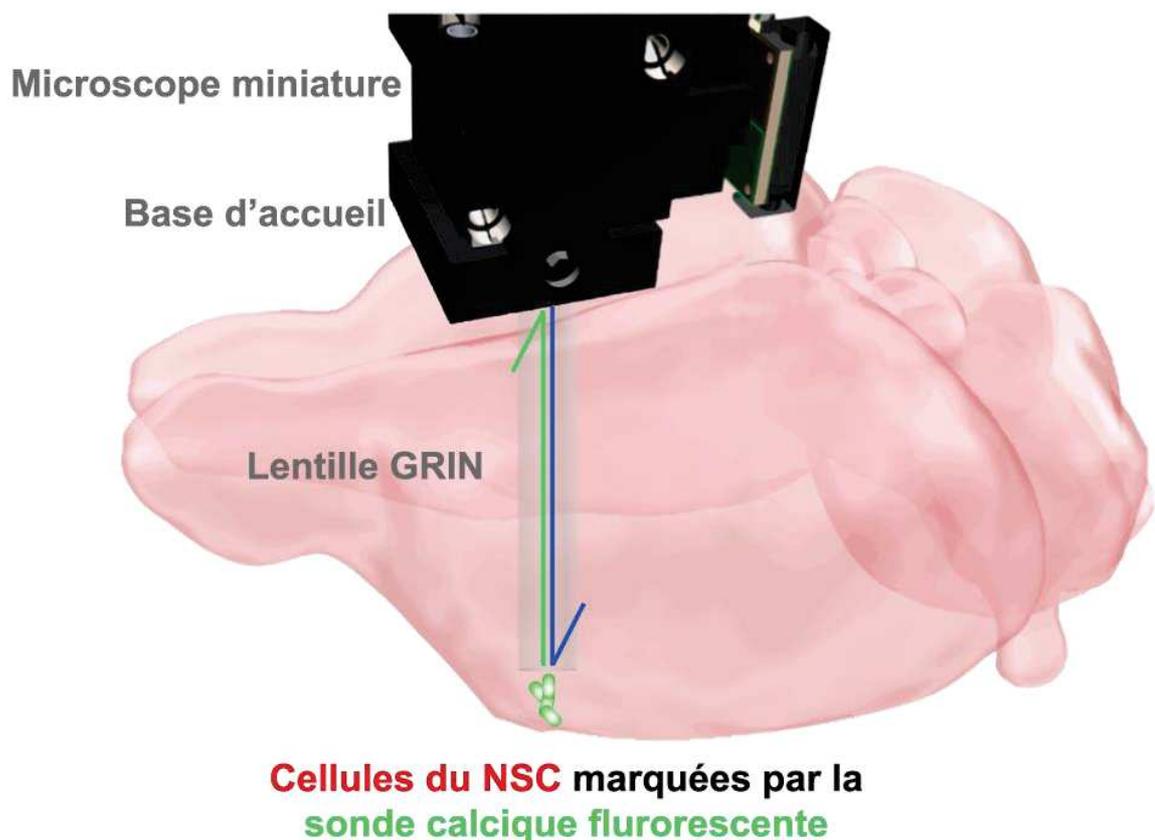


Figure 27 : Imagerie calcique du cerveau profond in vivo chez la souris vigile, 4ème étape.

Des films sont acquis grâce au logiciel Inscopix nVista HD selon les protocoles suivants :

- 1- Une minute à 4HZ toutes les 30 minutes, soit en cycle jour-nuit (L : 12-D : 12) soit en obscurité constante (DD).
- 2- 20 minutes 15/20HZ toutes les 2 heures en cycle jour-nuit.

IV.2.D / Examen post-mortem : traçage et emplacement de la lentille GRIN

À la fin de chaque expérience, l'emplacement de la GRIN a été vérifié. Après anesthésie, les souris sont euthanasiées par une perfusion intracardiaque d'une solution de paraformaldéhyde « PFA » 4, le cerveau avec la GRIN est ensuite prélevé et post-fixé 2 jours dans du PFA 4% à 4°C pour essayer de préserver le tracé de la lentille. La lentille est ensuite retirée délicatement et le cerveau est coupé en tranches coronales de 50 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000 S) au niveau des NSC. La présence de la GFP/GCaMP chez les souris infectées a été détectée grâce à un immunomarquage de la GFP. La détection des NSC a été réalisée grâce à des immunomarcages de 2 populations spécifiques de neurones (AVP et VIP). Les images ont été acquises et la position de la GRIN ainsi que le respect de la distance de travail ont été contrôlés.

IV.3 / Dosages hormonaux

Nous avons choisi de doser les taux de l'hormone de croissance GH et la corticostérone pour contrôler l'état du fonctionnement physiologique de l'animal après intervention chirurgicales.

IV.3.A / Prélèvements de sang

Les hormones hypophysaires sont dosées à partir de prélèvements de sang. Ces prélèvements sont effectués à l'extrémité de la queue de la souris (Guillou et al., 2015) : après avoir coupé le bout de la queue de la souris (moins d'1 mm), 3 à 6 µl de sang sont prélevés avec une micropipette. L'échantillon prélevé est immédiatement dilué au 1:20 dans un tampon phosphate-Tween 20 à 0,05% (PBS Tween), (Na_2HPO_4 .6 mM NaH_2PO_4 2.mM and NaCl 0.15 M, pH .4) et stocké à -20°C ou -80°C pour préserver l'intégrité de l'hormone jusqu'au dosage.

IV.3.B / ELISA GH, CORT

Les profils de sécrétion de cortisol sont déterminés par un kit ELISA commercial « corticostérone ELISA kit by AssayPro ».

Les profils de sécrétion de GH sont déterminés par un dosage ELISA sandwich (Steyn et al., 2011). Dans une plaque 96 puits (908 ; Corning), 50µl de solution d'anticorps de capture (dilution de l'anticorps dans du PBS 1X-Na₂HPO₄ .6 mM NaH₂PO₄ 2. mM and NaCl 0.15 M, pH=7.4 dans de l'eau distillée stérile) est déposée au fond de chaque puit. La plaque est incubée pendant une nuit à 4°C dans une boîte gardant l'humidité et avec un film de Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) inséré entre la plaque et son couvercle afin d'éviter toute condensation ou évaporation de la solution. La solution d'anticorps de capture est remplacée par 200µl de solution de blocage (PBS-Tween, 5% lait écrémé en poudre) nécessaire pour bloquer les sites de liaison non spécifiques. Le blocage est réalisé deux heures à température ambiante, dans une boîte gardant l'humidité et sur agitation. Ce seront des conditions expérimentales qui seront gardées pour tout le reste de l'expérience. Pendant l'incubation de la plaque dans la solution de blocage, une gamme est préparée à partir de doses connues d'hormones dans une solution de PBS-T contenant de la BSA (0.2 mg/mL ; 82-045-1, Millipore). Une fois l'étape de blocage finie, les puits de la plaque sont rincés (trois rinçages de trois minutes à température ambiante) avec la solution de PBS-T. Selon un plan de plaque défini à l'avance, les puits sont remplis par 50µl de différentes solutions :

- un échantillon de sang contrôle (en duplicat) dont la quantité d'hormone est connue au début et en fin de plaque afin de contrôler la variabilité inter-plaque et intra-plaque de l'ELISA.
- la gamme et le blanc (la solution de dilution de la gamme sans hormone, PBS-T/BSA) (en duplicat).
- les échantillons de sang dilués.

L'incubation de 2 heures est suivie par trois rinçages avec du PBS-T. L'étape suivante consiste à déposer 50µl d'anticorps de détection dilué dans la solution de blocage et à incuber cet anticorps avec le complexe précédemment formé pendant 90 minutes. Après trois rinçages, et de nouveau pour 90 minutes, 50µl d'anticorps couplé à la peroxydase de raifort (Fisher Scientific ; NA934) (dilution dans une solution de 50% de PBS et de 50% de solution de blocage) sont déposés dans les puits. Cette incubation dure 90 minutes. Une tablette de O-phenylenediamine (Life technologies ; SAS 00-2003) est diluée dans 12ml de tampon citrate phosphate (pH=5) contenant 0.03% de peroxyde d'hydrogène. Après trois nouveaux rinçages, 100µl de cette solution sont déposés dans chaque puits. La solution étant sensible à la lumière

cette étape, le dépôt et les 30 minutes d'incubation de cette solution se feront à l'abri de la lumière. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 50µl d'HCl 3M.

La lecture de la plaque se fait à l'aide d'un appareil de lecture à absorbance (Infinite 200 PRO ; Tecan) à 490nm. Une lecture de référence se fait à 650nm pour corriger le bruit de fond. La concentration d'hormones dans les échantillons de sang a été déterminée en interpolant les valeurs de densité optique (DO) inconnues avec une régression non linéaire de la gamme. L'interpolation des concentrations des échantillons se réalise sur les échantillons se trouvant dans la partie linéaire de la gamme.

Référence anticorps de capture: AFP-411S; NIDDK-anti-rGH-S-5; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program NIDDK-NHPP. Dilution 1:40 000).

Référence gamme GH: AFP-10783B; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program NIDDK-NHPP).

Référence anticorps de détection pour la GH: AFP-5641801; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases–National Hormone and Pituitary Program NIDDK-NHPP. Dilution 1:10 000.

IV.4 / Immunofluorescence

IV.4.A / Immunofluorescence sur coupe

Préparation des tissus :

Après anesthésie, les souris sont euthanasiées par une perfusion intracardiaque d'une solution de paraformaldéhyde « PFA » 4% (28908, Thermo Scientific ; dilution dans du PBS (D1408-500ML, Sigma Aldrich)). Lorsque les souris sont profondément anesthésiées par le pentobarbital (létale) et ne présentent plus aucun réflexe, la cage thoracique est ouverte et une seringue est insérée dans le ventricule cardiaque gauche. Après ouverture de l'oreillette droite, 20 ml de PFA 4% sont perfusés lentement à l'aide de la seringue à un débit de 5 ml/min. Les cerveaux sont ensuite prélevés et post-fixés 2 jours dans du PFA 4% à 4°C, rincés puis incubés dans une solution de TP contenant l'azide de sodium (PBS-azide 0,1% (Azide, S8032, Sigma Aldrich)) permettant de cryoprotéger les tissus.

Coupe des tissus :

Les cerveaux sont ensuite coupés en tranches coronales de 50 µm d'épaisseur à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000 S) au niveau des NSC et les coupes sont récupérées une à une de manière sériée dans des plaques de 24 puits contenant une solution du tampon phosphate. Les coupes sont ensuite conservées à 4°C dans du PBS 1X avant l'immunohistofluorescence.

Marquages histologiques :

La présence de la GFP/GCaMP chez les souris infectées a été détectée grâce à un immunomarquage de la GFP. La détection des NSC a été réalisée grâce à des immunomarquages de 2 populations spécifiques de neurones (AVP et VIP).

Protocole général :

L'immunofluorescence est effectuée dans une boîte 24 puits (353047, Falcon) sur coupes flottantes. La solution de l'anticorps primaire est composée de PBS/ TRITON 0,1% (TritonX-100-100ML, Sigma Aldrich) + BSA (Bovine sérum albumine, 04-100-811-D, Euromedex).

Les anticorps primaires utilisés dans cette thèse sont les suivants :

<u>Anticorps primaire</u>	<u>Espèce</u>	<u>Référence</u>	<u>Fournisseur</u>	<u>Dilution finale d'utilisation</u>
AVP	Lapin	20069	Immunostar	1/2500
VIP	Lapin	20077	Immunostar	1/2500
GFP	Chiken	A6455	Life Technologies sas	1/250

Les coupes sont incubées 48h à 4°C sur agitateur. Elles sont ensuite rincées trois fois au PBS 1X avant de mettre la solution contenant l'anticorps secondaire. La solution de l'anticorps secondaire est composée de PBS/ TRITON 0,1% + BSA.

<u>Anticorps secondaire</u>	<u>Fluorochrome</u>	<u>Référence</u>	<u>Fournisseur</u>	<u>Dilution finale d'utilisation</u>
Anti-chiken	Alexa 488	A-21206	Life technologies	1/2000
Anti-lapin	Cy3	711-166-152	Jackson Immunoresearch	1/2000

Les coupes sont incubées 2 à 4h à température ambiante sur agitateur. Elles sont protégées de la lumière pour ne pas altérer les fluorophores. Les coupes sont ensuite rincées trois fois au PBS 1X. Les coupes sont montées à l'aide d'un pinceau sur des lames polysine (Lame polysine® slides, Thermo scientific). Un marquage des noyaux (marquage DAPI, 4',6-diamidino-2-phénylindole, D3571, Molecular Probe) est effectué.

Montage des lames :

Les lames sont protégées de la lumière jusqu'au séchage de celles-ci. Un milieu de montage commercial (Fluoromount-G®, Southern Biotech) est mis sur la lame et est recouvert d'une lamelle (24x50mm, Menzel Gläser) pour finaliser cette immunofluorescence. Deux jours d'attente sont nécessaires pour que le milieu de montage sèche avant la visualisation par microscopie. Les lames seront ensuite conservées à 4°C.

Imagerie Apotome

L'observation des coupes a été réalisée sur un microscope Zeiss (Imager Z1) équipé d'un module apotome. Les images ont été acquises avec le logiciel Axiovision 4.8. Les images sont ensuite traitées sur le logiciel Imaris (Plateforme IPAM de BioCampus de Montpellier).

IV.5 / Analyse

IV.5.A / Analyse de l'imagerie calcique

L'analyse de l'imagerie calcique est faite à partir du logiciel Fiji. Des zones d'intérêt autour des cellules exprimant la sonde calcique sont déterminées et l'intensité est mesurée. Les mesures sont ensuite analysées sur IgorPro.5.1.

IV.5.B / Traitement et analyse des données

Les séries temporelles sont introduites dans une routine écrite dans Matlab par Pierre Fontanaud (Equipe Mollard) afin d'extraire le niveau de fluorescence moyen, les 5e et 95e percentiles de chaque enregistrement. La différence entre les 95e et 5e percentiles est calculée, comme une estimation de l'amplitude du signal sur la durée de l'enregistrement considéré. Une détection des transitoires calciques est réalisée à partir de la dérivée du signal de fluorescence (dF/dt), un seuil fixé au 90e percentile de l'ensemble des valeurs dF/dt obtenues pour une même cellule sur 24 heures détermine les variations de fluorescence les plus rapides. Parmi ces fluctuations, seules celles présentant un maximum au-dessus de 1 SD du signal basal (5e percentile) sont conservées. Le nombre des événements conservés par enregistrement de 1 minute donne une estimation de la fréquence des transitoires calciques pour chaque série temporelle. Le nombre de cellules synchrones est comptabilisé pour chaque image, avec un seuil de significativité obtenu à partir d'une simulation réalisée sur 1000 permutations de tous les événements détectés dans chaque cellule au cours d'un enregistrement (réf. : Visual stimuli recruit intrinsically generated cortical ensembles. Miller JE, Ayzenshtat I, Carrillo-Reid L, Yuste R. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Sep 23;111(38): E4053-61. doi: 10.1073/pnas.1406077111).

IV.5.C / Rythmicité et calculs de phase des signaux journaliers

Les paramètres extraits ci-dessus (fluorescence moyenne, amplitude et fréquence) sur 24 heures sont lissés 2 à 2 (48 valeurs obtenues à partir de 49 mesures) et utilisés pour une analyse de rythmicité circadienne avec l'algorithme JTK-Cycle (réf. : JTK_CYCLE : an efficient non parametric algorithm for detecting rhythmic components in genome-scale data sets. Hughes ME, Hogenesch JB, Kornacker K. J Biol Rhythms. 2010 Oct;25(5):372-80. doi: 10.1177/0748730410379711). Pour chaque paramètre présentant une rythmicité significative ($p < 0.05$), la phase du signal est calculée. Les données sont ensuite représentées à l'aide du logiciel Oriana (Kovach Computing Services).

RESULTATS

Chapitre 1 : Coordination du Rythme Circadien du Calcium

(CCR) cellulaire in vivo.

Le « CCR » (Circadian Calcium Rhythm) des neurones des NSC est autonome au niveau cellulaire et dépend des gènes de l'horloge (Noguchi et al., 2017). Dans des études qui s'appuient sur la culture ex vivo des NSC immatures, le CCR apparaît coordonné, et des différences de phases semblent exister entre les différentes zones du NSC. Cependant, la relation du CCR avec le cycle jour-nuit reste inconnue. Nous nous sommes posé les questions suivantes :

- Quelle est l'organisation spatio-temporelle du CCR entre les cellules du NSC in vivo ?

- Comment le CCR évolue-t-il en fonction du cycle jour-nuit, normal ou perturbé ?

Pour répondre à ces questions, j'ai analysé les niveaux de fluorescence de la GCamp6f enregistrés toutes les 30 minutes. J'ai regardé les variations lentes de la GCamp6f sur plusieurs cycles jour-nuit en condition normale LD (12 :12), en obscurité constante (DD) et lorsque les souris faisaient face à un challenge environnemental (Jetlag).

Champ Global cycle jour-nuit LD (12 :12)

Sur toutes les souris sauvages que j'ai enregistrées (12 au total), nous avons remarqué que les cellules du NSC présentent des variations journalières du signal fluorescent de la GCaMP in vivo. En effet, comme nous le montre le montage des projections minimales des images du champs prises toutes les 2 heures, la fluorescence augmente à l'intérieure de chaque cellule pendant la journée et diminue pendant la nuit (Figure 28). De plus, nous avons même remarqué que ces variations journalières anticipent l'éclairage et commencent à se remplir en calcium quelques heures avant la transition jour-nuit.

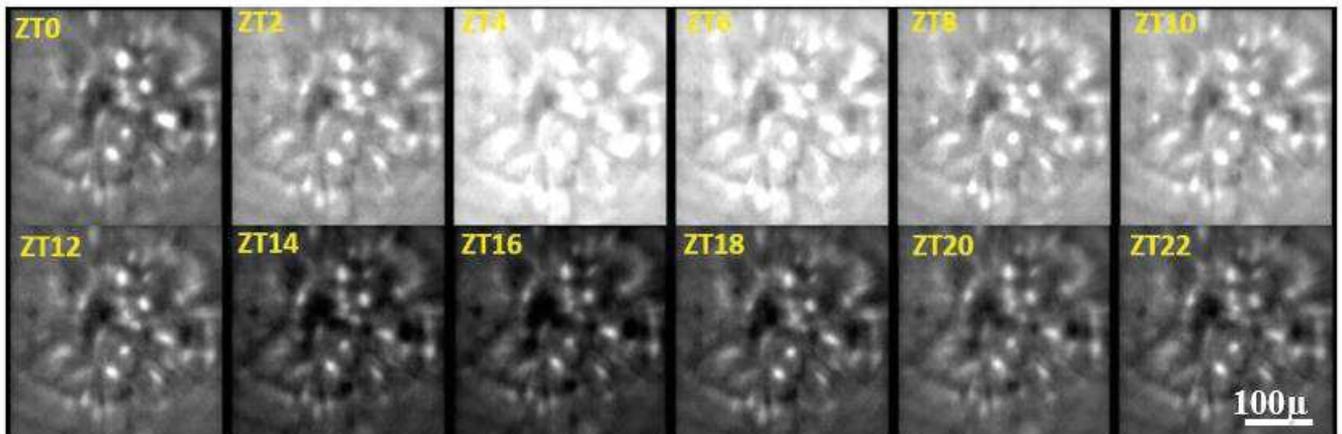


Figure 28 : Imagerie calcique cellulaire du noyau suprachiasmatique d'une souris sauvage qui exprime la GCamp6f en condition LD (12 :12).

Une projection minimale du champ toutes les 2 Heures. Les images prises à ZT0 et ZT12 correspondent au moment du light ON et light OFF respectivement.

Au niveau du champ global, ces changements génèrent des variations quotidiennes au sein du NSC. Ces oscillations se répètent de façon reproductible sur plusieurs jours consécutifs chez le même animal (Figure 29).

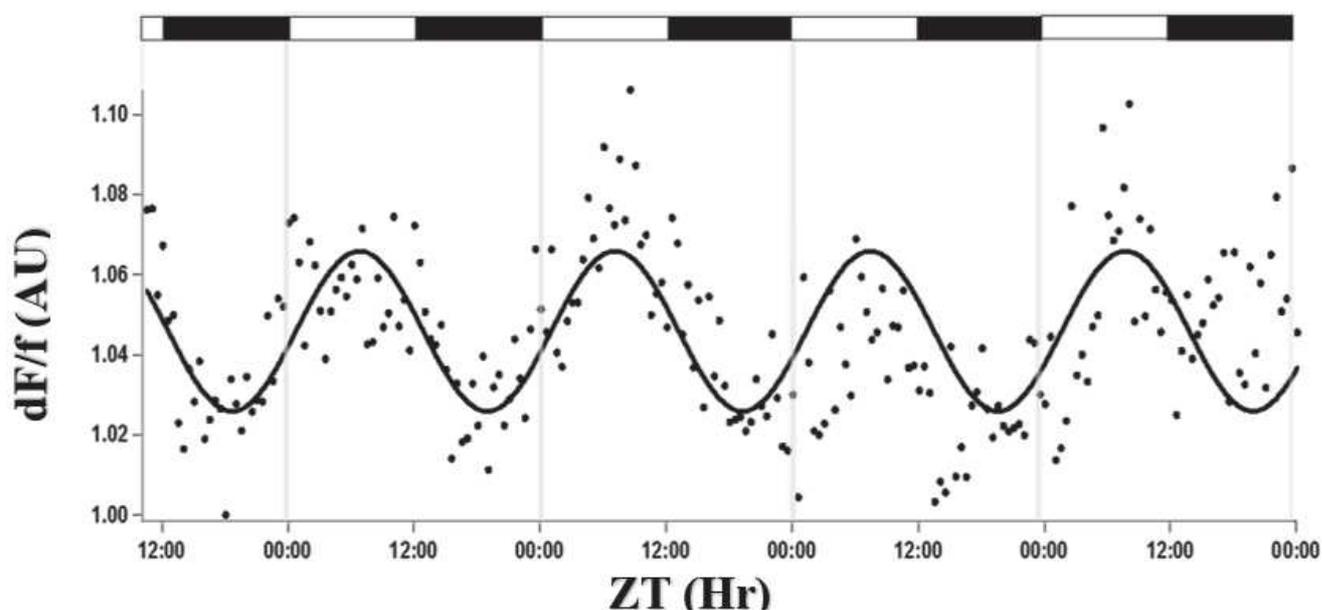


Figure 29 : Variations journalières de la fluorescence du champ entier au niveau du noyau suprachiasmatic en condition LD (12 : 12).

Chaque point représente la moyenne de l'intensité de fluorescence totale intégrée sur 1 minute d'enregistrement.

Au contraire, les cellules du noyau de l'hypothalamus dorsomédial (DMH) ne présentent aucune variation journalière de leur signal GCaMP in vivo (Figure 30A). De plus aucune variation journalière significative au niveau du champs global du DMH n'a été détecté (Figure 30B). À noter que le sérotype de virus, le promoteur ainsi que la GCaMP utilisés pour le DMH, sont ceux utilisés pour suivre l'activité cellulaire du NSC. Cette observation nous permet de conclure que la variation journalière que nous voyons au niveau du champ global du NSC n'est probablement pas liée à des perturbations extérieures, et reflète bien ce qui se passe dans les NSC.

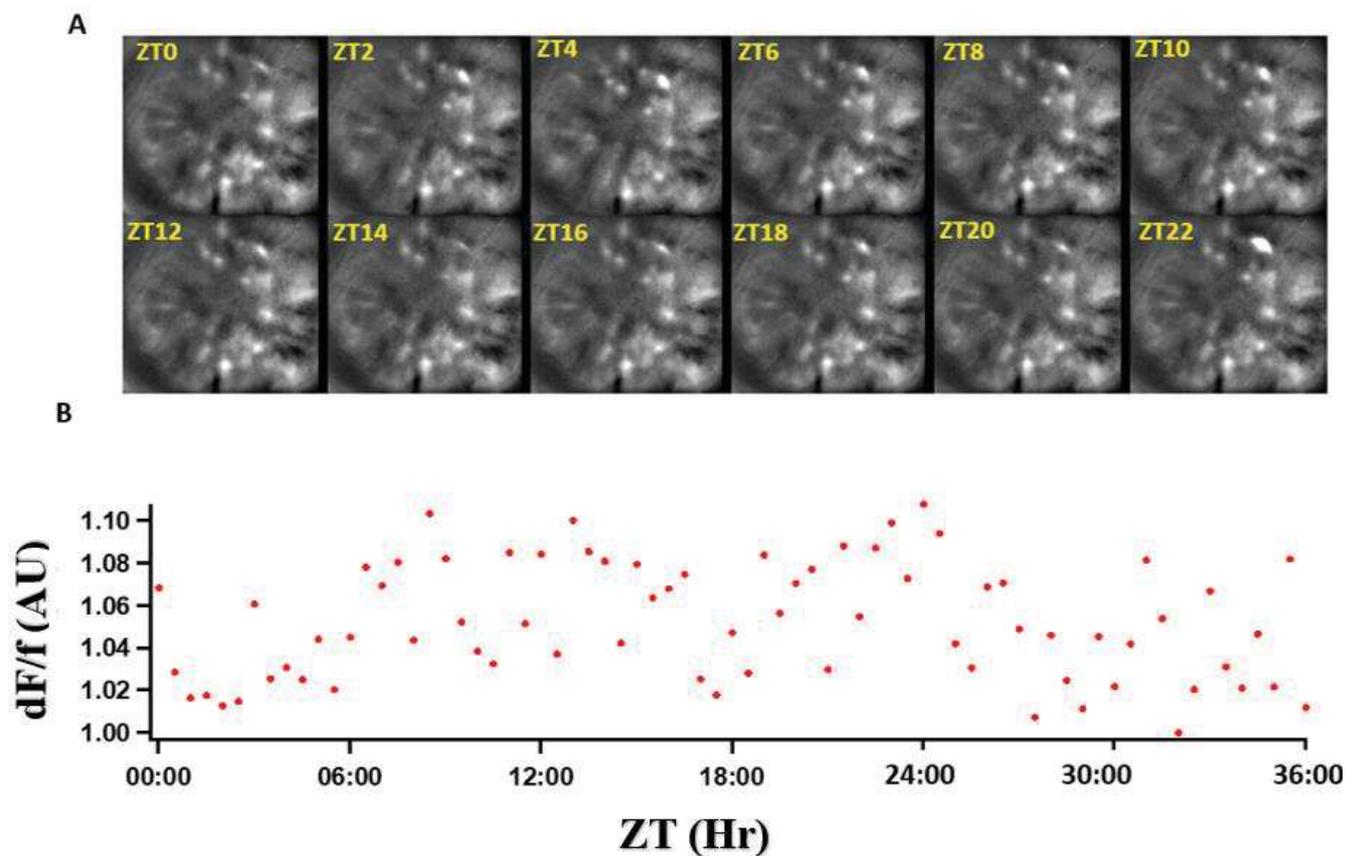


Figure 30 : Imagerie calcique cellulaire du noyau de l'hypothalamus dorsomédial (DMH) d'une souris sauvage qui exprime la GCamp6f en condition LD (12 :12).

A- Une projection minimale du champ toutes les 2 Heures. Les images prises à ZT0 et ZT12 correspondent au moment du light ON et light OFF respectivement.

B- Chaque point représente la moyenne de l'intensité de fluorescence totale intégrée sur 1 minute d'enregistrement. Pas de variations journalières de la fluorescence au sein du champ entier du DMH.

De plus, ces oscillations du signal GCamp6f reflètent bien des variations de la concentration en Ca^{2+} , car lorsque j'ai utilisé une GFP sous le contrôle du même promoteur, nous n'avons pas vu de changement de fluorescence au niveau du NSC (Figure 31).

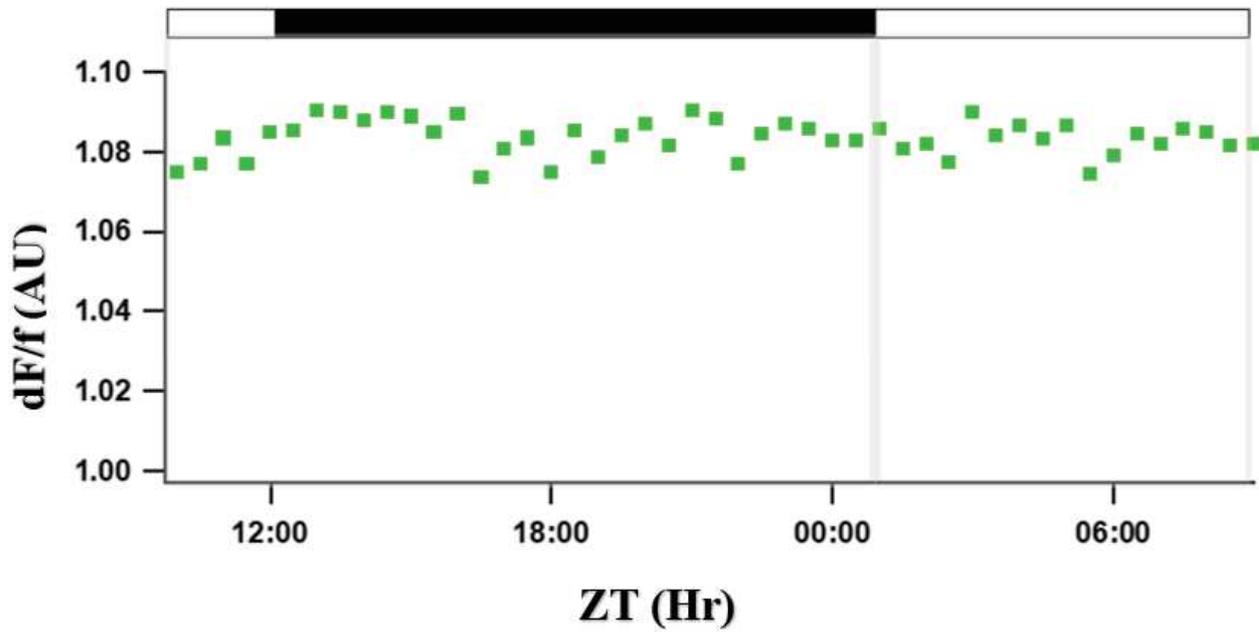


Figure 31 : GFP : pas de variations de la fluorescence au sein du champ des NSC.

Chaque point représente la moyenne du champ totale sur 1 minute d'enregistrement, toutes les 30 min.

Cellules individuelles cycle jour-nuit LD (12 :12)

Les variations que nous voyons au sein du champ global, sont un reflet des variations au niveau des cellules individuelles (Figure 32A). Du fait que, un cerveau ça bouge, surtout au sein d'un animal non restreint, certains de mes champs enregistrés présentaient des mouvements que je n'ai pas réussi à corriger. Ainsi, je vous présente dans la suite de ces résultats, le suivi longitudinal sur plusieurs jours des mêmes cellules, dans 4 animaux différents.

Nous avons pu enregistrer jusqu'à, au mieux, 50 cellules par champ. Entre 70% à 100% des cellules enregistrées au sein de chaque animal sont rythmiques à l'échelle de 24 heures (Figure 32B). Sur tranches, des variations lentes du calcium ont été rapporté à la fois pour les neurones et les astrocytes dans les noyaux suprachiasmatiques (Jones et al., 2018; Brancaccio et al., 2017), avec une activité pendant la phase lumineuse pour les neurones et la nuit pour les astrocytes. La phase du rythme du calcium que nous observons correspond à une phase d'activité neuronale. Elle ressemble à ce qui a été observé en photométrie pour les neurones VIP et ne montre pas d'antiphase, excluant ainsi une activité gliale. En effet, nous n'avons pas vu de colocalisation entre la GCaMP (détectée avec un anticorps anti-GFP) et la GFAP (une protéine spécifique des astrocytes) (Figure 33). Nous avons ainsi conclu que nous enregistrons majoritairement des neurones.

De plus, au sein du même animal, les phases du rythme journalier du calcium de toutes les cellules apparaissent fortement coordonnées à l'échelle de 24 heures (Figure 34). Pour chacun des 4 animaux étudiés selon ce protocole de suivi longitudinal, la distribution des temps au pic du calcium (mesurés par le programme JTK-Cycle) est plutôt homogène au sein du même animal (Figure 35). Pour chaque animal, la distribution des phases du calcium cellulaire est centrée pendant la phase lumineuse, bien que de légères différences apparaissent d'un animal à l'autre (Figure 35). Ces différences entre animaux rappellent le décalage de phase du rythme

circadien calcique (CCR) entre les différentes régions au sein des tranches de NSC et pourraient donc correspondre aux différents endroits enregistrés in vivo. Nos résultats montrent qu'il y a une hétérogénéité spatiotemporelle de l'activité journalière du calcium au sein du NSC.

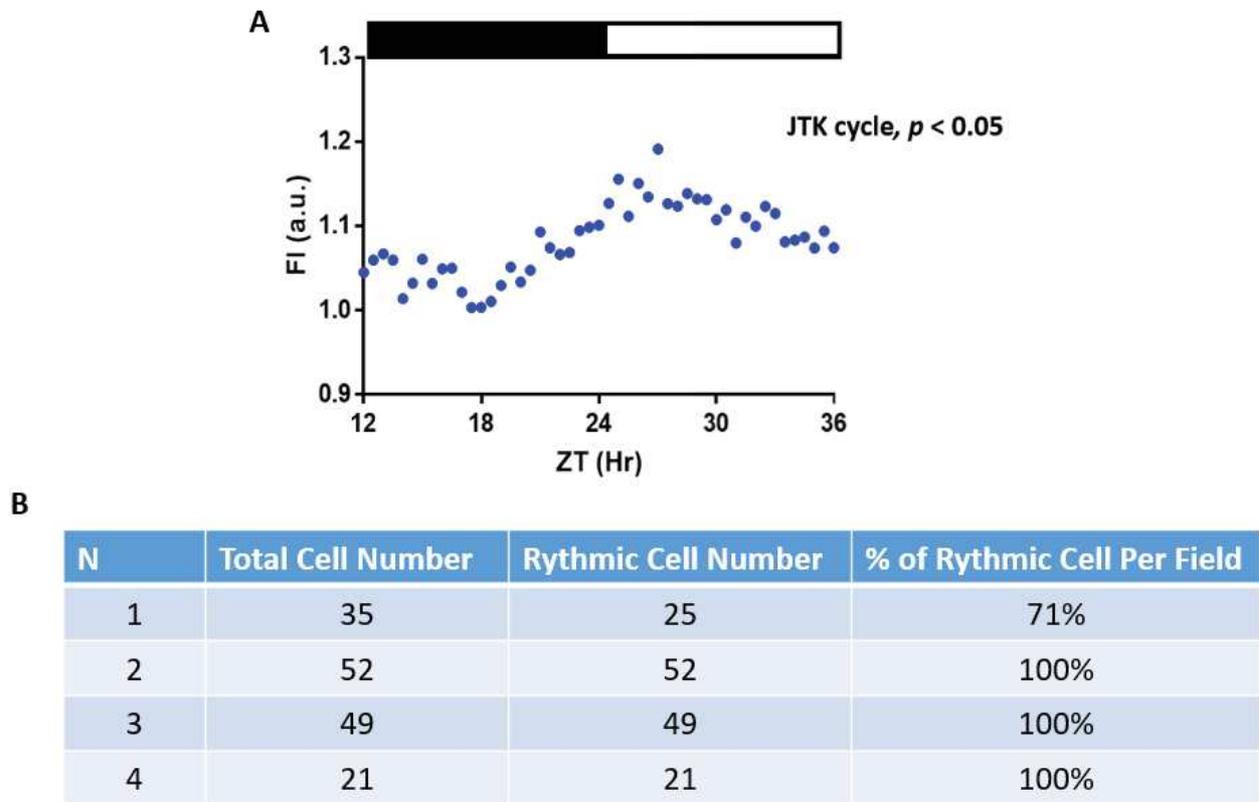


Figure 32 : Rythme journalier de calcium basal unicellulaire.

A- Chaque point représente la moyenne du signal intégré sur 1 minute d'enregistrement, toutes les 30 min pour une région d'intérêt correspondant à une cellule individuelle. Le jour et la nuit sont représentés par un trait blanc et un trait noir en haut du graphe, respectivement. Un exemple d'un profil de l'organisation temporelle du $[Ca^{2+}]_i$ basal dans une cellule individuelle du NSC in vivo. Pendant la nuit, le taux de calcium basal est bas. Le niveau du calcium augmente progressivement pour atteindre son maximum pendant la journée.

B- Nombre de cellules présentant une rythmicité journalière significative (JTK-cycle $p < 0.05$).

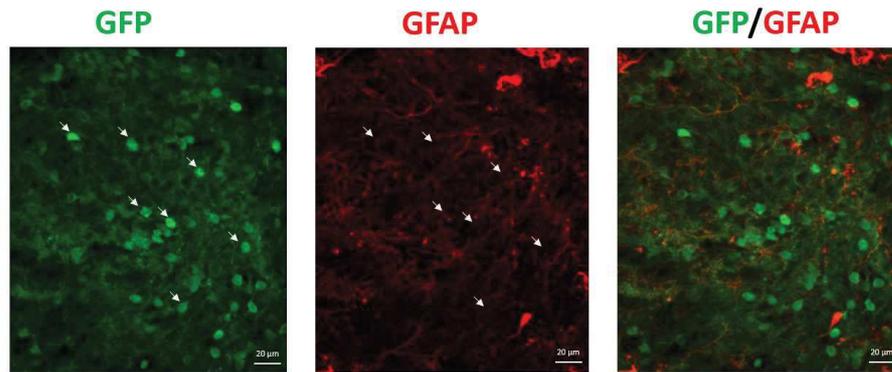


Figure 33 : Co-marquage cellulaire GFP/GFAP au niveau du NSC.

Coupes de cerveaux de souris infectés par l'AAV9-CAG-GCaMP6f au niveau des NSC, imagées en microscopie (Zeiss apotome) 40x. En vert GFP, en rouge GFAP. Les flèches blanches montrent les cellules qui sont marquées avec la GFP, et donc qui sont infectées par les virus, ne le sont pas par la GFAP.

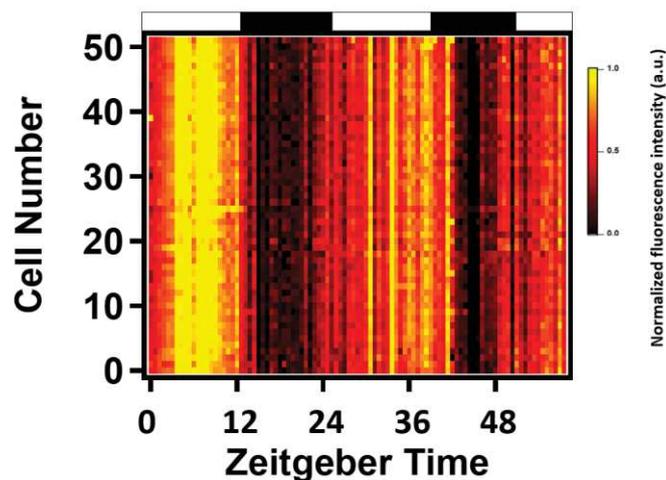


Figure 34 : Coordination journalière des phases entre les cellules du NSC.

Chaque ligne représente l'intensité du signal GCaMP6f dans une cellule individuelle au cours du temps, codée en fausses couleurs. Les couleurs jaune et noir correspondent à un niveau de calcium basal maximal et minimal respectivement. Pour le champ enregistré pour cet animal, toutes les cellules (50 cellules) piquent ensemble pendant la journée (trait blanc) et creusent pendant la nuit (trait noir), et cela pendant 2 cycles consécutifs. Le CCR est coordonné entre les cellules du NSC in vivo en condition LD.

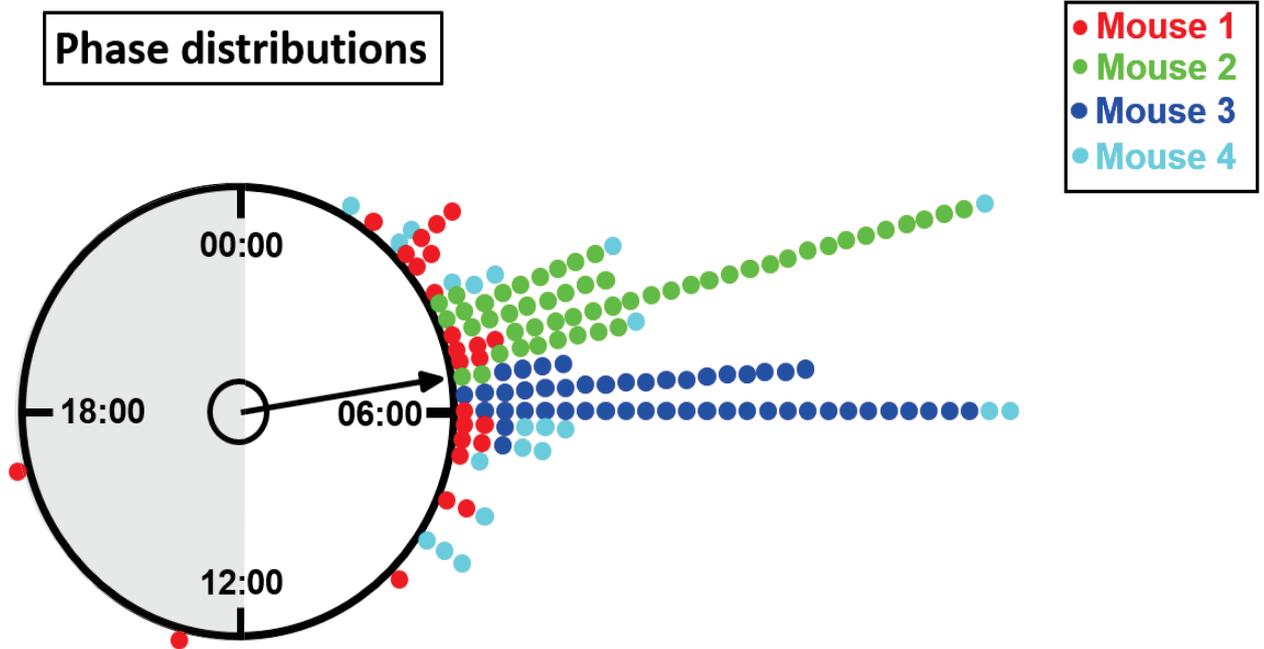


Figure 35 : Distribution des temps au pic du rythme journalier du calcium de toutes les cellules rythmiques, chez 4 souris différentes.

Champs Global en obscurité totale DD

Mais enfin, j'enregistre l'activité cellulaire du pacemaker circadien, mes variations journalières de calcium basal, sont-elles indépendantes de la lumière ? oui, les variations journalières de calcium basal sont bien indépendantes de la lumière. Ce que nous voyons, est un rythme circadien du calcium (CCR) in vivo. En effet, lorsque les animaux sont maintenus en condition d'obscurité totale (DD), les cellules continuent à se remplir en calcium pendant le jour subjectif et se vider pendant la nuit subjective (Figure 36). De plus, les variations circadiennes du calcium au niveau du champ global en DD varient avec les mêmes amplitudes qu'en condition LD (Figure 37).

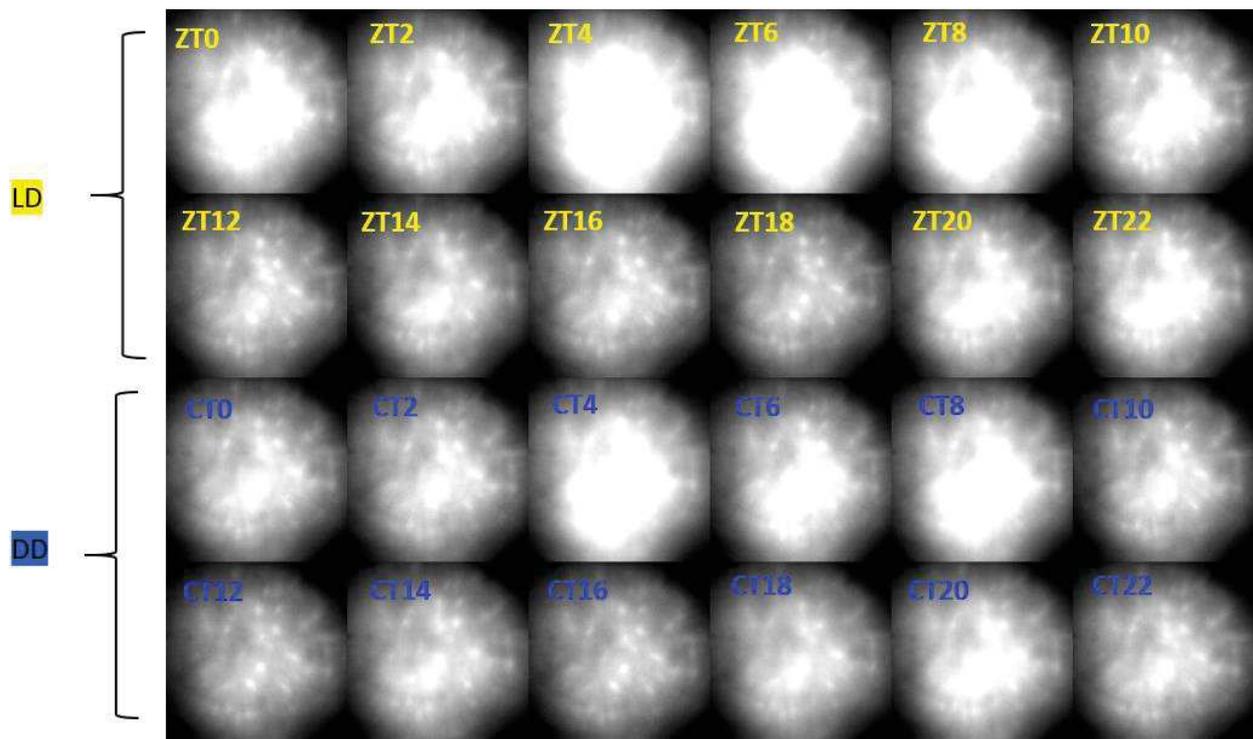


Figure 36 : Imagerie calcique cellulaire du NSC de la même souris sauvage qui exprime la GCamp6f en condition LD (12 :12) et DD.

Persistance des variations circadiennes du calcium en obscurité totale.

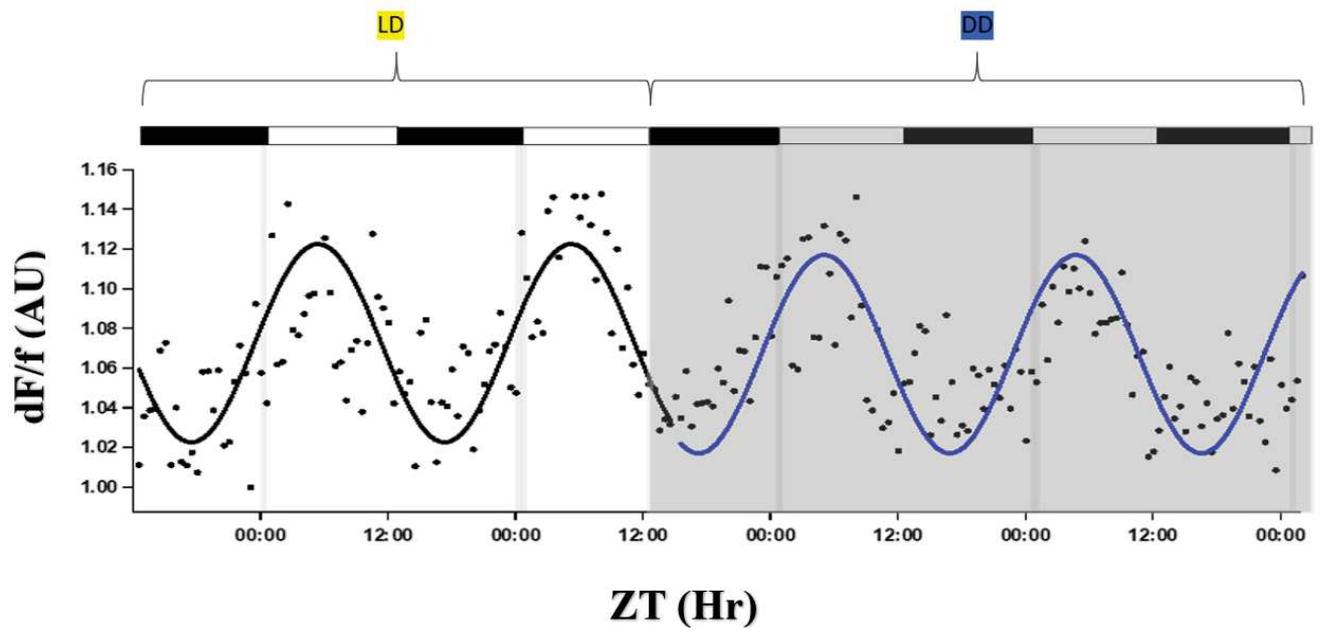


Figure 37 : Variations circadiennes du calcium du champ entier au niveau des NSC.

Chaque point représente la moyenne du champ totale sur 1 minute d'enregistrement, toutes les 30 min. Les lignes noires et bleues représentent la meilleure sinusoïde possible, en condition LD et DD respectivement.

Cellules individuelles en obscurité totale DD

Encore mieux, la coordination journalière entre les cellules du NSC est, elle aussi, indépendante de la lumière. En effet, les cellules restent coordonnées en DD (Figure 38).

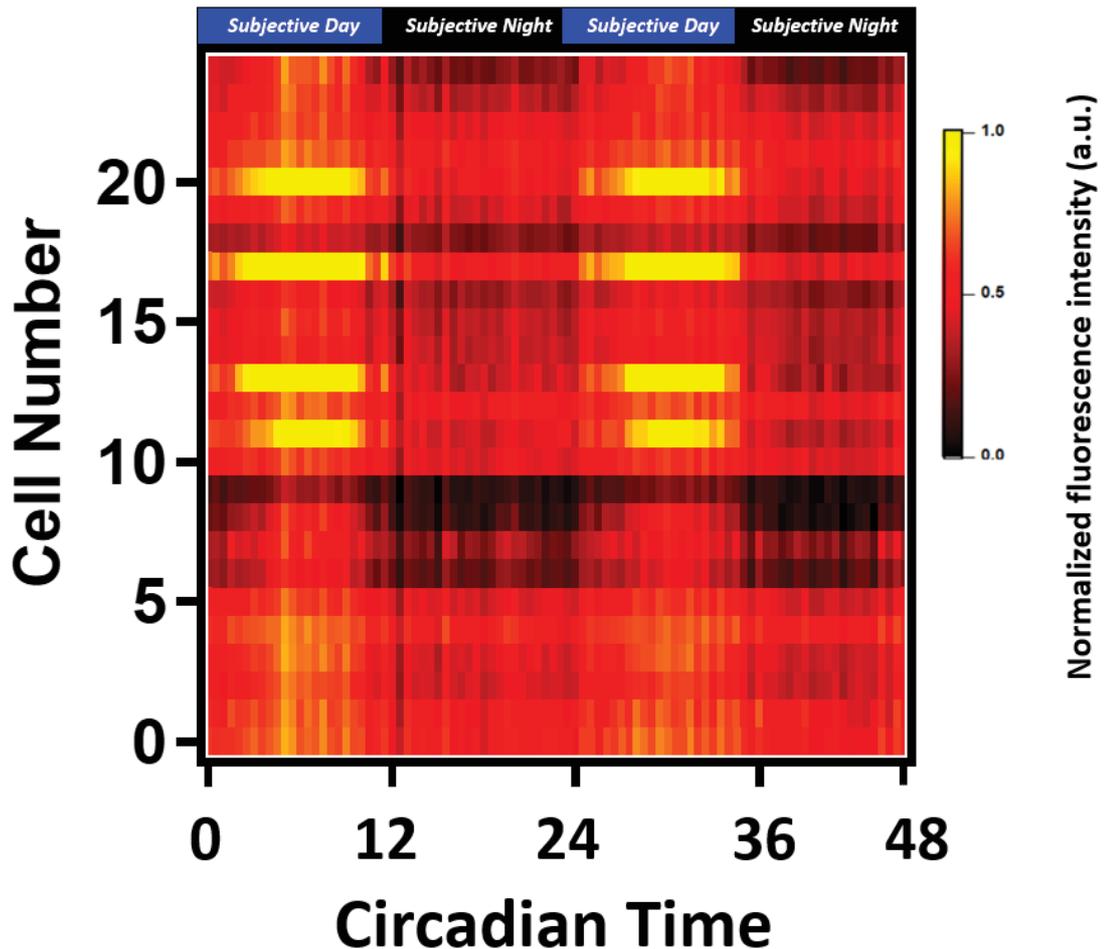


Figure 38 : Coordination circadienne des phases entre les cellules du NSC.

Chaque ligne représente une cellule. Les couleurs jaune et noir correspondent à un niveau de calcium basal maximal et minimal respectivement. Pour le champ enregistré pour cet animal, toutes les cellules (25 cellules) piquent ensemble pendant la journée subjective (trait bleu) et creusent pendant la nuit subjective, et cela pendant 2 cycles consécutifs. Le CCR est coordonné entre les cellules du NSC in vivo en condition DD.

Mais est-ce que le CCR ainsi que la coordination cellulaire sont affectés par les perturbations de l'horloge circadienne ? Nos données montrent que le jetlag perturbe le CCR mais pas la coordination cellulaire.

Dans le but de tester la robustesse du système, nous avons mimé un jetlag en imposant à nos animaux une avance de phase de 6 heures. Ici je vous montre les données analysées sur un seul animal, en exemple.

Le premier jour après le jetlag le profil du calcium du champ global reste inchangé et ne s'aligne pas immédiatement sur le nouveau cycle jour-nuit. Après 5 jours le profil global est significativement avancé par rapport au premier jour (Figure 39). Ce changement est progressif. Les phases de niveau maximum et minimum du CCR global s'ajustent sur le nouveau cycle jour-nuit à la vitesse moyenne d'environ 1 heure par jour (Figure 40), comme précédemment observé pour l'activité locomotrice (Yamaguchi et al., 2013). De façon remarquable, les cellules individuelles restent coordonnées tout au long du jetlag, dès le premier jour, comme au cours de la période de réalignement progressif (jour 3) (Figure 41).

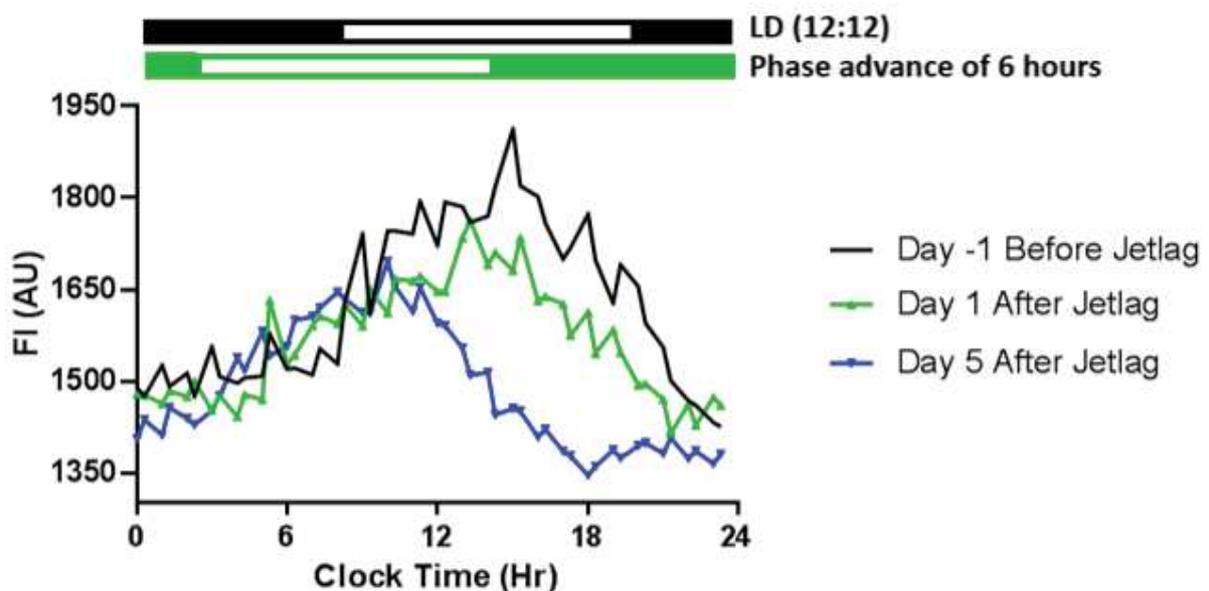


Figure 39 : Variation du calcium basal du champs global du NSC in vivo lors d'un jetlag.

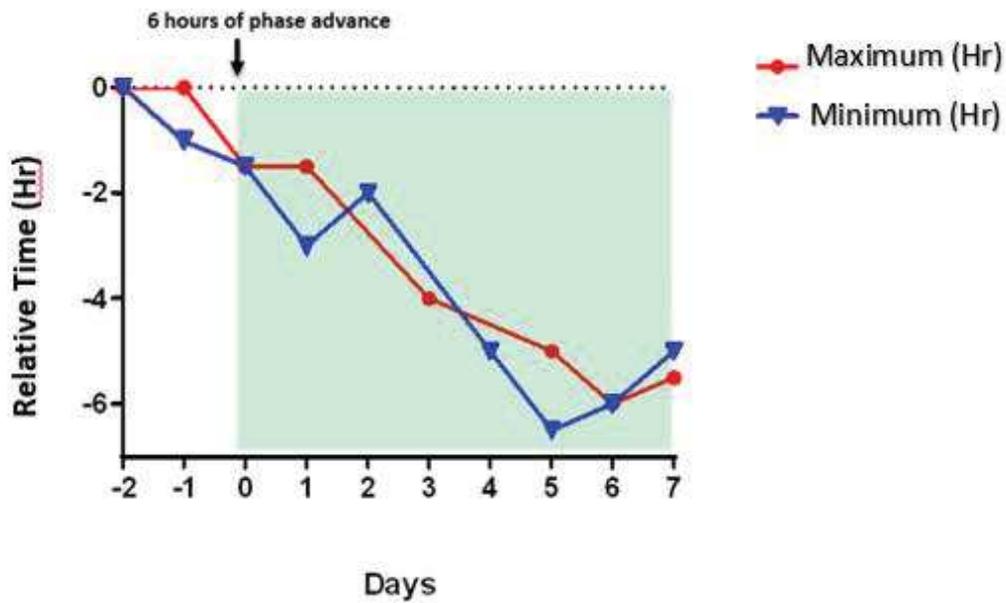


Figure 40 : Périodes du réalignement du CCR du champs global.

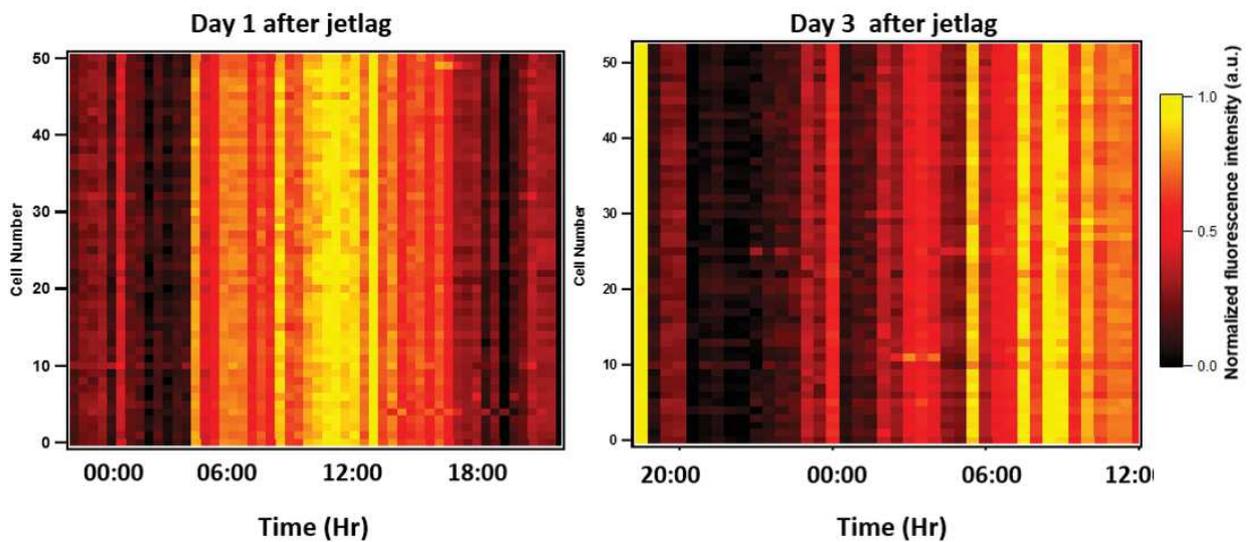


Figure 41 : Robustesse de la coordination du CCR face au perturbation physique de l'horloge.

Chaque ligne représente une cellule. Les couleurs jaune et noir correspondent à un niveau du calcium basal maximal et minimal respectivement. Pour le champ enregistré pour cet animal, toutes les cellules (50 cellules) restent coordonner après une perturbation de phase.

Nos données montrent in vivo la grande coordination entre les cellules du NSC au niveau circadien.

Dans ce chapitre nous avons vu que chez la souris adulte les cellules individuelles du NSC présentent un rythme circadien de leur calcium (Ca^{2+}) cytosolique (CCR), hautement coordonné in vivo. Ces observations rappellent les fluctuations circadiennes du calcium cytosolique dans les neurones du NSC sur tranche (Brancaccio et al., 2013; Enoki et al., 2017a), tout en révélant leur robustesse face aux perturbations du cycle jour-nuit.

Bien que la distribution des temps de pics du CCR soit homogène au sein du même animal, d'un animal à l'autre nous avons vu une plus grande hétérogénéité qui se traduit par une distribution plus large des temps de pics. Un mapping des acrophases du CCR au sein de la tranche du NSC a montré qu'il existe une hétérogénéité régionale dans le rythme circadien du calcium (Enoki et al., 2012, 2017b). Dans ce contexte, les différences que nous voyons entre les différents animaux pourraient correspondre à l'enregistrement de différentes zones du NSC. Une hétérogénéité régionale dans le rythme circadien du calcium existe donc in vivo.

Chapitre 2 : Variation journalière de l'activité calcique rapide dans les cellules du NSC in vivo.

Mais est-ce que l'activité calcique des neurones horloges repose uniquement sur le rythme circadien du Ca^{2+} cytosolique ou d'autres cinétiques, offrant un codage plus complexe, sont présentes ?

Les fluctuations du calcium intracellulaire sont généralement rapides dans les systèmes neuronaux, sur des échelles de temps allant de 100 millisecondes à quelques secondes. Pour les NSC des Mammifères, des transitoires calciques rapides sans modulation circadienne sur tranche ont été attribués à un artefact causé par les anciennes sondes calciques à base de BAPTA (Hong et al., 2010). Pourtant, le calcium change rapidement dans des tranches de NSC en réponse à l'application de différents neuropeptides (Irwin and Allen, 2010), et même des rythmes ultradiens de Ca^{2+} (sur des périodes de 0.5-4 heures) ont été rapportés au sein du NSC (Wu et al., 2018). Les neurones des NSC sont donc capables de produire des transitoires calciques, mais il reste à comprendre leur régulation temporelle. Une étude récente montre des fluctuations de plusieurs secondes par photométrie in vivo à l'échelle d'une population de neurones du NSC en réponse à des stimuli lumineux (Jones et al., 2018), mais l'absence de résolution cellulaire ne permet pas de comprendre ce qui se passe à l'échelle des neurones individuels.

Pour ces raisons, en plus des variations lentes du calcium du NSC au niveau cellulaire, nous avons aussi recherché la présence de transitoires rapides. Nous avons pu suivre ces fluctuations rapides de façon longitudinale sur au moins 24 heures dans 20 à 50 cellules chez 4 souris (acquisition d'une minute à 4Hz toutes les 30 min).

La preuve tant attendu est enfin là : la plupart des cellules du NSC présentent des dynamiques rapides du Ca^{2+} in vivo, en condition LD (12 :12) et DD (Figure 42), et cela pour tous les animaux enregistrés. Nos premières observations montrent que l'activité du Ca^{2+} rapide se greffe sur le CCR (Figure 43). Encore mieux, mes observations des enregistrements sur plusieurs cycles jour-nuit de 24 heures, laissaient entendre que les activités calciques rapides du NSC in vivo présentent une certaine organisation temporelle au sein de chaque cellule.

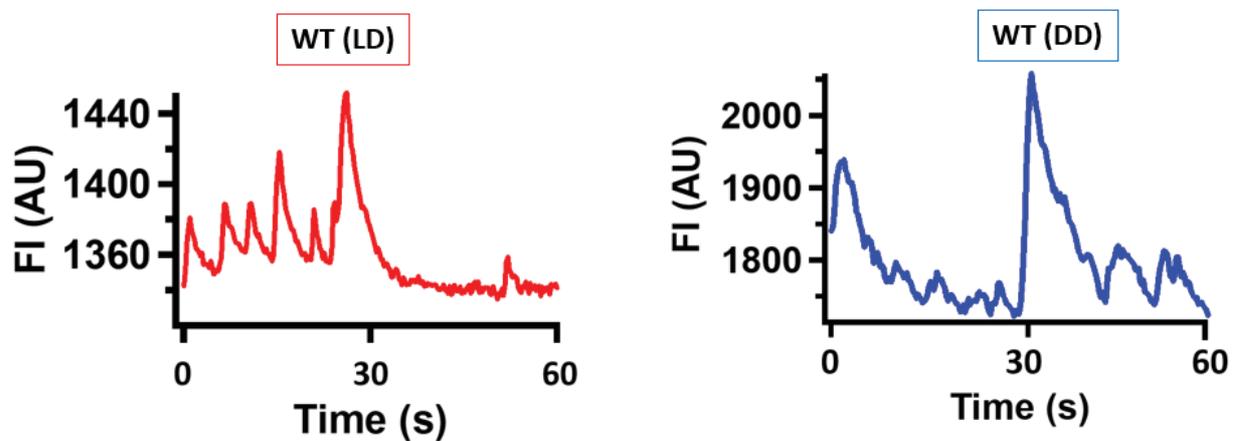


Figure 42 : Transitoires calciques rapides des cellules du NSC in vivo.

Exemple de traces calciques de 1 min à 4Hz en condition LD (trace de gauche) et DD (trace de droite).

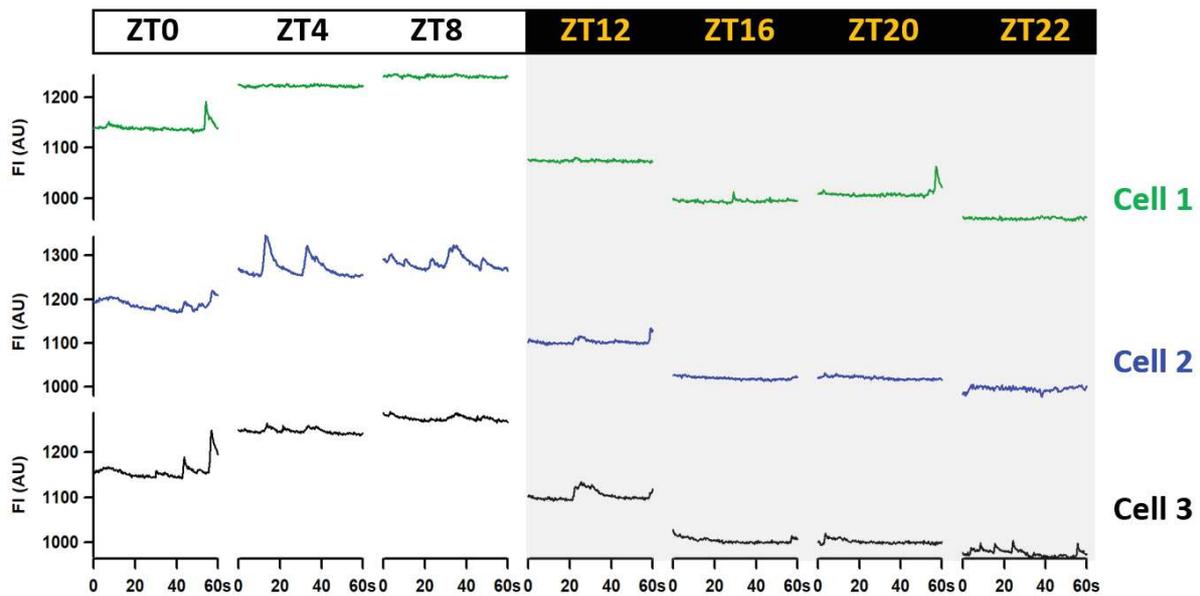


Figure 43 : Activité calcique rapide qui se greffe sur les variations calciques lentes au sein du NSC in vivo.

Les traces calciques présentées dans cet exemple sont de 1 minute à 4 Hz. Certaines cellules, comme la cellule numéro 2, vont présenter plus de spikes ou de transitoires d'activité calcique rapide lorsque leur calcium basal est élevé. Et inversement, comme la cellule numéro 3.

Mais est-ce que cette activité rapide est vraiment régulée sur 24h ? Le seul moyen pour le savoir, c'est de quantifier. Pour quantifier cette activité, nous avons estimé le niveau d'activité du Ca^{2+} rapide pour chaque épisode d'une minute sur 24h, pour chaque cellule, de 2 façons différentes.

1- Amplitude du signal calcique

Tout d'abord, nous avons estimé l'amplitude de ces oscillations (différence entre les 5^{ème} et 95^{ème} percentile, matérialisés sur la trace en Figure 44A). Ce paramètre d'amplitude présente une nette variation au cours du temps (Figure 44B). De plus, un pattern journalier significatif est détecté avec le programme JTK-Cycle et permet de calculer une phase au pic pour environ 30% des cellules (Figure 45).

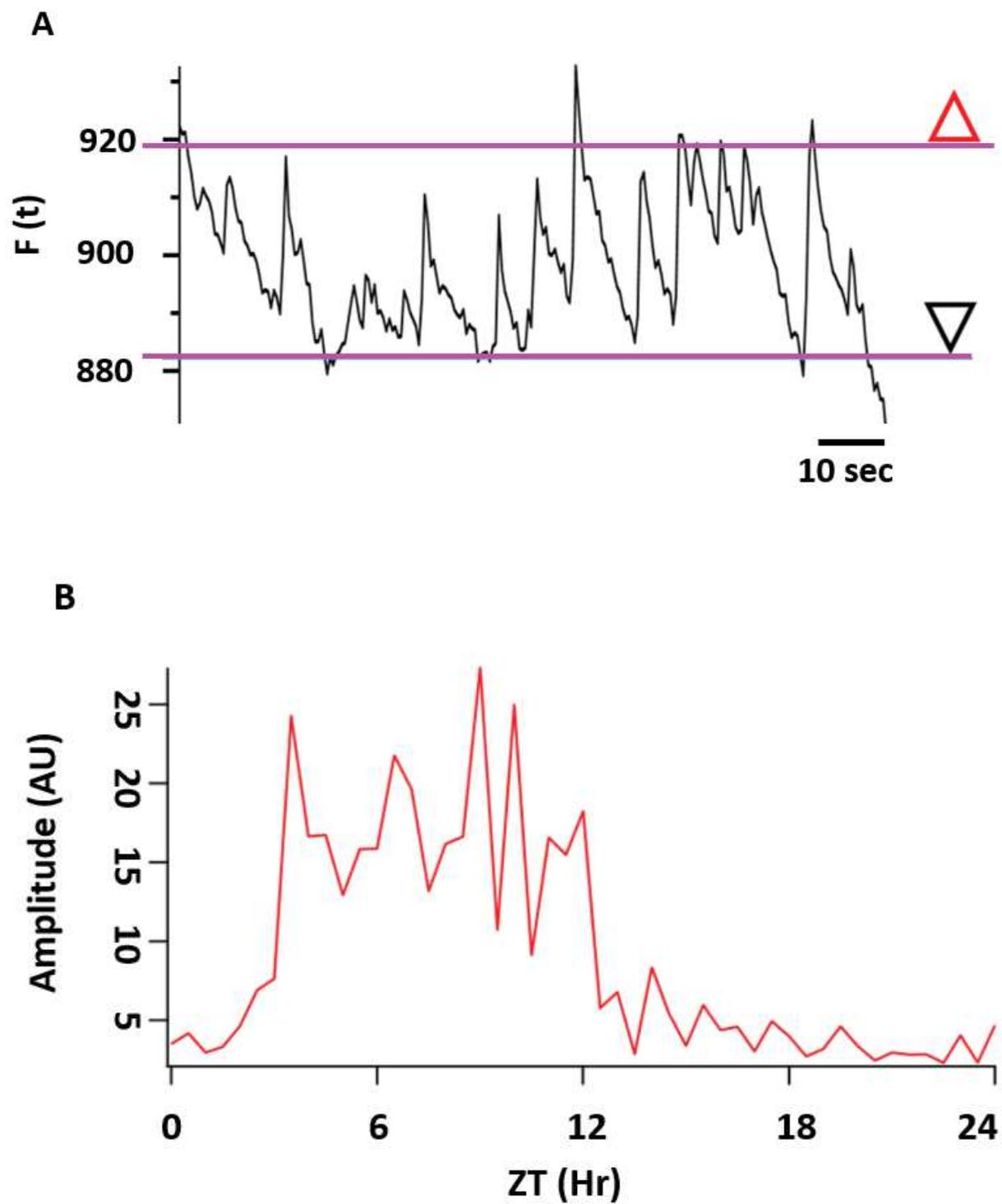


Figure 44 : : Analyse des activités calciques rapides : estimation de l'amplitude.

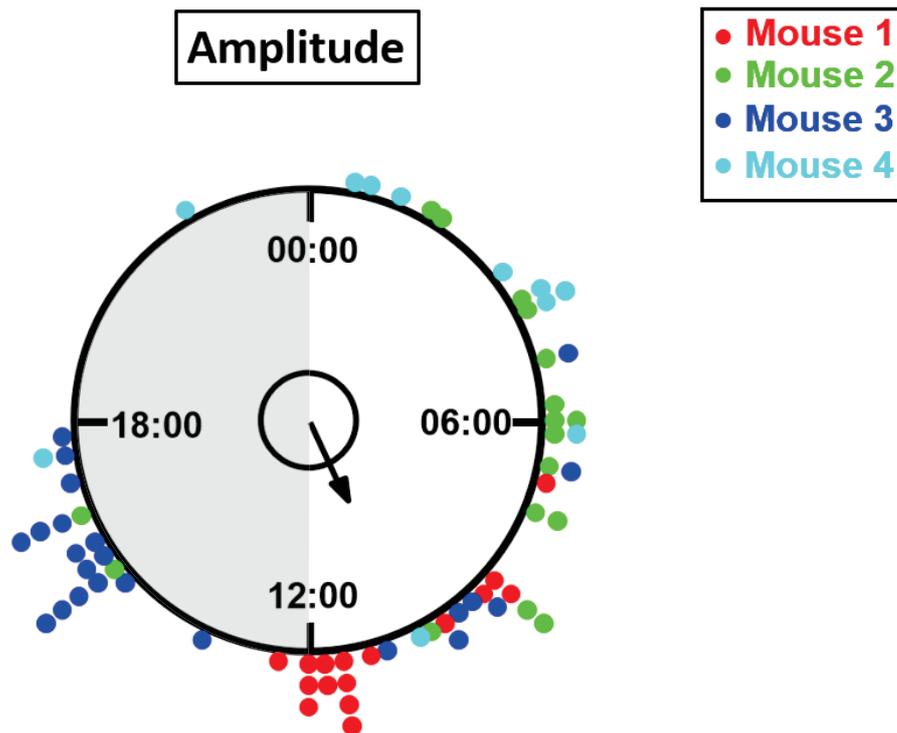


Figure 45 : Distribution des phases journalières de l'amplitude des activités cellulaires rapides.

2- Fréquence des événements les plus rapides

Nous avons aussi directement détecté les transitoires calciques sur la base de leur cinétique de montée, par seuillage de la dérivée du signal lissé (Figure 46A, dF/dt avec seuil de détection, placée sur la trace en Figure 46A). La fréquence de ces transitoires varie elle aussi au cours du temps (Figure 46B), selon un pattern très similaire à celui du paramètre d'amplitude (Figure 47).

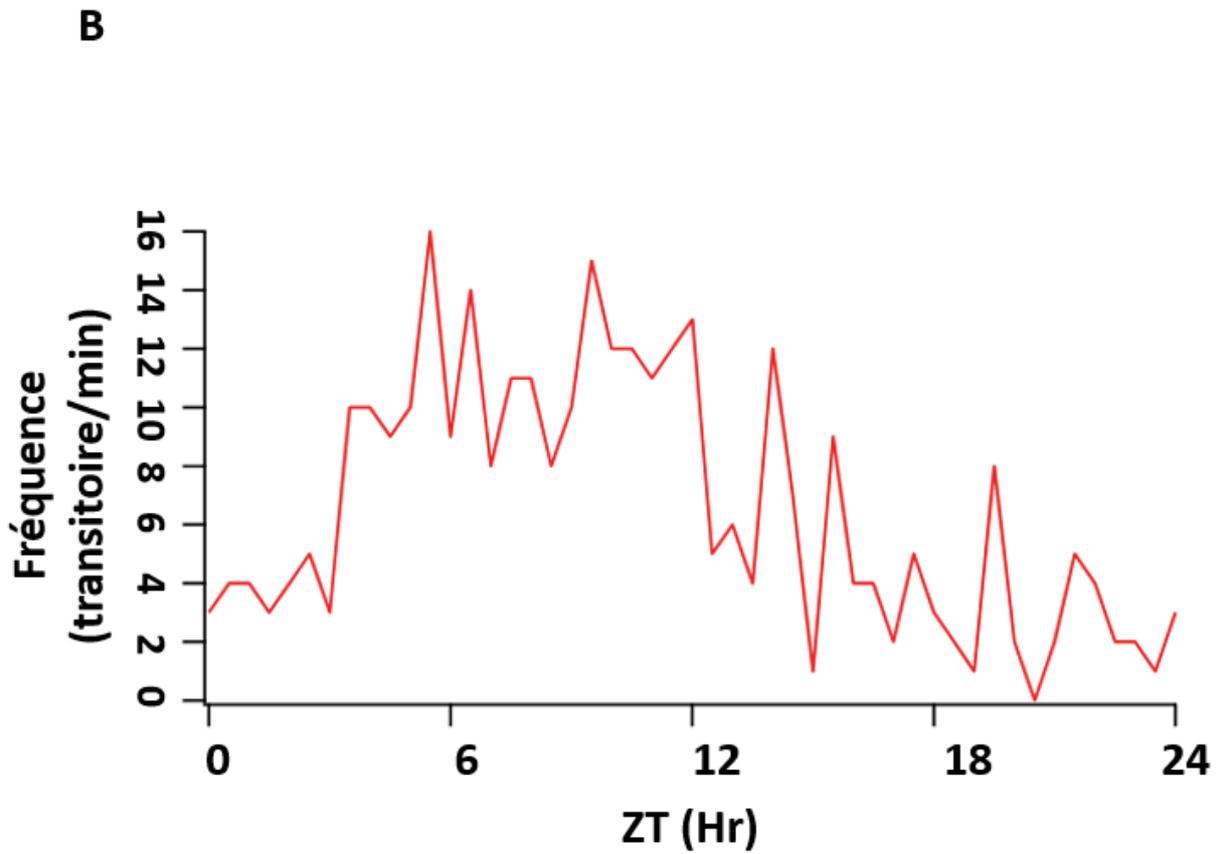
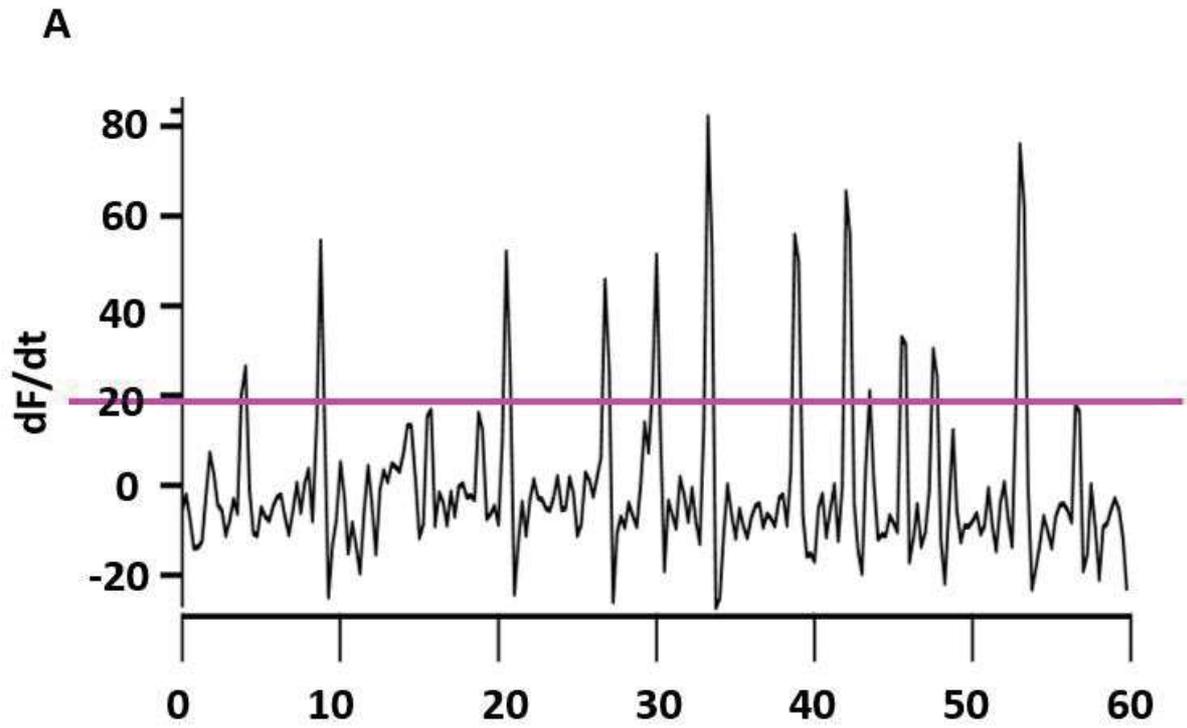


Figure 46 : Analyse des activités calciques rapides : estimation de la fréquence des transitoires.

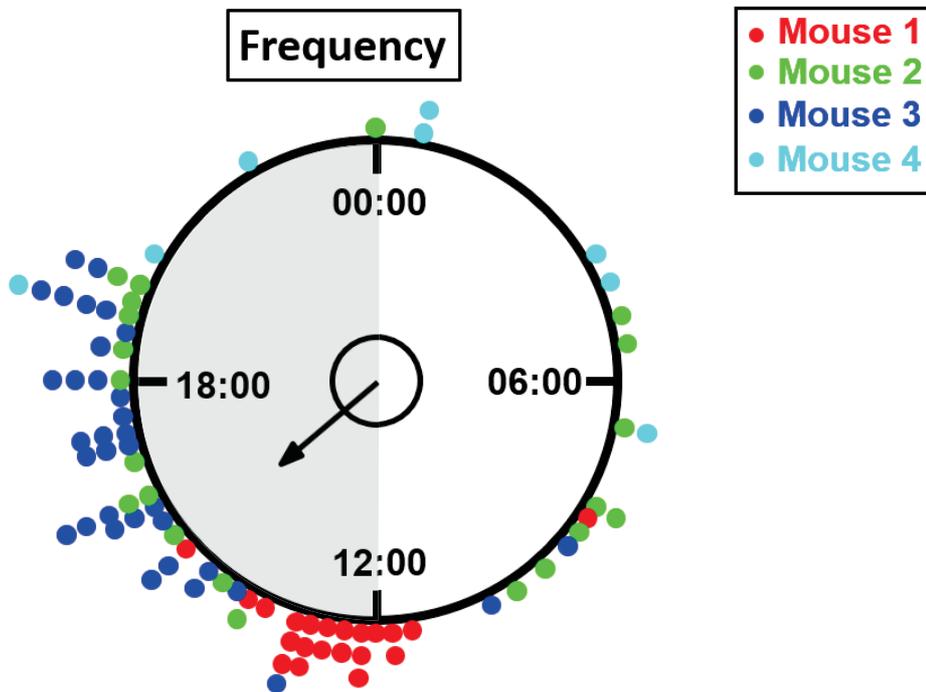


Figure 47 : Distribution de l'ensemble des phases journalières des fréquences de transitoires calciques.

De façon remarquable, les deux distributions, amplitudes et fréquences, sont très similaires, et les 2 paramètres sont significativement corrélés (Figure 48). Nos deux estimations des fluctuations rapides du signal GCaMP6f dans les cellules du NSC in vivo mettent donc en évidence leur régulation au cours du cycle jour-nuit.

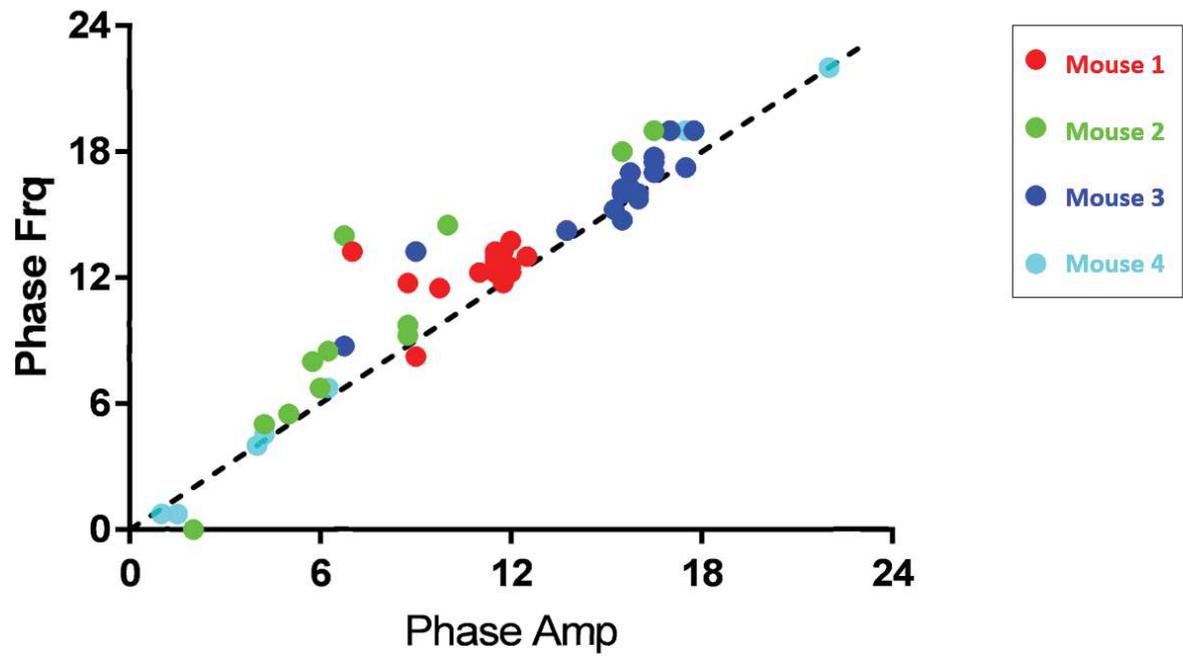


Figure 48 : Corrélation linéaire des phases des amplitudes et des phases des fréquences.

Nous nous retrouvons ainsi avec deux dynamiques calciques au niveau du NSC, CCR et transitoires rapides, régulées toutes les deux de façon journalière au sein de la même cellule, bien évidemment on veut savoir si elles sont reliées ?

Nous avons trouvé que les fluctuations rapides sont beaucoup plus petites que la variation circadienne du niveau de base du signal de chaque cellule (Figure 49), 1 à 2 log de différence pour une majorité de cellules (Figure 50). Ainsi, l'activité rapide ne participe pas vraiment, ou très peu à « l'enveloppe » du CCR cellulaire.

Mais, alors que l'activité calcique rapide est maximale à des phases différentes selon les souris (Figures 45 et 47), nous observons que le CCR des cellules de toutes les souris pique autour du moment du cycle jour-nuit (ZT6) (Figure 35). L'activité rapide n'est donc pas reliée à un moment précis ni à un niveau particulier du CCR cellulaire, et la relation de phase très dispersée entre le CCR et les transitoires (Figure 51) traduit probablement la diversité des types neuronaux que nous enregistrons dans les NSC. Pour autant, l'activité des cellules est remarquablement coordonnée au sein d'un même champ d'enregistrement, d'une même souris (Figures 45 et 47), ce qui interroge sur les systèmes de communication intercellulaire au sein du NSC. Ainsi, l'activité rapide ne modifie pas notablement le niveau moyen de calcium des cellules, mais elle apporte une possibilité de codage cellulaire jusqu'ici inconnu dans les NSC.

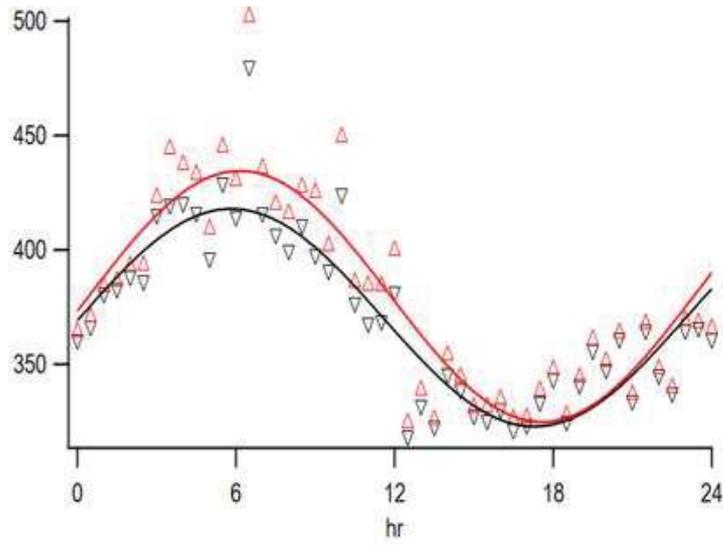


Figure 49 : Variation du 5^{ème} (noir) et 95^{ème} (rouge) percentile du signal GCaMP pour une même cellule pendant 24h.

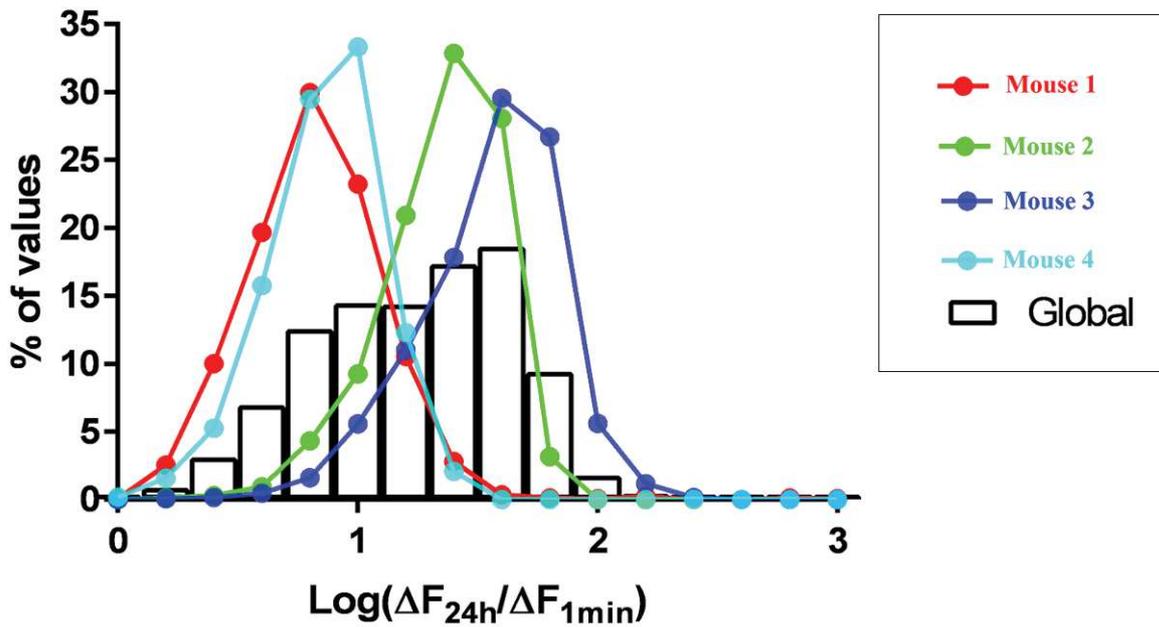


Figure 50 : Distribution des ratios d'amplitude des activités lentes et rapides (24h/1min) sur une échelle Log.

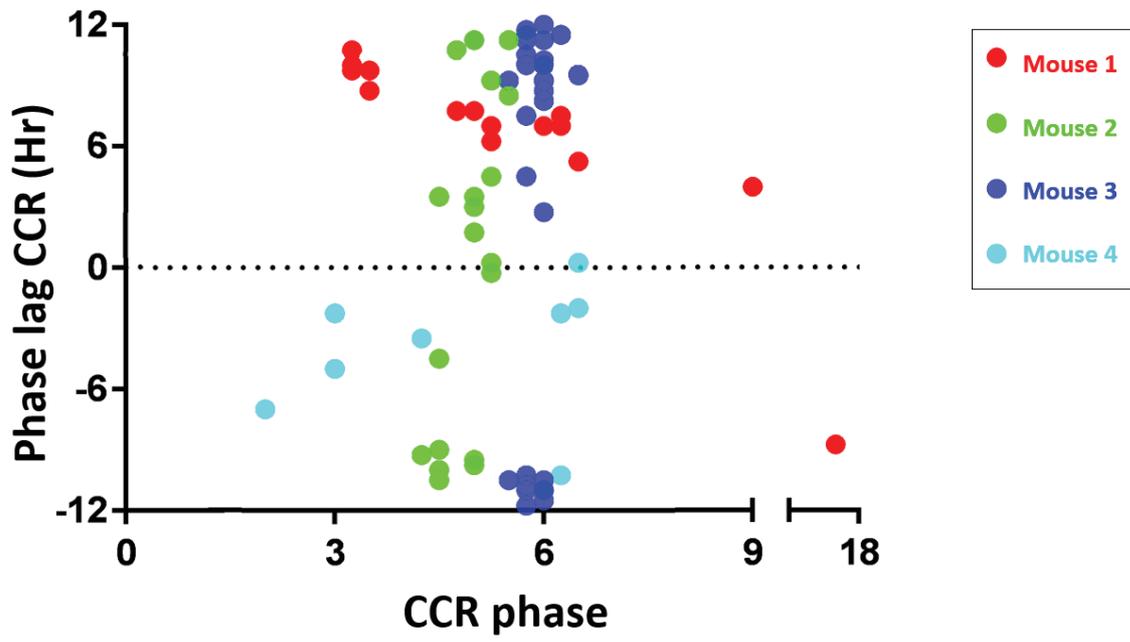


Figure 51 : Relation de phase entre le CCR et les transitoires rapides.

Nos données montrent in vivo l'existence d'une dynamique calcique rapide imbriquée dans la dynamique lente dans les cellules du NSC in vivo.

Dans ce chapitre nous avons montré pour la première fois une régulation journalière des variations rapides du Ca^{2+} cytosolique dans les cellules du NSC in vivo. Contrairement au CCR, cette activité calcique ne présente pas une phase fixe par rapport au cycle jour-nuit. Ainsi, le code binaire du CCR est complété in vivo par une activité calcique rapide modulée de façon plus complexe, en fonction des régions enregistrées dans le NSC.

Annexe chapitre 2 : Lumière et transitoires calciques

Bien que le CCR, comme déjà démontré dans le chapitre 1 est indépendant de la lumière, nous avons vu que la lumière induit une activité calcique rapide dans certaines cellules du NSC in vivo (Figure 52). Le nombre des cellules qui répondent à la lumière est faible (20%, Nombre totale de 50 cellules). Ce nombre nous paraît en accord avec le fait que premièrement nous enregistrons la partie dorso-médiale, choix stratégique pour conserver la structure et le réseau cellulaire de l'horloge intacte, et deuxièmement c'est la partie ventro-latérale du NSC est la partie photoréceptrice.

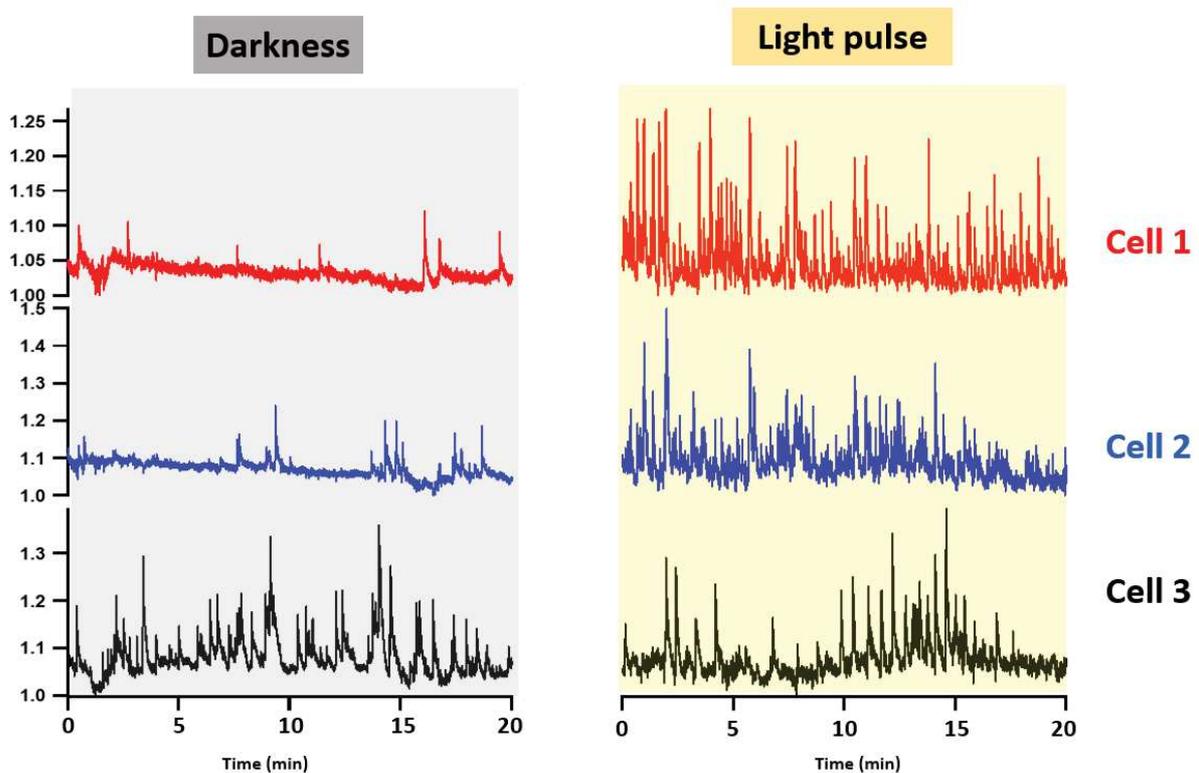


Figure 52 : Signaux calciques rapides en réponse à un stimuli lumineux au sein des cellules du NSC in vivo pendant la nuit.

Un enregistrement contrôle de 20 min à 10 Hz (Darkness), suivit d'un enregistrement de 20 min à 10Hz lors d'un stimulus lumineux (Light pulse). Exemples de 3 cellules qui ont changé de pattern (fréquence et amplitude) d'activité calcique en réponse à la stimulation lumineuse.

Chapitre 3 : Evidence de foyers de co-activité cellulaire rapide **synchrone dans les NSC in vivo.**

Comment s'organise l'activité du Ca^{2+} rapide à l'échelle du NSC ?

Notre compréhension actuelle de la physiologie du réseau cellulaire du NSC à partir des études sur tranches aiguës ou en cultures organotypiques témoigne que l'horloge centrale repose sur le couplage intercellulaire pour produire des rythmes cellulaires hautement coordonnés. De plus une étude a montré que la coordination du CCR passerait probablement par une voie calcique (Brancaccio et al., 2013). Nous venons de montrer pour la première fois, l'existence de signaux calciques rapides, modulés au cours du cycle jour-nuit, dans les NSC. Est-ce que cette activité calcique rapide pourrait être alors un nouveau mode de communication qui assure le couplage intercellulaire au sein du NSC et son haut niveau de coordination ?

Les cellules au sein du NSC s'activent ensemble. Encore mieux, mêmes des cellules localisées à deux extrémités du champ d'enregistrement semblent coordonner leurs activités (Figure 53). Nous avons alors essayé de mieux caractériser et de quantifier cette coordination des activités calciques rapides entre les cellules des NSC que nous voyons in vivo.

Nous avons remarqué que les événements significatifs de synchronisation correspondent généralement à des fluctuations du signal global (Figure 54), ce qui indique qu'ils concernent une proportion suffisamment grande de cellules pour émerger du bruit général. Ainsi, cela suggère que les événements photométriques récemment rapportés (Jones et al., 2018) correspondent à des transitoires unitaires coordonnés. De plus, nous observons ces événements tout au long du cycle jour-nuit, suggérant que les cellules du NSC peuvent coordonner leur activité de façon continue in vivo (Figure 55).

Il n'empêche que plusieurs points d'interrogation importants subsistent. Et l'une des premières était : cette activité cellulaire rapide synchrone est-elle une propriété intrinsèque au NSC ou bien une résultante d'intégration des inputs que reçoit le NSC in vivo ?

Pour répondre à cette question, il a fallu isoler le NSC (et revenir ainsi à un système réduit !), pour empêcher toutes entrées et sorties susceptibles d'engendrer une réponse collective au sein du réseau. J'ai effectué de l'imagerie calcique sur tranches de NSC issus de souris adultes exprimant la sonde calcique GCaMP6f. Nous retrouvons une activité du Ca^{2+} rapide coordonnée entre les cellules du NSC (Figure 56). Cette activité en cluster est donc une propriété intrinsèque du NSC. Pour aller plus loin, nous avons regardé si une population cellulaire spécifique du NSC présente ce type d'activité. Nous avons alors enregistré l'activité calcique cellulaire sur tranche du NSC issu d'un croisement d'une souris transgénique AVP-cre avec une lignée floxée pour la GCaMP6f. En effet, nous retrouvons cette activité du Ca^{2+} rapide coordonnée au sein des neurones AVP (Figure 57).

La deuxième question sur la liste est : l'activité calcique rapide des NSC est-elle affectée par les perturbations de l'horloge circadienne ? Nos données montrent que les transitoires calciques unitaires ainsi que les événements intercellulaires coordonnés sont résilients face aux perturbations physiques et génétiques de l'horloge. En effet, le jetlag ne perturbe pas l'apparition des transitoires cellulaires ni leur coordination en événements significatifs (Figure 58).

De plus, l'enregistrement des souris *Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-} dépourvues d'horloge moléculaire nous montre d'abord que le CCR est assez fortement altéré (Figure 59), bien qu'une petite proportion de cellules conserve un pattern journalier de leur baseline (20% cellules vs 100% chez les WT). En revanche, les NSC de ces souris *Cry1*^{-/-} *Cry2*^{-/-} présentent toujours des transitoires calciques (Figure 60A), et coordonnés en événements significatifs (Figure 60B). L'activité calcique rapide des cellules des NSC et l'organisation intercellulaire qui permet sa coordination à grande échelle ne sont donc pas dépendantes de l'horloge circadienne, et révèlent ainsi une propriété émergente de l'architecture du réseau cellulaire du NSC.

L'étendue des foyers d'activité synchrone (mesurée en cell.clusters) est directement corrélée à l'activité calcique rapide dans le champs enregistré (Figure 61), et ces foyers apparaissent à tous moments du cycle jour-nuit (Figure 55). Ainsi, les cellules du NSC semblent recevoir ou échanger en permanence des signaux de synchronisation, suggérant que la coordination au sein du réseau cellulaire du NSC repose sur un mécanisme indépendant des transitions jour-nuit ou d'autres paramètres situés précisément sur l'axe du temps.

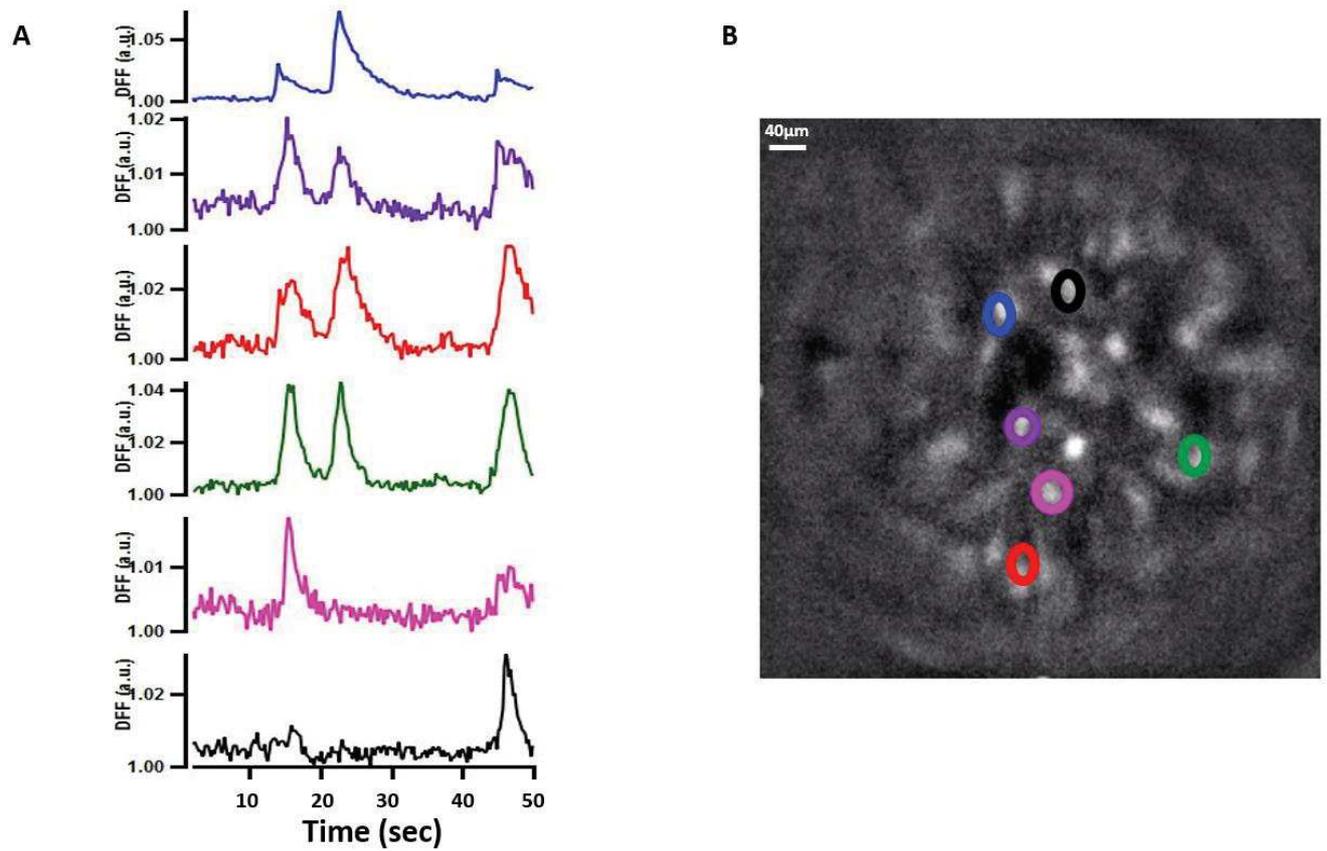


Figure 53 : Organisation spatiale de l'activité calcique rapide des NSC in vivo.

Exemples de traces calciques d'un enregistrement d'une minute à 4Hz (A), et leurs positions dans le champ (B).

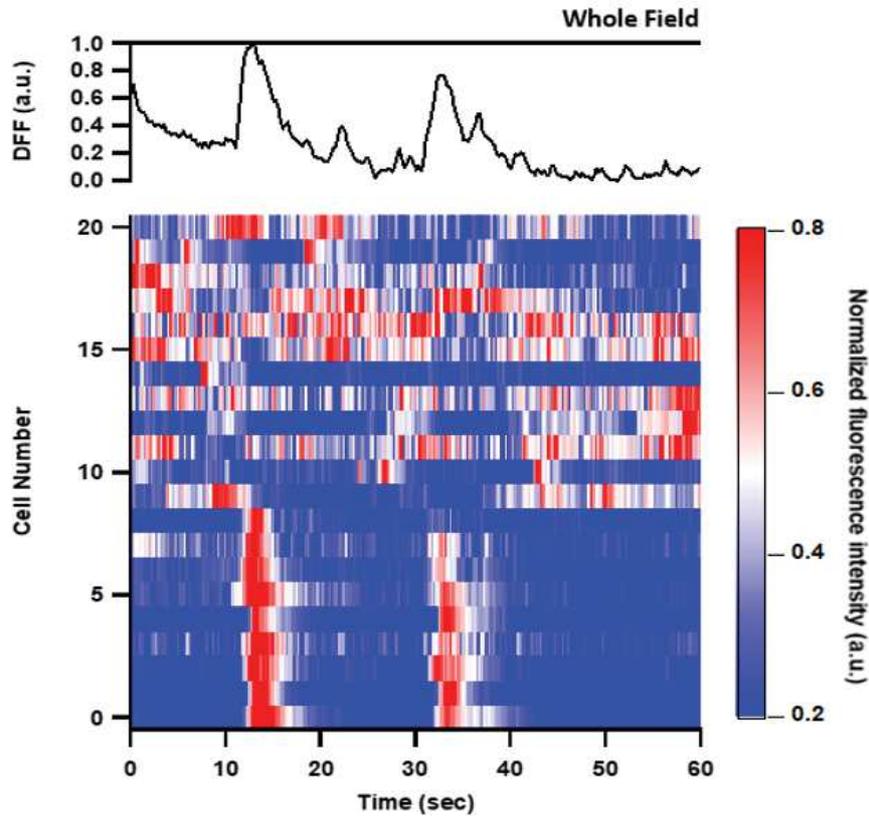


Figure 54 : L'activité calcique rapide organisée des cellules du NSC in vivo rend compte de l'activité du champ global.

Graphe du haut : La ligne noir représente la moyenne de la variation du calcium au niveau du champs entier (Whole field). Raster plot : Chaque ligne représente une cellule. Les couleurs rouge et bleu correspondent à une activité calcique maximale et minimale respectivement.

Pour cet animal, l'enregistrement d'une minute à 4Hz sur 22 cellules au total, montre que à chaque fois une activité calcique synchronisée se produit entre les cellules (N1 à N6), une activité significative ressort au niveau global.

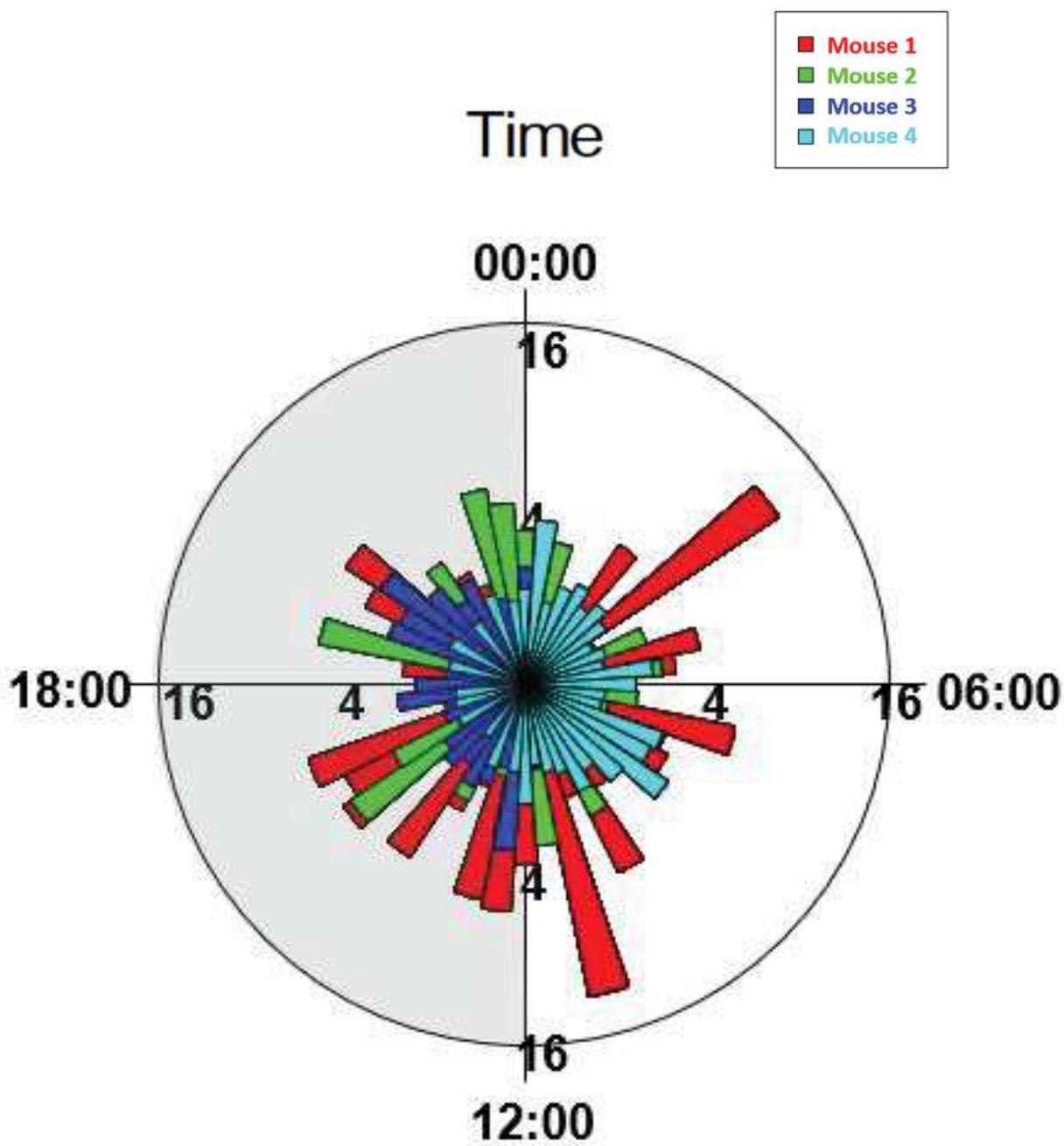
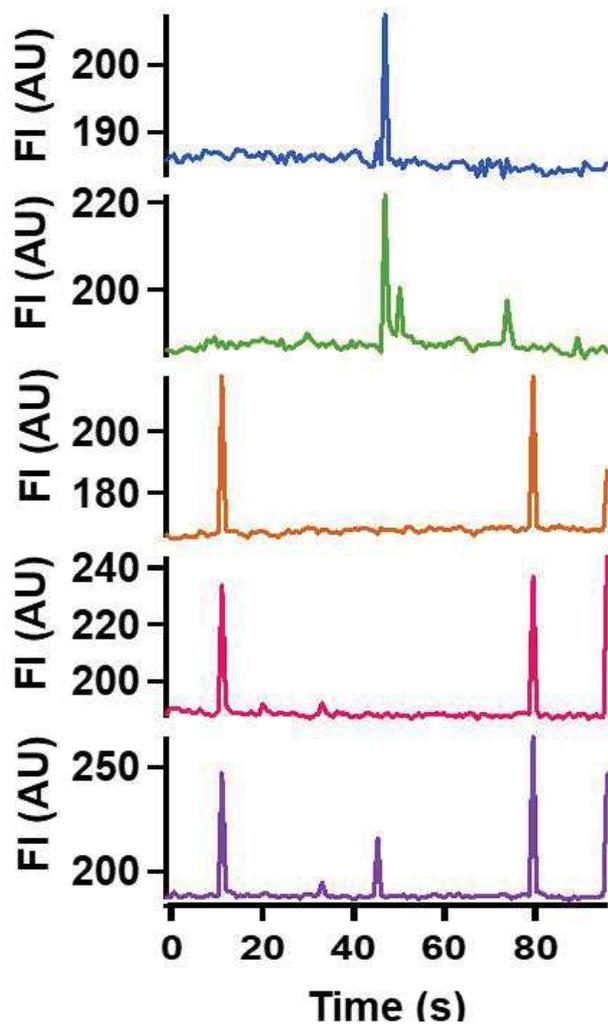
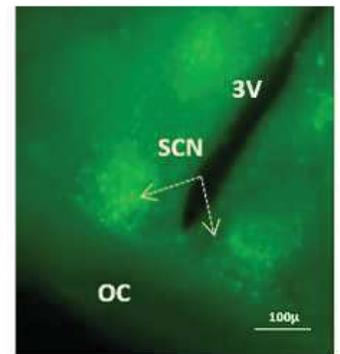


Figure 55 : Distribution des clusters en fonction du temps.



AAV9.CAG.GCamp66



OC : Optic Chiasma ;
3V : Third ventricle ;
SCN : Suprachiasmatic Nucleus

Figure 56 : Imagerie calcique cellulaire ex vivo du NSC d'une souris sauvage adulte qui exprimant la GCamp6f par une approche virale (AAV9-GAG-GCaMP6f).

Exemples de traces de l'activité calcique de 5 cellules différentes (graphe de gauche) enregistrées au sein de la tranche du NSC (image de droite). Acquisition : 2 min à 4 HZ.

Tranches coupées au vibratome (épaisseur de 300µm) et imagées par un stéréomicroscope (Zeiss Discovery V.12).

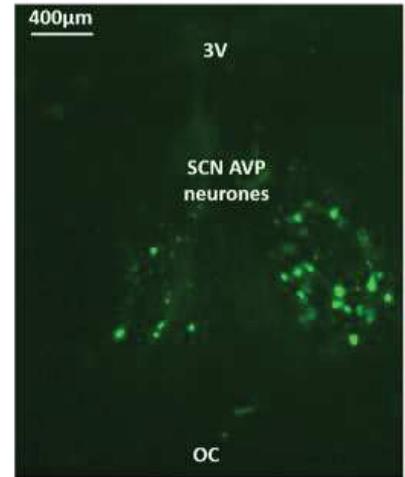
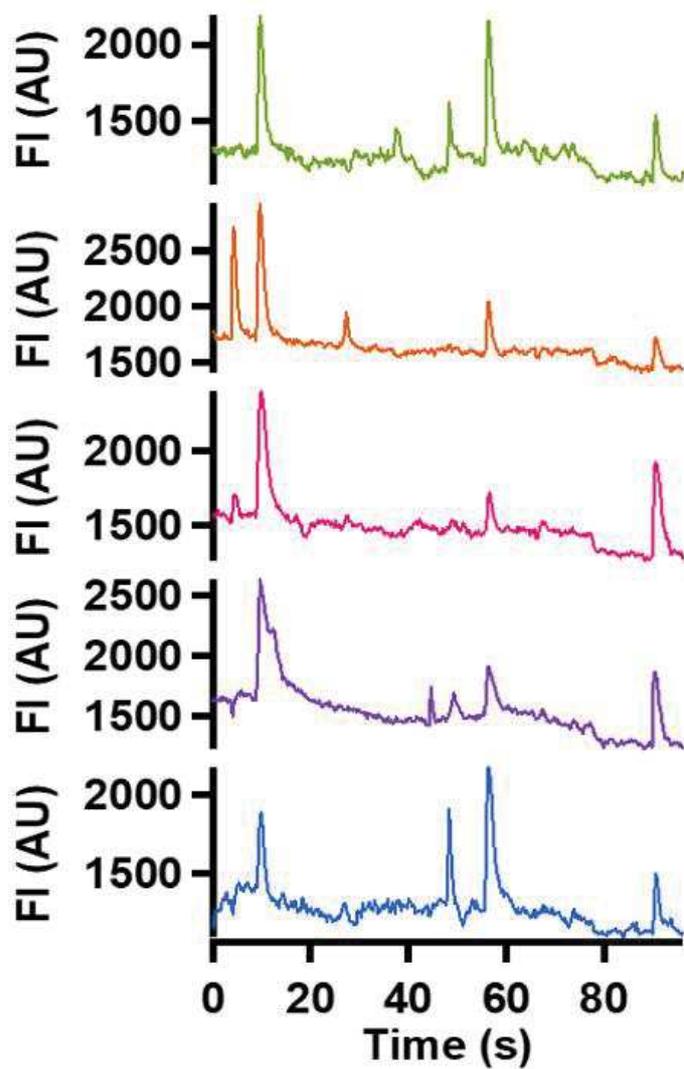


Figure 57 : Imagerie calcique cellulaire ex vivo des neurones AVP du NSC d'une souris transgénique AVP-Cre exprimant la GCamp6f par rapproche transgénique.

Exemples de traces de l'activité calcique de 5 cellules différentes (graphe du gauche) enregistrées au sein de la tranche du NSC (image de droite). Acquisition : 2 min à 4 HZ.

Tranches coupées au vibratome (épaisseur de 300µm) et imagées par un stéréomicroscope (Zeiss Discovery V.12).

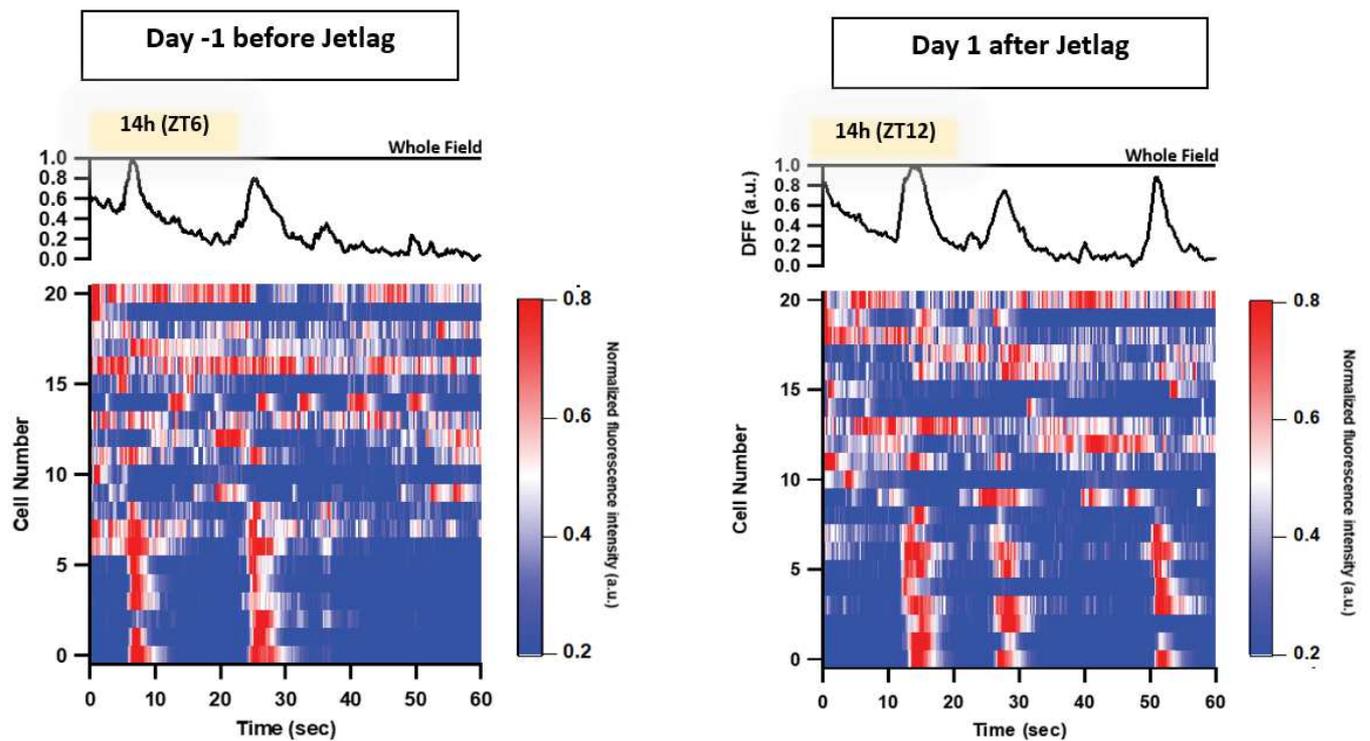


Figure 58 : L'activité calcique rapide organisée des cellules du NSC in vivo est résiliente face au Jetlag.

Graphe du haut : La ligne noir représente la moyenne de la variation du calcium au niveau du champs entier (Whole field). Raster plot : Chaque ligne représente une cellule. Les couleurs rouge et bleu correspondent à une activité calcique maximale et minimale respectivement.

Pour cet animal, l'enregistrement d'une minute à 4Hz sur 22 cellules au total, montre que à chaque fois une activité calcique synchronisée se produit entre les cellules (N1 à N6), une activité significative ressort au niveau global. Ces clusters d'activité sont résistants à la perturbation physique de l'horloge.

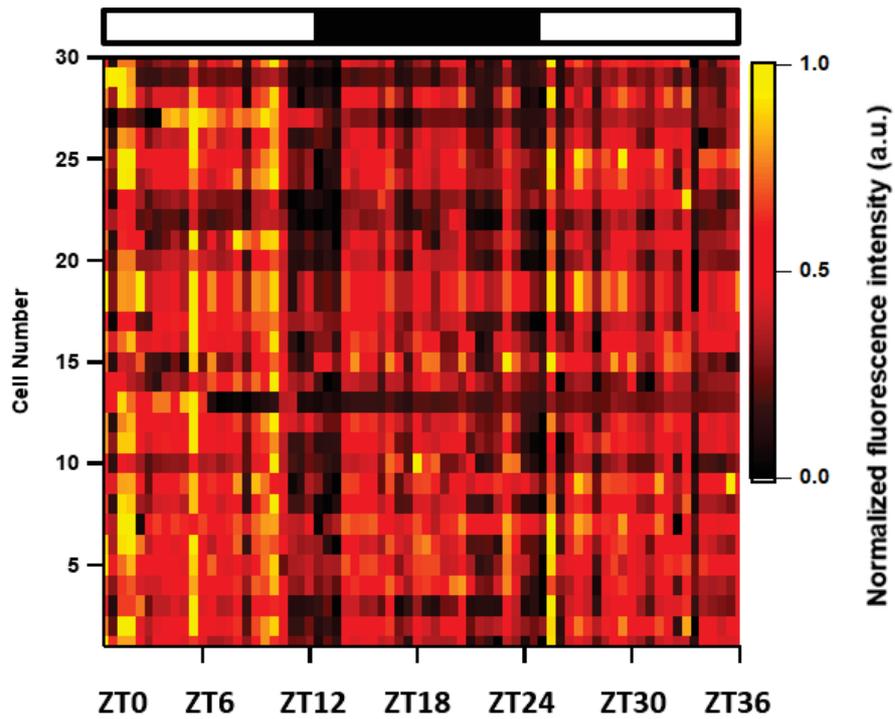


Figure 59 : Altération du CCR chez la souris Cry1^{-/-} Cry2^{-/-}.

Chaque ligne représente une cellule. Les couleurs jaune et noir correspondent à un niveau du calcium basal maximal et minimal respectivement.

Pour cet animal, l'enregistrement d'une minute à 4Hz sur 30 cellules au total, montre que le CCR est assez fortement altéré lors d'une perturbation génétique de l'horloge.

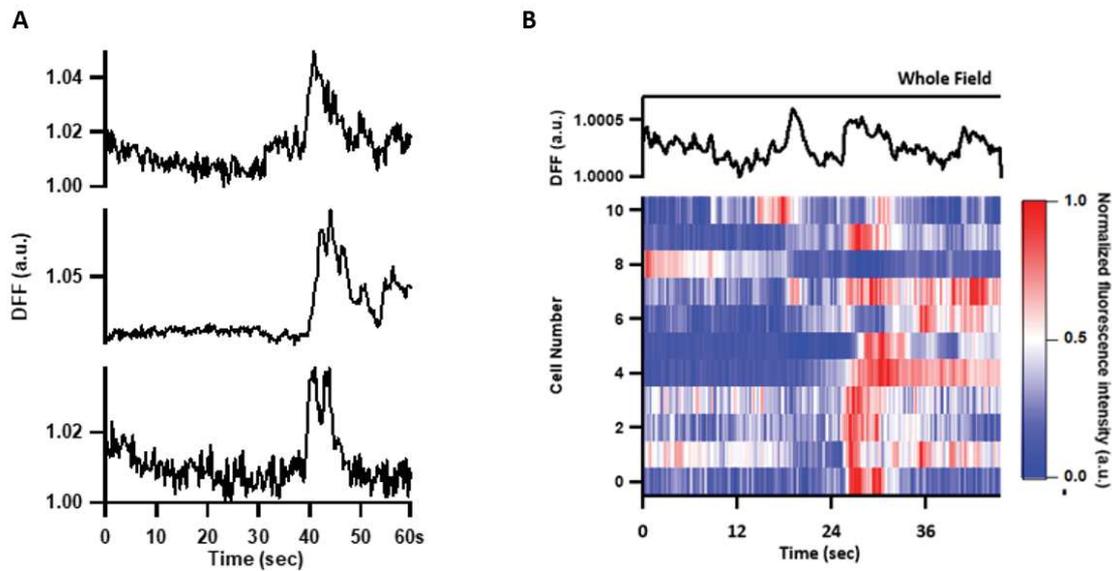


Figure 60 : L'activité calcique rapide organisée des cellules du NSC in vivo est résiliente à la perturbation génétique.

A- Exemples de traces calcique (1 min à 4Hz) de 3 cellules différentes d'une souris *Cry1-/- Cry2-/-* enregistrée in vivo.

B- Graphe du haut : La ligne noire représente la moyenne de la variation du calcium au niveau du champs entier (Whole field). Raster plot : Chaque ligne représente une cellule. Les couleurs rouge et bleu correspondent à une activité calcique maximale et minimale respectivement.

Pour cet animal, l'enregistrement d'une minute à 4Hz sur 22 cellules au total, montre que à chaque fois une activité calcique synchronisée se produit entre les cellules (N1 à N6), une activité significative ressort au niveau global. Ces clusters d'activité sont résistants à la perturbation physique de l'horloge.

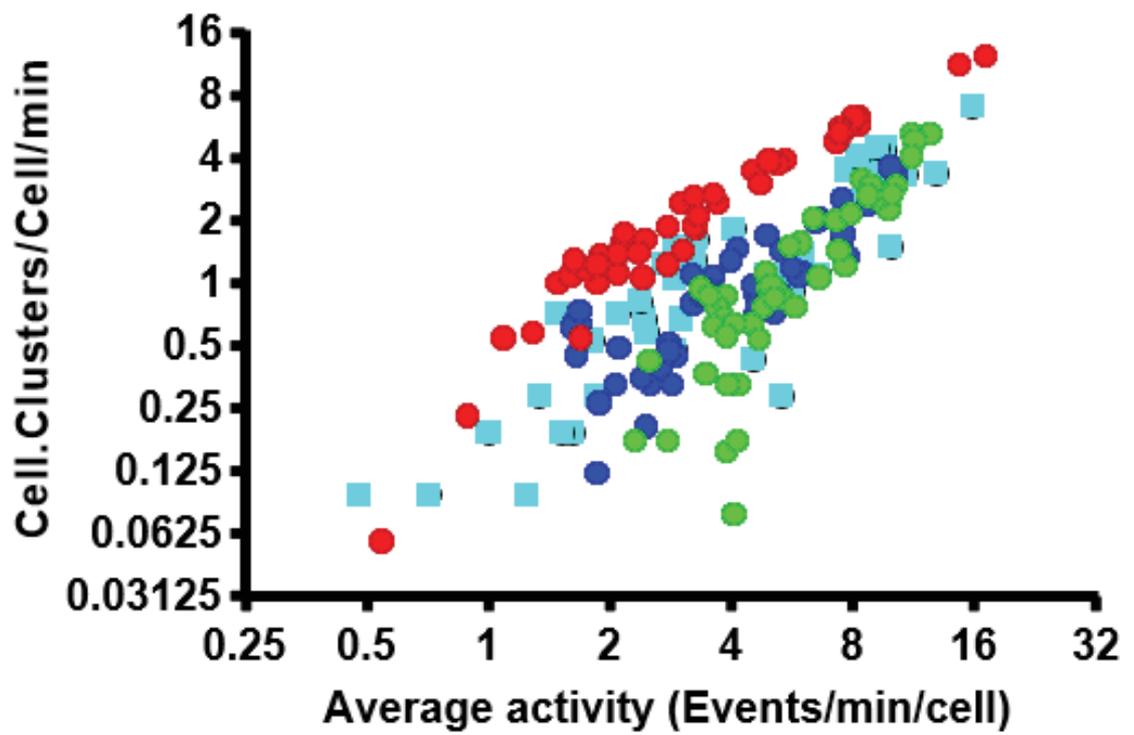


Figure 61 : L'étendue des foyers d'activité synchrone est dépendante de l'activité générale.

Nos données montrent la synchronisation spatiale cellulaire dans le NSC in vivo.

Dans ce chapitre nous avons vu que l'activité calcique rapide des cellules est remarquablement coordonnée au sein du même champ d'enregistrement, d'une même souris. L'activité calcique rapide des cellules du NSC et l'organisation intercellulaire qui permet sa coordination à grande échelle ne semblent pas dépendre de l'horloge circadienne, mais plutôt de propriétés intrinsèques au NSC. Bien que les cellules du NSC des souris doubles mutantes *Cry1*^{-/-} ; *Cry2*^{-/-} perdent leur coordination circadienne, nous retrouvons que les transitoires calciques restent observables, et coordonnés en événements significatifs suggérant que cette organisation rapide dépend de la circuiterie du NSC.

Plus il y a de l'activité au sein du réseau plus les cellules du NSC se coordonnent et forment des foyers d'activité synchrone. De façon très intéressante, ces clusters sont présents au sein du réseau cellulaire du NSC tout au long du cycle jour-nuit ce qui montre que dans les NSC des mammifères, il y a de la coordination à tout moment du cycle jour-nuit.

Les cellules du NSC au sein du réseau natif in vivo présentent :

- 1- Des variations **lentes** du Ca^{2+} cytosolique régulées de façon circadienne, coordonnés au sein du même animal et robuste face aux perturbations.
- 2- Des variations **rapides** du Ca^{2+} cytosolique régulées de façon journalière, coordonnées au sein du même animal et robuste face aux perturbations.
- 3- **Pas de relation de phase** entre les variations lentes et les transitoires rapides du calcium.
- 4- Des **foyers d'activité rapide synchrone**. Le clustering est une **propriété émergente** du NSC et se produit **tout au long du cycle jour-nuit**.

**Un codage spatio-temporel calcique complexe au sein du NSC
in vivo est donc possible !**

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le travail de ma thèse, **imagerie calcique à résolution cellulaire des NSC in vivo, chez la souris vigile et libre de ses mouvements**, nous éclaire sur de nouveaux aspects de la physiologie cellulaire du pacemaker circadien qui jusqu'aujourd'hui restaient mal compris faute notamment d'outils appropriés. Nous avons montré dans cette étude la possibilité de suivre in vivo l'activité neuronale à l'échelle cellulaire de l'horloge circadienne sur de longues durées, en préservant l'ensemble des régulations physiologiques auxquelles l'horloge est soumise. L'outil que nous avons adapté, représente un déverrouillage technique important dans l'étude de l'horloge circadienne.

Mes travaux de thèse révèlent de nouvelles caractéristiques importantes sur le fonctionnement du réseau cellulaire de l'horloge chez la souris adulte en fonction du cycle jour-nuit :

Le pacemaker circadien est doté d'une activité calcique cellulaire rapide imbriquée dans le « CCR » (Circadian Calcium Rhythm), révélant une coordination intercellulaire sur plusieurs échelles de temps dans le NSC in vivo.

Mais en fait, le calcium dans la cellule, il sert à quoi ? Les cellules vivantes répondent aux signaux extérieurs par la transduction de l'information en un message intracellulaire. L'ion calcium (Ca^{2+}) est l'une des molécules les plus fréquemment rencontrées dans ce rôle de second messenger. En l'absence de toute stimulation, la concentration en Ca^{2+} cytosolique est basse (10-100 nM). Après stimulation, cette concentration augmente fortement (parfois au-delà de 1 μM) et permet l'activation d'une cascade complexe conduisant à la réponse de la cellule.

Mais alors, comment une molécule aussi simple que cet ion divalent peut réguler autant de fonctions si diverses ? Le secret se trouve dans l'existence d'un code composé par plusieurs paramètres : **amplitude**, **durée**, et **fréquence** (constituant ce que nous appelons un « pattern » d'activité calcique). La modulation de ce code/pattern au cours du temps et de l'espace (subcellulaire et/ou intercellulaire) explique la diversité d'action du Ca^{2+} .

Mes résultats montrent qu'un tel mode de codage est possible dans les NSC.

Dans les NSC, siège de l'horloge circadienne principale chez les Mammifères, la rythmicité cellulaire autonome et l'architecture unique du réseau sont responsables de la production des oscillations avec une période intrinsèque proche de 24 heures, en résonance avec le cycle géophysique jour-nuit. Les études antérieures menées sur des tranches de NSC en culture montrent que les neurones du NSC présentent un rythme circadien de leur Ca^{2+} cytosolique (Pennartz et al., 2002; Ikeda, 2004; Enoki et al., 2017a). Ces rythmes calciques circadiens sont critiques pour le fonctionnement du pacemaker circadien (Lundkvist, 2005). Seul ce CCR, a été au centre des recherches pendant des années. Notre travail démontre **l'existence d'autres cinétiques calciques**, offrant un codage plus complexe au sein du pacemaker circadien.

1. Au cours du temps : une bi-régulation temporelle du calcium dans les cellules des noyaux suprachiasmatiques in vivo.

1.1. Mise en évidence d'un nouveau profil d'activité calcique dans le NSC in vivo

Les oscillations rythmiques lentes du Ca^{2+} cytosolique permettent un codage de l'information circadienne sur le cycle jour-nuit. Il reste quand même difficile d'imaginer, qu'au sein du réseau neuronal du NSC, d'autres types de codages d'information, sur des délais beaucoup plus brefs sont inexistantes.

Notre travail démontre que deux dynamiques temporelles, une lente et une rapide, du calcium cytosolique cohabitent dans les neurones des noyaux suprachiasmatiques au sein du tissu organisé in vivo. Cette complexité offre de nouvelles possibilités de codage temporel, passant d'un mode binaire de type "ON-OFF" basé sur la seule amplitude du signal, à un système intégrant aussi une modulation en fréquence d'évènements calciques rapides.

La plupart des cellules du NSC in vivo présente une modulation en fréquence de leurs transitoires calciques. Pourtant, ce genre de profil temporel, n'avait jusque-là été observé que de façon anecdotique sur tranches de NSC (Ikeda et al., 2003b; Irwin and Allen, 2007, 2010). Par exemple, une stimulation du tractus rétino-hypothalamique (RHT) à des fréquences simulant une entrée lumineuse (Irwin and Allen, 2010), évoque des transitoires calciques rapides au sein des neurones du NSC. Même, d'autres variations ultradiennes du calcium cytosolique (période de 0.5 à 4 heures), d'origine apparemment extrinsèque au NSC ont aussi été décrites (Wu et al., 2018). Leur rôle reste mal compris et leur existence a longtemps été considérée comme purement artéfactuelle (Hong et al), nous apportons ici l'évidence que des

transitoires calciques existent bel et bien dans le NSC. Cela laisse entendre que, d'autres types de codages d'informations, sur des délais beaucoup plus brefs existent au sein du pacemaker circadien.

1.2. Dépendance ou interdépendance entre les dynamiques lente et rapide ?

Les amplitudes de la dynamique rapide sont minimales par rapport à la dynamique lente. Elles ne participent donc pas ou très peu à l'enveloppe du CCR et donc n'interfèrent pas avec le signal circadien. En revanche, la dynamique calcique rapide que nous avons détecté, est modulée de façon journalière à l'échelle de la cellule (au moins 30-40% des cellules d'après nos analyses avec JTK-Cycle), mais avec un maximum de fréquence très variable entre l'ensemble des cellules par rapport au pic du CCR. Ces deux dynamiques semblent donc être plus ou moins indépendantes l'une de l'autre. La diversité des profils temporels d'activité et de leurs modulations élargissent encore les possibilités du codage fonctionnel des informations au sein du NSC.

1.3. Rôle potentiel d'une autre dynamique calcique beaucoup plus rapide au sein de neurones codant le temps sur 24 ?

Une activité calcique rapide qui se greffe sur l'enveloppe circadien, peut être le moyen de porter des messages rapides aux cellules du NSC. Cette dynamique rapide du calcium pourrait être l'un des moyens contribuant à la rythmicité électrique des neurones. Le canal potassique à large conductance calcique BK (Ca^{2+} -activated K^+ channel) est exprimé de façon rythmique dans le NSC et joue un rôle important pour le maintien d'état hyperpolarisé des neurones NSC pendant la nuit. En effet, son inactivation, entraîne une augmentation de la fréquence de la décharge neuronale pendant la nuit (Meredith et al., 2006). Leur activation est régulée, en partie par le Ca^{2+} intracellulaire. Pour permettre cette régulation, les canaux BK sont fonctionnellement couplés aux canaux calciques voltage dépendant (VGCC) et aux canaux servant d'intermédiaires pour la libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires (Harvey et al., 2020). Il n'est pas donc impossible, que l'activité calcique rapide que nous voyons puisse être impliquée dans ce processus.

De plus, notre analyse de ces signaux rapides à l'échelle multicellulaire suggère qu'ils pourraient être des acteurs majeurs de la coordination intercellulaire essentielle aux propriétés uniques du pacemaker circadien.

2. Dans l'espace : foyers d'activité synchrone dans le NSC

Comment les cellules se coordonnent-elles au sein d'un réseau neuronal ? Pour se coordonner, il faut d'abord communiquer. La communication passe par la transmission de l'information d'une cellule à une autre. La transmission chimique qui permet, dans le système nerveux, de faire passer une information d'un neurone présynaptique à un élément post-synaptique, impliquant la transduction du signal par des seconds messagers, tels que le calcium.

2.1. Coordination intercellulaire

De façon tout à fait intéressante, la distribution spatiale des signaux calciques rapide *in vivo* met en lumière un niveau de coordination intercellulaire à une échelle jusqu'alors ignorée dans les NSC. Cette distribution révèle des foyers d'activité calcique synchrone entre cellules des NSC. Ces foyers concernent un nombre restreint de cellules dans un champ d'enregistrement (une petite dizaine tout au plus) mais doivent être suffisamment conséquents à l'échelle du NSC pour provoquer des oscillations rapides du signal GCamp6 global, telles que nous les avons observées, en ligne avec les mesures photométriques rapportées précédemment (Jones et al., 2018). Des travaux antérieurs ont montré l'importance des voies de signalisation liées au calcium intracellulaire dans la coordination au sein du réseau neuronal des NSC (Brancaccio et al., 2013). Nos observations apportent une réalité physique à ce concept, avec une activité calcique rapide qui reflète une extrême coordination intercellulaire *in vivo*.

2.2. Des indications concernant la topologie de ce système de coordination intercellulaire ?

En plus de son organisation temporelle, la distribution spatiale du signal calcique est aussi pertinente. N'empêche que, la position exacte d'une cellule n'est parfois pas primordiale pour supporter une information. En effet, nos travaux actuels pour essayer de mieux comprendre les foyers synchrones, semblent plutôt exclure une organisation hiérarchisée au sein du NSC. Deux modes principaux de communication ont été décrits ou inférés dans le NSC : une communication paracrine par diffusion de neuropeptides, et une communication synaptique plus hiérarchisée selon un agencement *scale-free*, du type *small-world* (Hastings et al., 2018). Contrairement à une organisation *scale-free* qui implique une forte proportion de cellules faiblement connectées, et une petite proportion de cellules « hubs » fortement connectées, nous observons que toutes les cellules peuvent être impliquées dans un événement synchrone avec de nombreuses autres cellules au cours d'un cycle de 24h. De plus, seul le niveau d'activité

paraît gouverner l'apparition des foyers d'activité synchrone, de manière stochastique : plus les cellules du champ sont actives, plus l'étendue de la coactivité est grande.

2.3. Codage temporel assuré par l'organisation spatiale ?

Comme l'activité calcique rapide des cellules est globalement présente à tout moment dans les NSC in vivo, les foyers synchrones apparaissent tout au long du cycle jour-nuit, indiquant que des signaux de communication circulaient dans les NSC probablement en permanence. Ces signaux sont robustes face aux perturbations de l'horloge, notamment au cours du jetlag où nous avons observé une existence préservée des foyers d'activité synchrone. Ainsi, les éléments de coordination intercellulaire dans les NSC in vivo révèlent une organisation stochastique mais robuste qui pourrait très probablement contribuer à la coordination des dynamiques cellulaires circadiennes du pacemaker circadien

2.4. Origine des signaux synchrones ?

L'origine de ces signaux de synchronisation reste inconnue. Une activité calcique rapide durant la journée pourrait tout à fait être reliée à l'activité électrique diurne, mais cela semble peu probable quand son maximum se produit pendant la nuit. Notre approche in vivo ne permet pas de discriminer les communications d'origine intrinsèque aux NSC et les signaux issus d'autres parties du cerveau, ou même systémiques. Cependant, nous avons observé des foyers synchrones sur des tranches de NSC, suggérant que des signaux d'origine propre au NSC puissent y contribuer. La diffusion de signaux paracrines tels que le VIP et l'AVP paraît être un mécanisme possible (Colwell et al., 2003; Harmar et al., 2002; Yamaguchi et al., 2013).

L'ensemble de ce travail de thèse démontre la faisabilité et l'intérêt d'étudier le fonctionnement de l'horloge interne au niveau tissulaire, in vivo. En effet, au prix de plusieurs développements techniques, nous avons pu mettre en évidence des éléments révélant une organisation temporelle, constituée de plusieurs paliers, offrant un nouveau degré de complexité de la signalisation calcique dans les noyaux suprachiasmatiques. Les résultats de cette étude décrivant la physiologie du pacemaker circadien in vivo en condition contrôle chez des souris sauvages, pourront, dans l'avenir, servir de base pour l'étude d'autres situations physiopathologiques.

Comment les jeunes mères allaitantes adaptent-elles le fonctionnement de leur horloge interne pour faire face, à toute heure, aux besoins de leurs petits ? Une étude récente de mon laboratoire d'accueil a révélé que l'activité électrique des neurones du NSC est diminuée durant la lactation chez la souris femelle (Abitbol et al., 2017). Un phénomène observé jusqu'au sevrage et qui pourrait permettre précisément à la mère de mettre entre parenthèse son propre rythme biologique pour se caler sur celui des petits. Lorsqu'il s'agit d'assurer la survie de l'espèce, l'horloge montre une certaine souplesse. Ainsi, est-ce que la lactation altère la physiologie et la coordination au sein du NSC ?

CONCLUSION

Un petit rappel d'un passage apparu au début de ce manuscrit de thèse :

« Par analogie avec l'horloge fabriquée par l'Homme que nous utilisons pour respecter les délais sociaux, l'horloge interne organise la rythmicité des différentes fonctions biologiques de manière à ce qu'elles soient coordonnées et en accord avec la journée terrestre de 24 heures ». (Introduction I.1.A / Physiologie en harmonie avec la nature ?).

À la fin de cette thèse, ce passage me laisse penser :

Par analogie avec l'horloge fabriquée par l'Homme, l'horloge interne n'a-t-elle pas aussi besoin d'une trotteuse (celle que l'on voit bouger sans cesse) pour indiquer les secondes ?

Au vu de ce travail, et après un certain recul, (et beaucoup de discussions) un semblant de réponse à ma question :

Notre horloge interne, gouverne nos rythmes biologiques tout au long de la journée de 24h, mais elle utilise aussi un mécanisme plus rapide qui telle la trotteuse oscille au gré des secondes.

*Le 22 septembre 2000, mon directeur de thèse, a ouvert l'introduction de sa thèse par la phrase culte de Berridge :
« Presque tout ce que nous faisons est contrôlé par le calcium »
... Vingt ans après, je referme la mienne par exactement la même phrase !*

PUBLICATIONS



Review

Molecular and Cellular Networks in The Suprachiasmatic Nuclei

Lama El Cheikh Hussein, Patrice Mollard and Xavier Bonnefont * 

Institut de Génomique Fonctionnelle (IGF), University Montpellier, CNRS, INSERM, 34094 Montpellier, France; Lama.El-Cheikh@igf.cnrs.fr (L.E.C.H.); Patrice.Mollard@igf.cnrs.fr (P.M.)

* Correspondence: Xavier.Bonnefont@igf.cnrs.fr; Tel.: +33-4-3435-9306

Received: 1 April 2019; Accepted: 23 April 2019; Published: 25 April 2019



Abstract: Why do we experience the ailments of jetlag when we travel across time zones? Why is working night-shifts so detrimental to our health? In other words, why can't we readily choose and stick to non-24 h rhythms? Actually, our daily behavior and physiology do not simply result from the passive reaction of our organism to the external cycle of days and nights. Instead, an internal clock drives the variations in our bodily functions with a period close to 24 h, which is supposed to enhance fitness to regular and predictable changes of our natural environment. This so-called circadian clock relies on a molecular mechanism that generates rhythmicity in virtually all of our cells. However, the robustness of the circadian clock and its resilience to phase shifts emerge from the interaction between cell-autonomous oscillators within the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus. Thus, managing jetlag and other circadian disorders will undoubtedly require extensive knowledge of the functional organization of SCN cell networks. Here, we review the molecular and cellular principles of circadian timekeeping, and their integration in the multi-cellular complexity of the SCN. We propose that new, *in vivo* imaging techniques now enable to address these questions directly in freely moving animals.

Keywords: circadian rhythms; neuronal networks; *in vivo* imaging; jetlag

1. Introduction

Circadian clocks are exquisitely adapted to the natural cycle of days and nights. As the result of 2.5 billion years of evolution [1], they afford an adaptive advantage to living organisms in response to the daily variations of their natural environment [2,3]. Ironically, as human beings, our internal clock has turned into a disadvantage in our modern 24/7 western society. Despite the invention of artificial light and jet planes that bridge the opposite sides of the planet within a few hours, we are not readily able to break free from the natural 24 h day, imposed by the rotation of our planet since the origin. As a consequence, people travelling across time zones suffer from jetlag, and night-shift workers are threatened by critical health problems, such as mood disorders, obesity, and metabolic syndrome, increased risk of heart failure, and cancer [4–8]. Thus, one may now wonder whether loosening our clock would enable us to better cope with our societal constraints [9].

In mammals, the central circadian pacemaker is located in the suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus [10,11], in which its precision and robustness emerge from the circuit-level organization of cell-autonomous circadian oscillators [12–15]. As such, understanding the multi-cellular makeup of the SCN constitutes an imperative challenge on the way to fight jetlag and circadian disorders. Here, we review the basic principles that govern circadian rhythmicity at the cellular level, how clock cells form a complex assembly within the SCN, and their functional interactions. Finally, we propose further perspectives into how new techniques in imaging will enable to address the circuit-level organization of the SCN *in vivo*.

2. General Principles of Cell-Autonomous Circadian Timekeeping

The long quest to identify genetic determinants and to decipher the molecular mechanisms of circadian timekeeping, as recognized by the Nobel Committee for Physiology or Medicine, has been reviewed extensively elsewhere [16,17]. It is very remarkable that the whole clock machinery ticks at the single-cell level, as it mostly relies on intracellular mechanisms, such as the complex interplay between positive and negative regulators within transcription–translation feedback loops (TTFL). In mammals, the positive and negative arms of the molecular core clock are the transcription factors circadian locomotor output cycles protein kaput (CLOCK) and brain and muscle ARNT-like1 (BMAL1), and the proteins period (PER) and cryptochrome (CRY), respectively. The CLOCK–BMAL1 heterodimer binds to enhancer box (E-box) regulatory sequences to promote the expression of PER and CRY, which assemble into protein complexes. The PER–CRY complexes are hyper-phosphorylated by casein kinases, and translocate into the cell nucleus where they accumulate and finally repress their own expression. The degradation of PER–CRY complexes and the repression of their production eventually enables the whole process to reinitiate, nearly 24 h after the first cycle started. An accessory interlocked loop, involving nuclear receptors of the REV–ERB family, stabilizes the cycle. Although non-TTFL mechanisms have also been described [18–20], these molecular loops compose the major self-sustained circadian drive in mammalian nucleated cells, even when they are isolated from the rest of the organism [21,22].

This molecular clock drives circadian rhythms in gene expression, cell metabolism, and physiology, in virtually all our cells. In addition to their essential participation within the clockwork itself, the transcription factors CLOCK–BMAL1 and REV–ERBs pace the circadian transcription of many target genes through binding to their respective recognition sequences. These so-called first-order clock-controlled genes (CCGs) encode other transcription factors that, in turn, control the circadian expression of second- and third-order CCGs [16,23]. Beyond this transcriptional cascade, it has become evident that post-transcriptional mechanisms also control the circadian abundance of mRNA in the cell nucleus [24,25]. Moreover, different organs exhibit remarkably different circadian transcriptomes, as promoted by tissue-specific interactions of BMAL1 with non-circadian transcription factors [26]. Thus, while 5–15% of the mRNA expressed in a given organ follow a circadian rhythm of accumulation [27,28], more than 80% of the protein-coding genes appear to be expressed in a circadian manner somewhere in the body [29]. This suggests that most, if not all, of our genes are potential circadian clock targets, directly or indirectly.

More importantly, changes in the environment are able to alter the circadian clockwork in mammalian cells. Besides the E-box sequences involved in the circadian TTFL, Period genes also contain other regulatory sequences in their promoter that modulate their expression through several signaling pathways. For example, an increase in cytosolic calcium or cAMP (cyclic adenosine monophosphate) concentration [30,31], the activation of the nuclear glucocorticoid receptor [32–35], or a physiological increase in temperature [36–38] mediate the fast induction of the *Per* genes through conserved cyclic AMP response elements (CRE), glucocorticoid response elements (GRE), or heat shock elements (HSE), respectively. Moreover, temperature cycles also regulate the amplitude of circadian gene expression by post-transcriptional mechanisms [39]. Therefore, a wide array of environmental cues can modulate and rapidly reset the circadian cell rhythmicity.

3. Cell-Autonomous Circadian Timekeeping in SCN Neurons

Unsurprisingly, individual SCN neurons express the circadian molecular clockwork, as most of our cells do. As in other organs, circadian gene expression in the SCN encompasses various cellular functions, from cell metabolism to protein biosynthesis and degradation [29,40]. Interestingly, several secreted factors, such as arginine vasopressin (AVP) [41], vasoactive intestinal polypeptide (VIP) [42], or prokineticin 2 [43], and molecular players involved in vesicular secretion are under circadian regulation in the SCN, either at the transcriptomic or proteomic level [40,44]. Hence, both the secreting machinery and the vesicular cargo supposed to convey circadian timing to other brain regions are

under clock control in SCN neurons, which supports the key role of the SCN as the central circadian pacemaker that coordinates all of the body rhythms [45].

Furthermore, SCN cell metabolism and physiology also exhibit circadian modulation. Individual SCN neurons display spontaneous circadian rhythms in membrane excitability, which underlie the circadian variations in action potential discharge rates [46]. Classically, the depolarized and hyperpolarized membrane states correspond to periods of high- and low-firing rates [47,48], respectively, but a number of SCN neurons sustain an uncommon depolarized state, responsible for the daily silencing of their spike activity [49]. The mechanisms and identity of the ionic conductances responsible for these circadian rhythms in neuronal activity have been extensively reviewed previously [48,50]. The circadian modulation of electrophysiological activity is cell-autonomous and depends on the integrity of the molecular clockwork, as shown by the altered rhythmicity of SCN neurons with genetically impaired or down-regulated clock gene expression [47,51–53]. An elegant bicycle model has been proposed, which accounts for the circadian variation in the membrane potential of SCN neurons. This mechanism, conserved between flies and mice, involves the antiphase regulation of a depolarizing sodium current and a hyperpolarizing potassium conductance [54]. Hence, the molecular clockwork coordinates rhythmic cell functions and processes at many different levels to ensure overt circadian outputs from master clock SCN neurons.

However, despite the unicity in the basic principles underlying circadian rhythmicity, single-cell activity patterns generated from SCN neurons are remarkably variable. Depending on culture conditions, 20–80% of individual SCN neurons exhibit circadian variations in electrophysiological firing [12,13,46,55], and some neurons can switch back and forth between the rhythmic and arrhythmic states [55]. Among rhythmic neurons, the measured circadian periods display great diversity, with differences of more than 2.5 h in cell pairs, even in the same culture [12,13,52]. Furthermore, the circadian period appears highly versatile from one cycle to the other in a same neuron [12]. This variability in single-neuron circadian rhythms indicates that the cell-autonomous rhythmicity in the SCN is rather unstable and unreliable. Thus, other mechanisms should be at work to confer robustness and precision to the central circadian pacemaker. Deciphering such mechanisms, beyond the molecular makeup of circadian cell oscillators, has become a new challenge, in order to understand how we could reconcile our clock with our modern society rhythms.

4. The Origin of Circadian Precision and Robustness within The SCN

Specifically, the properties that turn a community of individual cell oscillators into a coherent and reliable circadian pacemaker originate from the SCN itself [56,57]. The comparison of individual SCN neuron electrical rhythmicity in dispersed cell cultures and within SCN slices revealed that circadian precision increases significantly when the native tissue context is preserved. Both the cycle-to-cycle variability in single neurons, and the large differences in circadian periods between neurons appeared reduced in slices, giving rise to homogenous circadian firing of action potentials at the tissue level [12,13]. It is worth noting that the pharmacological silencing of SCN neuronal firing with the voltage-dependent sodium channel blocker, tetrodotoxin [15], or the chronic inhibition of exocytosis by Botox A [44], both profoundly disorganized the cellular circadian rhythmicity in SCN slices. Hence, intercellular coupling through the action potential-dependent release of signaling molecules contained in exocytosis vesicles contributes to the precision of individual circadian cell oscillators and to their coherence in the SCN.

Furthermore, the tissue-level organization confers a unique resilience to circadian alterations in the SCN, which does not occur at the single cell level, nor in any other organ (see Figure 1). As such, intercellular communications in the SCN are key for the robustness of the central circadian pacemaker. Indeed, cell–cell interactions in the SCN compensate for cell-autonomous clock phenotypes, due to the loss of function of circadian clock genes such as *Cry1* or *Per1*. For example, loose and low-amplitude circadian rhythms in clock gene expression observed in dispersed cell cultures (either fibroblasts or SCN neurons) from *Cry1*^{-/-} mutant mice appear to be fully stabilized and synchronized in SCN

slices [14]. Even more surprisingly, quasi-circadian oscillations can also emerge from the SCN network itself, when the cell-autonomous clockwork is abolished by the genetic invalidation of the critical clock gene *Bmal1* [58]. Thus, the cell-autonomous circadian oscillators assemble within the specific network architecture of the SCN that sustains and amplifies rhythmicity.

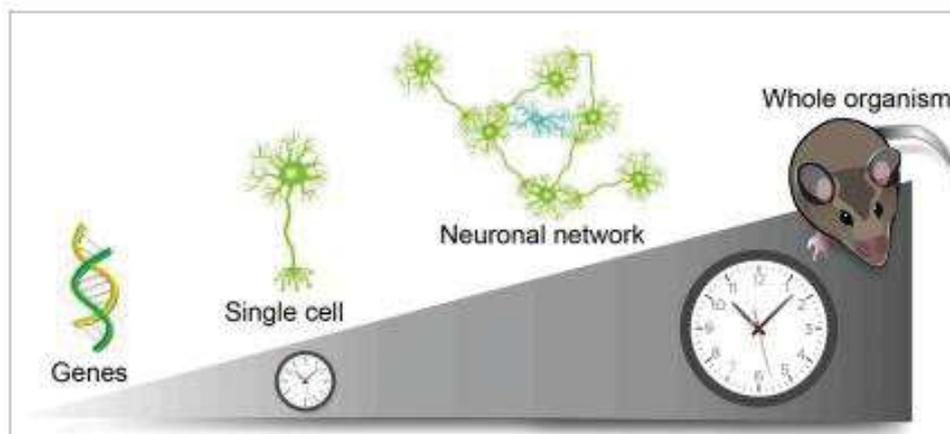


Figure 1. The robustness of circadian rhythms observed at the organism level emerges from cell networks in the suprachiasmatic nuclei (SCN). A genetically encoded clock drives self-sustained circadian rhythmicity in individual cells. Intercellular coupling in the SCN coordinates cell-autonomous rhythms into a coherent and resilient circadian pacemaker that tunes all the body rhythms. Green and blue cells depict SCN neurons and astrocytes, respectively.

Importantly, a primary cause for jetlag and other troubles associated with circadian misalignment resides in this functional cell–cell organization of the SCN, as mice with altered SCN cell synchrony exhibit faster entrainment than control animals to a new lighting schedule. The signaling pathways associated with VIP or AVP, two major neuropeptides produced and secreted by SCN neurons, appear to mediate circadian inertia through SCN cell synchrony, as revealed by the phenotype of mice with null mutations of genes encoding VIP or its receptor VIPR2 [59,60], or the AVP receptors V1a and V1b [61]. While the phenotype of *Vip*^{−/−} and *Vipr2*^{−/−} mice may be confounded with a masking effect of light, rather than true circadian entrainment because of their lack of a functional circadian clock, *V1a*^{−/−} *V1b*^{−/−} mice unambiguously display an active circadian clock and adjust immediately to abrupt phase advances and delays. In addition, the same resistance to jetlag occurred in response to the pharmacological blockade of AVP signaling in the SCN [61]. Hence, jetlag originates, at least partly, from the SCN, and depends on its cell network organization.

Further support for this specific property of the SCN cell network comes from its resilience to circadian entrainment by temperature. While physiological increases in temperature induce the heat-shock pathway and reset circadian rhythms in pharmacologically-disconnected SCN neurons, as in any other cell type or organ [37,62], temperature cycles appear unable to entrain clock gene expression in cultured SCN slices with preserved cell communications [63,64]. More specifically, this unique resistance of the SCN to temperature requires coupling between its dorsal and ventral parts [64], and it is not observed in SCN slices from neonate animals [65]. Altogether, these data indicate that the specific organization of cell communications in the mature SCN network is responsible for the robustness of the circadian pacemaker and its unique resilience to external perturbations.

5. Complexity of Circadian Entrainment in The Integrated SCN

The interaction between circadian rhythmicity in the SCN and temperature, however, appears to be more complex. Intriguingly, heat pulses are able to phase shift the circadian rhythm in SCN neuronal firing of action potentials, even when applied to slices from adult animals [66]. At first

glance, this observation may seem to be in contradiction with the well-known resilience of the SCN clockwork to temperature, as described above [63,64]. Yet, this apparent divergence [67] may, rather, underscore differences between the various SCN rhythms in their immediate sensitivity to temperature, with circadian clock gene expression being resilient to temperature fluctuations and the global rhythm in electrophysiological firing rate exhibiting phase entrainment in response to heat.

Recently, we investigated this hypothesis with a mathematical model, assuming a dual regulation of the rhythmic electrical output of the SCN, by the molecular clockwork on one hand, and by the circadian variations in body temperature, on the other hand [68]. We considered the resilience of clock gene expression to temperature [63,64] by applying the effect of temperature downstream of the clock (see Figure 2), as a modulation of the functional link between electrical firing and clock genes [47,51,52]. This very simple relationship permitted us to visualize that temperature cycles may, indeed, entrain the electrophysiological activity rhythm in the SCN without altering the phase of clock gene expression, although we made no assumption regarding the mechanisms actually involved in this differential regulation [68].

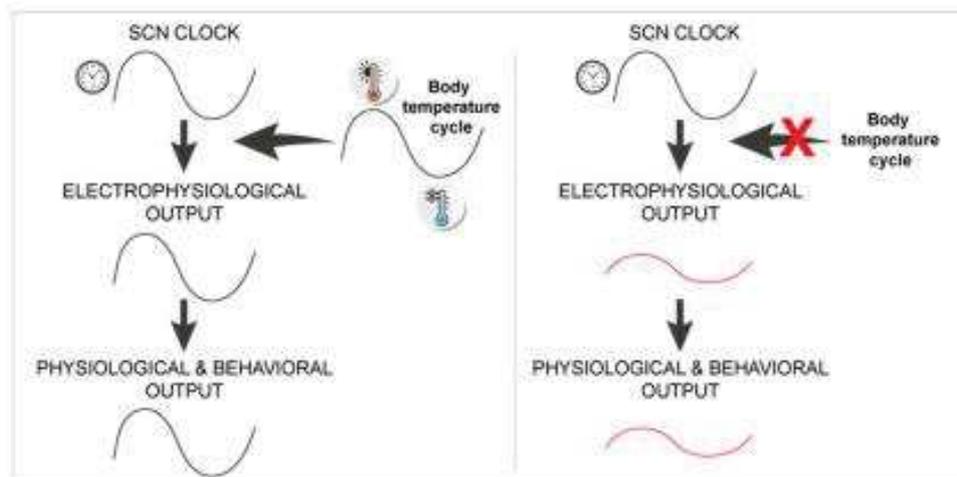


Figure 2. Temperature as a possible capacitor of circadian rhythms. Body temperature cycles may modulate SCN physiology downstream of circadian clock genes, and enable full-amplitude output rhythms *in vivo* (left panel) that may possibly be reduced in *Hsf1*^{-/-} mice with an altered heat shock response pathway, but a normal SCN molecular clockwork (right panel).

The heat shock pathway might be a likely candidate to mediate the effect of temperature on the circadian rhythm in SCN firing of action potentials. Indeed, suppressing the action of temperature in our model of the SCN predicted circadian outputs with smaller amplitudes but a longer free-running period [68], as was observed experimentally in *Hsf1*^{-/-} mice [69,70]. In line with this hypothesis, the invalidation of the heat shock response also reduces circadian rhythmicity in flies, without altering clock gene expression [71], and a recent study demonstrated that the concerted activity of the circadian clock and heat shock pathways modulates the expression of downstream products in *Drosophila* clock neurons [72]. More generally, the action of body temperature cycles, or any other rhythmic systemic cue, at the SCN level downstream of clock genes may account for the circadian alterations reported under various physio-pathological conditions. For example, the low amplitude in daily body temperature rhythms, as measured in animals eating a cafeteria diet [73] or in lactating female mice [68], is likely responsible for their reduced rhythmic activity of the heat shock pathway in the SCN and, ultimately, for the dampened rhythms in their electrical firing or locomotor activity, despite normal central clock gene expression. This may also account for the reduced circadian output in the ageing SCN [74]. Likewise, it is tempting to speculate that similar mechanisms may also contribute to the chronobiotic

effect of melatonin, since melatonin resets the SCN electrical rhythm [75] faster than the expression of most circadian clock genes [76,77].

Furthermore, our hypothesis that temperature cycles modulate circadian SCN output also provides new insight into how jetlag emerges within the SCN. Several studies have previously reported observations that the circadian phase of clock gene expression at the global SCN level may adjust, almost immediately, to a new lighting schedule, while the behavioral rhythm or the circadian rhythm in aggregate SCN electrophysiological activity would show more inertia [78–80]. A jetlag simulation in our model accurately recapitulated this dissociation between the SCN clock and output rhythms [68]. This observation supports further the postulate that temperature differentially regulates SCN rhythms, and is in line with the long-standing idea that the circadian pacemaker may reset faster than the locomotor activity rhythm [78,81]. For the sake of simplicity in our model, we considered gene expression and electrophysiological firing as global rhythms in a theoretically homogenous SCN [68]. Future work will address the respective role of separate cell types or of compartments of the SCN in these interactions between external and internal cycles that shape circadian rhythmicity.

Indeed, spatially resolved investigations revealed that SCN sub-regions reset differentially after an abrupt light phase shift. Clock gene expression entrains almost immediately in the retinorecipient ventral SCN, while the dorsomedial part requires several days to resynchronize (see Figure 3) [82–84]. This internal dissociation between SCN regions appears even more complex at the level of electrophysiological activity. Rapidly after phase shift, both the ventral and dorsal parts exhibit a bimodal firing pattern, with an unshifted component and a shifted component that progressively merge into one single shifted peak of activity [85]. Yet these shifted and unshifted components appear solely in the ventral and dorsal SCN, respectively, after application of the gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor antagonist bicuculline or a physical cut between both regions [85]. This indicates that the ventral part resets faster than the dorsal part, but that each part tends to impose its rhythm through reciprocal GABAergic communications. Altogether, these data reveal the complexity of circadian phase resetting, and emphasize the SCN origin of jetlag (Figure 3).

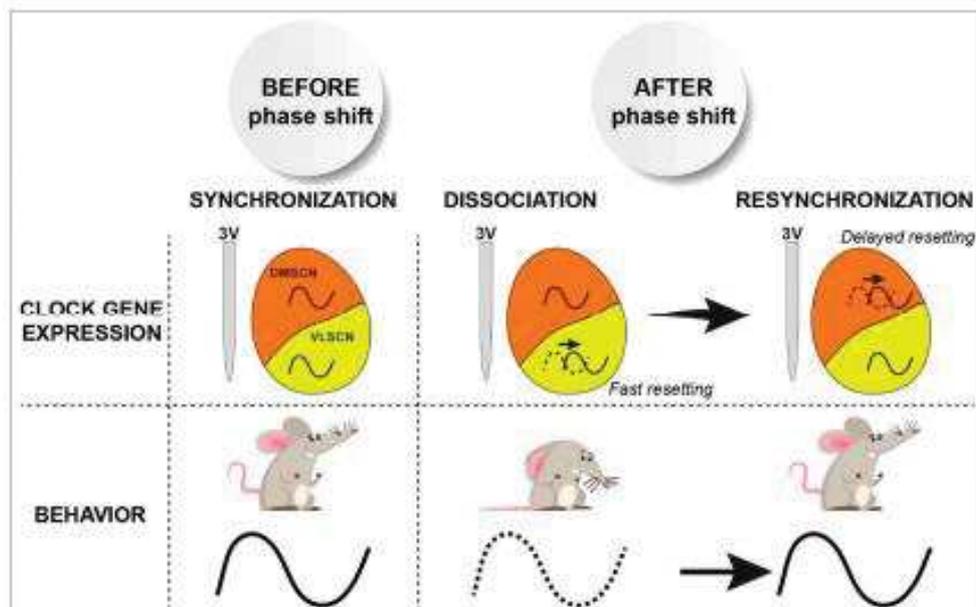


Figure 3. Phase dissociation in the SCN and jetlag. An abrupt light phase shift induces fast resetting of circadian clock gene expression in the ventrolateral part of the SCN (VLSCN) while the dorsomedial part (DMSCN) adjusts progressively to the new lighting schedule, as does locomotor behavior. This transition period before full re-synchronization of the entire SCN corresponds to jetlag (adapted from [83]).

6. Topological and Functional Complexity of The SCN

The complex and heterogeneous structure of the SCN is characterized by a histological diversity that underlies functional specificity. While all SCN neurons rely on GABAergic neurotransmission, they also synthesize and release a number of peptides involved in cell communications within the SCN and with other brain areas [86,87]. The discrete production of these various neuropeptides defines topological sub-divisions of the SCN, such as the major sub-division into core and shell, as chiefly delineated by the presence of neurons producing VIP and AVP in the ventral and dorsal parts of the SCN, respectively [86,88]. The production of many other neuropeptides, by AVP and VIP neurons or by other SCN neurons, provides a refined view of the cytoarchitectural organization of the SCN [86], and high-dimensional gene expression analysis promises to map the SCN cell diversity at a single-cell resolution [89–91].

The discovery of new molecular markers of neuronal diversity in the SCN enables to interrogate the functional relevance of SCN cell types in circadian timekeeping. Importantly, combinatorial genetic experiments revealed that the pacemaker property of the SCN might not rely upon a single neuronal cell type. A recent study provided evidence that SCN neurons expressing the peptide neuromedin S (NMS) may act as possible circadian pacemakers [92]. Indeed, abolishing their molecular clockwork or expressing a long-period circadian mutation specifically in these neurons, respectively, disrupted or lengthened the free-running period of the circadian rhythm in locomotor behavior [92]. NMS-producing neurons encompass a large majority of the AVP and VIP neurons, as well as other neuronal cell types, with the remarkable exclusion of neurons containing the gastrin-releasing peptide. However, neither AVP nor VIP neurons seem capable of imposing their own period onto the body rhythms [92,93]. Thus, the circadian phenotype communicated by NMS neurons to the rest of the organism may either be due to AVP-negative and VIP-negative neurons expressing NMS, or result from a non-specific mass effect; simply because NMS neurons represent a large proportion (40%) of SCN neurons. Two different studies, conducted with other mouse models, support this latter hypothesis. Firstly, the use of chimeric mice randomly expressing an untargeted circadian mutation revealed that the period of their behavioral rhythm directly depends on the proportion of SCN neurons, with a long or short circadian period [94]. Secondly, the specific targeting of circadian mutations to another subset of SCN neurons, which express the dopamine receptor DRD1A, produced mice with an unstable free-running period that revealed the competition between DRD1A-positive and DRD1A-negative neurons in setting the ensemble period [95]. In other words, each set of SCN neurons could alternatively impose its own period. Hence, the pacemaker activity of the SCN emerges from different neuronal populations interacting in a plastic cell network.

In addition, the multi-cellular functioning of the SCN further increases if one considers that the circadian pacemaker may not rely solely upon purely neuronal processes. Like neurons, astrocytes contain the cell-autonomous molecular clockwork [96]. Remarkably, these glial cells regulate daily behaviors by controlling circadian timekeeping in the SCN. Pioneering work suggested that the timely coverage of dendrites by astrocytes may contribute to the daily synaptic plasticity in the SCN [97], and more recent studies showed that the targeted inactivation of the molecular clock in SCN astrocytes lengthened the circadian period, *ex vivo* and *in vivo* [98,99]. Moreover, SCN astrocytes exhibited circadian variations in cytosolic calcium concentration in antiphase with neurons and contributed to the nocturnal silencing of neuronal activity by regulating extracellular glutamate levels [100]. This mechanism enables astrocytes to communicate their own tempo to the SCN, and to play the role of circadian pacemaker in absence of other clock cells [101]. Altogether, these data indicate that glial transmission interacts with neuronal signaling to regulate circadian activity in the SCN. Whether several astrocyte sub-types exist and regulate different neuronal cell types to generate specific neuron-glia networks in the SCN remains unknown.

Importantly, because voluntary locomotor rhythmicity is commonly the single measured circadian output, one may tend to generalize behavioral observations and assume that one specific SCN cell type must regulate all circadian rhythms. Yet, although the SCN coordinate all bodily rhythms,

they may contain distinct circadian pacemakers dedicated to specific functions. As soon as the study of human chronobiology emerged, it was observed that physiological and locomotor rhythms free-ran with different periods in the same subject [102]. In rodents, the exposition to short (22 h) light/dark cycles [103], or the selective lesion of SCN fibers projecting to the subparaventricular zone (SPZ) of the hypothalamus [104], or the suppression of GABA signaling in the SPZ led to a dissociation between internal body temperature and behavioral rhythms. Therefore, sets of cells projecting towards a given brain area and involved in pacing a same biological rhythm may define functional units of the SCN. As SCN cells with different neurochemical phenotypes or locations happen to project efferent fibers to a same target brain area [87,105], these functional units could significantly differ from the currently proposed sub-divisions.

An interesting example of functional topology in the SCN resides in the regulation of growth hormone (GH) secretion. GH production by somatotroph cells in the anterior pituitary gland, and its release into the blood circulation, are under the dual control by somatostatin (SMS) and GH-releasing hormone (GHRH), from hypophysiotrophic endocrine neurons in the hypothalamus. The alternate release in the median eminence of these two inhibiting and stimulating neurohormones, respectively, results in a characteristic and highly pulsatile ultradian pattern in blood GH concentration, which appears disrupted in circadian clock mutant mice [106]. It is worth noting that the SCN regulates both SMS and GHRH productions. A pool of SCN neurons mediates photic information to SMS-producing neurons in the periventricular nucleus of the hypothalamus [107]. This connection is responsible for the daily inhibition of GH secretion at the onset of light, and for the ensuing synchronization of ultradian GH pulses with the light-dark cycle [107,108]. In addition, a subset of VIP-containing SCN neurons, which specifically express the neuropeptide Y/pancreatic polypeptide receptor Npyr6, regulate GHRH production and contribute to body growth and metabolism [109]. Importantly, the SCN balance upon SMS and GHRH neurons may be impaired during circadian perturbations, as suggested by the abolition of pulsatile GH secretion in a rat model of night-shift work [110]. Although further experiments will be necessary to decipher the functional links between both pathways, the concerted action of different SCN neurons results, here, in temporally-organized functional activity at the organism level.

7. Exploring The SCN Cell Network Organization

How multiple cell-autonomous oscillators interact in a coherent circadian pacemaker remains largely unknown. Stable, real-time imaging of clock gene expression, membrane voltage, or cytosolic calcium concentration within slices, has already revealed important features of the spatio-temporal organization of circadian rhythms throughout the SCN (as reviewed in [57]). Remarkably, a complex interaction between synaptic communication, mostly involving GABA [85,111,112], and paracrine regulation by diffusive factors [113] results in local synchronization and long-distance network coordination of cell rhythms, which, thus, gives rises to travelling waves from one side of the SCN to another [114–117]. The robustness of the circadian pacemaker undoubtedly stems from this tissue-level organization. Finding proper tools to cure jetlag thus requires deciphering not only the precise synaptic wiring between neurons, but also the mechanisms underlying the ordered, remote volume transmission involving multiple SCN cell types. As the expression of transmitters and their receptors marks the largest difference between SCN sub-divisions [90], spatially resolved genome-wide transcriptional profiling [118] may now make it possible to map all the cells able to communicate with one another. Such molecular maps would be ideal tools to direct the functional assessment of each emitter/receptor cell pair.

Importantly, the presence of highly connected “hub” cells unveils privileged nodes of the SCN network. The application of tetrodotoxin desynchronizes unitary cell rhythms within SCN slices [15], and the monitoring of their resynchronization after washing provided an elegant way to infer the topology of the network [119,120]. Remarkably, this analysis revealed different kinetics of stabilization across the slice [120], and the characteristics of a small-world organization, with densely connected

cells in the core SCN surrounded by sparsely connected shell regions [119]. Further characterization of these hub cells would enable to assess their particular role in the SCN. For example, the identification of specific molecular markers would, then, make it possible to probe whether these cells constitute a separate cell type, and whether they are critical for the coordination of clock cells and the robustness of the SCN pacemaker. However, although other work supports the small-world topology [121], this organization has been observed in organotypic slice cultures, obtained from immature SCN. It still remains to ensure that it also holds true in the mature hypothalamus. Moreover, SCN slices and explants represent genuine paradigms to probe cell networks *ex vivo*, but these approaches may also damage important connections that would be important for capturing the complete picture of what eventually happens in the intact SCN, such as *in vivo*.

Conversely, monitoring SCN rhythms *in vivo*, at a cellular resolution, has long proved challenging. Extracellular recording of neuronal firing [122–124] and photometric measurements of bioluminescent or fluorescent reporters [125,126] provide a global view of SCN rhythms at the cell population level, in both anesthetized and freely-moving animals. Although these approaches hardly permit to infer single cell activity, the combination of *in vivo* photometry with specific targeting of genetically-encoded indicators enables to probe, in real time, the activity of different cell types in the SCN of adult animals. A recent study demonstrated that this technique permits stable recordings of clock gene expression in the mouse SCN over several months, and unambiguously confirmed that the molecular clock in VIP-producing neurons resets at least twice faster than the running-wheel behavior after a light phase shift [127].

Similarly, *in vivo* monitoring of calcium activity with the fluorescent probe GCaMP6s, specifically targeted to VIP-producing neurons, enabled an assessment of the responsiveness to light of the retino-recipient cells in the SCN [128]. It is worth noting that not only did integrated calcium levels exhibit slow variations at the circadian timescale, but also had higher average concentrations measured during the light phase, as one would have expected [129]; but fast events of increased fluorescence for a few seconds also emerged from the global signal during the day [128]. These rapid variations at the cell-population level were very likely the fingerprint of the coordinated calcium activity among a large number of VIP neurons in the SCN, which suggests the dynamic coupling and uncoupling of SCN cells during the course of the day/night cycle. Moreover, the persistence of such signals under constant darkness conditions indicates that the plasticity of this SCN cell network is under the control of circadian clocks.

Strikingly, the investigation of the SCN network dynamics at a cell resolution *in vivo* has now become possible, thanks to the extreme miniaturization of fluorescence microscopy devices. Recently, a fluorescence microscope, weighing not more than 2 g, has been developed [130,131]. Once cemented onto the skull of small rodents, such as mice, this mini-scope permits to monitor cell activity in superficial brain areas, and gradient-index (GRIN) lenses can establish an optical path toward deeper brain regions, such as the hypothalamus [132–134]. Implementing these tools to record SCN activity will offer the unique combination of cell-resolution imaging in slices with the preserved integrity of mature cell networks *in vivo*. This approach recently permitted an unveiling of how cell modules underlie a social behavior [135]. It will, undoubtedly, soon help to reveal the secrets of the functional organization of SCN cell networks and their plasticity. More specifically, *in vivo* calcium imaging will permit to simultaneously interrogate fast cell events, typical of synaptic and paracrine signaling within the SCN network, and the slow variations associated with circadian regulation. This novel knowledge about how the SCN integrates these short and long timescales, respectively, under normal and perturbed conditions, will be key for a better understanding of jetlag and other circadian disorders.

8. Conclusions

More than three centuries after the French astronomer Dortous de Mairan reported the first evidence of an endogenous circadian rhythm, chronobiologists have disentangled the molecular cog-wheels of the biological clock. This great achievement, however prodigious, is only a first step

toward a full comprehension of the mechanisms of circadian timekeeping. It is now time to understand how cell-autonomous oscillators team up into a robust circadian pacemaker [56,57]. What are the functional modules that confer the features of resilience and robustness to an ensemble of clock cells that individually lack these properties [64]? Circadian drosophilists opened the path and investigated the functional topology of cell networks which organize circadian timekeeping and photic entrainment in whole-brain preparations or living flies [136–139]. The translation of these approaches to mouse models will reveal the circuit architecture of the mammalian SCN and its contribution to jetlag.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, X.B.; writing—review and editing, L.E.C.H., P.M., and X.B.; funding acquisition, P.M.

Funding: Funded by Agence Nationale de la Recherche, grant number ANR-15-CE14-0012 and ANR-18-CE14-0017-01, to P.M.

Acknowledgments: The authors are grateful to Muriel Asari for her expert assistance with the preparation of illustrations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

SCN	Suprachiasmatic nuclei
TTFL	Transcription-translation feedback loops
CCG	Clock-controlled gene
VIP	Vasoactive intestinal polypeptide
AVP	Arginine Vasopressin
GABA	Gamma-aminobutyric acid
SPZ	Subparaventricular zone
GH	Growth hormone
SMS	Somatostatin
GHRH	GH-releasing hormone

References

- Edgar, R.S.; Green, E.W.; Zhao, Y.; van Ooijen, G.; Olmedo, M.; Qin, X.; Xu, Y.; Pan, M.; Valekunja, U.K.; Feeney, K.A.; et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* **2012**, *485*, 459–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Woelfle, M.A.; Ouyang, Y.; Phanvijhitsiri, K.; Johnson, C.H. The adaptive value of circadian clocks: An experimental assessment in cyanobacteria. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 1481–1486. [[CrossRef](#)]
- Yerushalmi, S.; Green, R.M. Evidence for the adaptive significance of circadian rhythms. *Ecol. Lett.* **2009**, *12*, 970–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cordina-Duverger, E.; Menegaux, F.; Popa, A.; Rabstein, S.; Harth, V.; Pesch, B.; Bruning, T.; Fritschi, L.; Glass, D.C.; Heyworth, J.S.; et al. Night shift work and breast cancer: A pooled analysis of population-based case-control studies with complete work history. *Eur. J. Epidemiol.* **2018**, *33*, 369–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Logan, R.W.; McClung, C.A. Rhythms of life: Circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nat. Rev. Neurosci.* **2019**, *20*, 49–65. [[PubMed](#)]
- Thosar, S.S.; Butler, M.P.; Shea, S.A. Role of the circadian system in cardiovascular disease. *J. Clin. Investig.* **2018**, *128*, 2157–2167. [[CrossRef](#)]
- Watanabe, K.; Sakuraya, A.; Kawakami, N.; Imamura, K.; Ando, E.; Asai, Y.; Eguchi, H.; Kobayashi, Y.; Nishida, N.; Arima, H.; et al. Work-related psychosocial factors and metabolic syndrome onset among workers: A systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* **2018**, *19*, 1557–1568. [[CrossRef](#)]
- Wefers, J.; van Moorsel, D.; Hansen, J.; Connell, N.J.; Havekes, B.; Hoeks, J.; van Marken Lichtenbelt, W.D.; Duez, H.; Phielix, E.; Kalsbeek, A.; et al. Circadian misalignment induces fatty acid metabolism gene profiles and compromises insulin sensitivity in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7789–7794. [[CrossRef](#)]
- Hastings, M.H. Physiology. A looser clock to cure jet lag. *Science* **2013**, *342*, 52–53. [[CrossRef](#)]

10. Moore, R.Y.; Eichler, V.B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* **1972**, *42*, 201–206. [[CrossRef](#)]
11. Stephan, F.K.; Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1972**, *69*, 1583–1586. [[CrossRef](#)]
12. Herzog, E.D.; Aton, S.J.; Numano, R.; Sakaki, Y.; Tei, H. Temporal precision in the mammalian circadian system: A reliable clock from less reliable neurons. *J. Biol. Rhythm.* **2004**, *19*, 35–46. [[CrossRef](#)]
13. Honma, S.; Nakamura, W.; Shirakawa, T.; Honma, K. Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci. Lett.* **2004**, *358*, 173–176. [[CrossRef](#)]
14. Liu, A.C.; Welsh, D.K.; Ko, C.H.; Tran, H.G.; Zhang, E.E.; Priest, A.A.; Buhr, E.D.; Singer, O.; Meeker, K.; Verma, I.M.; et al. Intercellular coupling confers robustness against mutations in the scn circadian clock network. *Cell* **2007**, *129*, 605–616. [[CrossRef](#)]
15. Yamaguchi, S.; Isejima, H.; Matsuo, T.; Okura, R.; Yagita, K.; Kobayashi, M.; Okamura, H. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **2003**, *302*, 1408–1412. [[CrossRef](#)]
16. Takahashi, J.S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 164–179. [[CrossRef](#)]
17. Young, M.W. Time travels: A 40-year journey from drosophila's clock mutants to human circadian disorders (nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2018**, *57*, 11532–11539. [[CrossRef](#)]
18. O'Neill, J.S.; Reddy, A.B. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* **2011**, *469*, 498–503. [[CrossRef](#)]
19. Reddy, A.B.; Rey, G. Metabolic and nontranscriptional circadian clocks: Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 165–189. [[CrossRef](#)]
20. Wong, D.C.; O'Neill, J.S. Non-transcriptional processes in circadian rhythm generation. *Curr. Opin. Physiol.* **2018**, *5*, 117–132. [[CrossRef](#)]
21. Nagoshi, E.; Saini, C.; Bauer, C.; Laroche, T.; Naef, F.; Schibler, U. Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **2004**, *119*, 693–705. [[CrossRef](#)]
22. Yagita, K.; Tamanini, F.; van Der Horst, G.T.; Okamura, H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* **2001**, *292*, 278–281. [[CrossRef](#)]
23. Rey, G.; Cesbron, F.; Rougemont, J.; Reinke, H.; Brunner, M.; Naef, F. Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of bmal1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1000595. [[CrossRef](#)]
24. Koike, N.; Yoo, S.H.; Huang, H.C.; Kumar, V.; Lee, C.; Kim, T.K.; Takahashi, J.S. Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science* **2012**, *338*, 349–354. [[CrossRef](#)]
25. Torres, M.; Becquet, D.; Blanchard, M.P.; Guillen, S.; Boyer, B.; Moreno, M.; Franc, J.L.; Francois-Bellan, A.M. Circadian rna expression elicited by 3'-utr iralu-paraspeckle associated elements. *Elife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
26. Beytebiere, J.R.; Trott, A.J.; Greenwell, B.J.; Osborne, C.A.; Vitet, H.; Spence, J.; Yoo, S.H.; Chen, Z.; Takahashi, J.S.; Ghaffari, N.; et al. Tissue-specific bmal1 cisomes reveal that rhythmic transcription is associated with rhythmic enhancer-enhancer interactions. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 294–309. [[CrossRef](#)]
27. Storch, K.F.; Lipan, O.; Leykin, I.; Viswanathan, N.; Davis, F.C.; Wong, W.H.; Weitz, C.J. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **2002**, *417*, 78–83. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, R.; Lahens, N.F.; Ballance, H.I.; Hughes, M.E.; Hogenesch, J.B. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 16219–16224. [[CrossRef](#)]
29. Mure, L.S.; Le, H.D.; Benegiamo, G.; Chang, M.W.; Rios, L.; Jillani, N.; Ngotho, M.; Kariuki, T.; Dkhissi-Benyahya, O.; Cooper, H.M.; et al. Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* **2018**, *359*. [[CrossRef](#)]
30. Travnickova-Bendova, Z.; Cermakian, N.; Reppert, S.M.; Sassone-Corsi, P. Bimodal regulation of mperiod promoters by creb-dependent signaling and clock/bmal1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7728–7733. [[CrossRef](#)]
31. Yagita, K.; Okamura, H. Forskolin induces circadian gene expression of rper1, rper2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 79–82. [[CrossRef](#)]
32. Cheon, S.; Park, N.; Cho, S.; Kim, K. Glucocorticoid-mediated period2 induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6161–6174. [[CrossRef](#)]

33. Le Minh, N.; Damiola, F.; Tronche, F.; Schutz, G.; Schibler, U. Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7128–7136. [[CrossRef](#)]
34. So, A.Y.; Bernal, T.U.; Pillsbury, M.L.; Yamamoto, K.R.; Feldman, B.J. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17582–17587. [[CrossRef](#)]
35. Yamamoto, T.; Nakahata, Y.; Tanaka, M.; Yoshida, M.; Soma, H.; Shinohara, K.; Yasuda, A.; Mamine, T.; Takumi, T. Acute physical stress elevates mouse period1 mRNA expression in mouse peripheral tissues via a glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 42036–42043. [[CrossRef](#)]
36. Kornmann, B.; Schaad, O.; Bujard, H.; Takahashi, J.S.; Schibler, U. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e34. [[CrossRef](#)]
37. Saini, C.; Morf, J.; Stratmann, M.; Gos, P.; Schibler, U. Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 567–580. [[CrossRef](#)]
38. Tamaru, T.; Hattori, M.; Honda, K.; Benjamin, I.; Ozawa, T.; Takamatsu, K. Synchronization of circadian per2 rhythms and hsf1-bmal1: Clock interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e24521. [[CrossRef](#)]
39. Morf, J.; Rey, G.; Schneider, K.; Stratmann, M.; Fujita, J.; Naef, F.; Schibler, U. Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science* **2012**, *338*, 379–383. [[CrossRef](#)]
40. Panda, S.; Antoch, M.P.; Miller, B.H.; Su, A.I.; Schook, A.B.; Straume, M.; Schultz, P.G.; Kay, S.A.; Takahashi, J.S.; Hogenesch, J.B. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **2002**, *109*, 307–320. [[CrossRef](#)]
41. Jin, X.; Shearman, L.P.; Weaver, D.R.; Zylka, M.J.; de Vries, G.J.; Reppert, S.M. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* **1999**, *96*, 57–68. [[CrossRef](#)]
42. Hurst, W.J.; Mitchell, J.W.; Gillette, M.U. Synchronization and phase-resetting by glutamate of an immortalized scn cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *298*, 133–143. [[CrossRef](#)]
43. 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. Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* **2002**, *417*, 405–410. [[CrossRef](#)]
44. Deery, M.J.; Maywood, E.S.; Chesham, J.E.; Sladek, M.; Karp, N.A.; Green, E.W.; Charles, P.D.; Reddy, A.B.; Kyriacou, C.P.; Lilley, K.S.; et al. Proteomic analysis reveals the role of synaptic vesicle cycling in sustaining the suprachiasmatic circadian clock. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 2031–2036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yoo, S.H.; Yamazaki, S.; Lowrey, P.L.; Shimomura, K.; Ko, C.H.; Buhr, E.D.; Slepka, S.M.; Hong, H.K.; Oh, W.J.; Yoo, O.J.; et al. Period2::Luciferase real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 5339–5346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Welsh, D.K.; Logothetis, D.E.; Meister, M.; Reppert, S.M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **1995**, *14*, 697–706. [[CrossRef](#)]
47. Albus, H.; Bonnefont, X.; Chaves, I.; Yasui, A.; Doczy, J.; van der Horst, G.T.; Meijer, J.H. Cryptochrome-deficient mice lack circadian electrical activity in the suprachiasmatic nuclei. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1130–1133. [[CrossRef](#)]
48. Colwell, C.S. Linking neural activity and molecular oscillations in the scn. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 553–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Belle, M.D.; Diekman, C.O.; Forger, D.B.; Piggins, H.D. Daily electrical silencing in the mammalian circadian clock. *Science* **2009**, *326*, 281–284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Belle, M.D.C.; Diekman, C.O. Neuronal oscillations on an ultra-slow timescale: Daily rhythms in electrical activity and gene expression in the mammalian master circadian clockwork. *Eur. J. Neurosci.* **2018**, *48*, 2696–2717.
51. Kudo, T.; Block, G.D.; Colwell, C.S. The circadian clock gene period1 connects the molecular clock to neural activity in the suprachiasmatic nucleus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2015**, *1356*, 7. [[CrossRef](#)]
52. Liu, C.; Weaver, D.R.; Strogatz, S.H.; Reppert, S.M. Cellular construction of a circadian clock: Period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* **1997**, *91*, 855–860. [[CrossRef](#)]
53. Nakamura, W.; Honma, S.; Shirakawa, T.; Honma, K. Clock mutation lengthens the circadian period without damping rhythms in individual scn neurons. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 399–400. [[CrossRef](#)]

54. Flourakis, M.; Kula-Eversole, E.; Hutchison, A.L.; Han, T.H.; Aranda, K.; Moose, D.L.; White, K.P.; Dinner, A.R.; Lear, B.C.; Ren, D.; et al. A conserved bicycle model for circadian clock control of membrane excitability. *Cell* **2015**, *162*, 836–848. [[CrossRef](#)]
55. Webb, A.B.; Angelo, N.; Huettner, J.E.; Herzog, E.D. Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16493–16498. [[CrossRef](#)]
56. Michel, S.; Meijer, J.H. From clock to functional pacemaker. *Eur. J. Neurosci.* **2019**. [[CrossRef](#)]
57. Hastings, M.H.; Maywood, E.S.; Brancaccio, M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Rev. Neurosci.* **2018**, *19*, 453–469. [[CrossRef](#)]
58. Ko, C.H.; Yamada, Y.R.; Welsh, D.K.; Buhr, E.D.; Liu, A.C.; Zhang, E.E.; Ralph, M.R.; Kay, S.A.; Forger, D.B.; Takahashi, J.S. Emergence of noise-induced oscillations in the central circadian pacemaker. *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000513. [[CrossRef](#)]
59. Colwell, C.S.; Michel, S.; Itri, J.; Rodriguez, W.; Tam, J.; Lelievre, V.; Hu, Z.; Liu, X.; Waschek, J.A. Disrupted circadian rhythms in vip- and phi-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2003**, *285*, R939–R949. [[CrossRef](#)]
60. Harmar, A.J.; Marston, H.M.; Shen, S.; Spratt, C.; West, K.M.; Sheward, W.J.; Morrison, C.F.; Dorin, J.R.; Piggins, H.D.; Reubi, J.C.; et al. The vpac(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell* **2002**, *109*, 497–508. [[CrossRef](#)]
61. Yamaguchi, Y.; Suzuki, T.; Mizoro, Y.; Kori, H.; Okada, K.; Chen, Y.; Fustin, J.M.; Yamazaki, F.; Mizuguchi, N.; Zhang, J.; et al. Mice genetically deficient in vasopressin v1a and v1b receptors are resistant to jet lag. *Science* **2013**, *342*, 85–90. [[CrossRef](#)]
62. Brown, S.A.; Zumburn, G.; Fleury-Olela, F.; Preitner, N.; Schibler, U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1574–1583. [[CrossRef](#)]
63. Abraham, U.; Granada, A.E.; Westermark, P.O.; Heine, M.; Kramer, A.; Herzog, H. Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Mol. Syst. Biol.* **2010**, *6*, 438. [[CrossRef](#)]
64. Buhr, E.D.; Yoo, S.H.; Takahashi, J.S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* **2010**, *330*, 379–385. [[CrossRef](#)]
65. Herzog, E.D.; Huckfeldt, R.M. Circadian entrainment to temperature, but not light, in the isolated suprachiasmatic nucleus. *J. Neurophysiol.* **2003**, *90*, 763–770. [[CrossRef](#)]
66. Ruby, N.F.; Burns, D.E.; Heller, H.C. Circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus are temperature-compensated and phase-shifted by heat pulses in vitro. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 8630–8636. [[CrossRef](#)]
67. Ruby, N.F. Rethinking temperature sensitivity of the suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythm.* **2011**, *26*, 368–370; author reply 371–363. [[CrossRef](#)]
68. Abitbol, K.; Debiesse, S.; Molino, F.; Mesirca, P.; Bidaud, I.; Minami, Y.; Mangoni, M.E.; Yagita, K.; Mollard, P.; Bonnefont, X. Clock-dependent and system-driven oscillators interact in the suprachiasmatic nuclei to pace mammalian circadian rhythms. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0187001. [[CrossRef](#)]
69. Ingenwerth, M.; Noichl, E.; Stahr, A.; Korf, H.W.; Reinke, H.; von Gall, C. Heat shock factor 1 deficiency affects systemic body temperature regulation. *Neuroendocrinology* **2016**, *103*, 605–615. [[CrossRef](#)]
70. Reinke, H.; Saini, C.; Fleury-Olela, F.; Dibner, C.; Benjamin, I.J.; Schibler, U. Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 331–345. [[CrossRef](#)]
71. Hung, H.C.; Kay, S.A.; Weber, F. Hsp90, a capacitor of behavioral variation. *J. Biol. Rhythm.* **2009**, *24*, 183–192. [[CrossRef](#)]
72. Xu, F.; Kula-Eversole, E.; Iwanaszko, M.; Hutchison, A.L.; Dinner, A.; Allada, R. Circadian clocks function in concert with heat shock organizing protein to modulate mutant huntingtin aggregation and toxicity. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 59–70 e54. [[CrossRef](#)]
73. Goh, G.H.; Mark, P.J.; Maloney, S.K. Altered energy intake and the amplitude of the body temperature rhythm are associated with changes in phase, but not amplitude, of clock gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus in vivo. *Chronobiol. Int.* **2016**, *1–13*. [[CrossRef](#)]
74. Nakamura, T.J.; Nakamura, W.; Yamazaki, S.; Kudo, T.; Cutler, T.; Colwell, C.S.; Block, G.D. Age-related decline in circadian output. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 10201–10205. [[CrossRef](#)]
75. McArthur, A.J.; Gillette, M.U.; Prosser, R.A. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* **1991**, *565*, 158–161. [[CrossRef](#)]

76. Poirel, V.J.; Boggio, V.; Dardente, H.; Pevet, P.; Masson-Pevet, M.; Gauer, F. Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* **2003**, *120*, 745–755. [[CrossRef](#)]
77. Agez, L.; Laurent, V.; Pevet, P.; Masson-Pevet, M.; Gauer, F. Melatonin affects nuclear orphan receptors mRNA in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neuroscience* **2007**, *144*, 522–530. [[CrossRef](#)]
78. Best, J.D.; Maywood, E.S.; Smith, K.L.; Hastings, M.H. Rapid resetting of the mammalian circadian clock. *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 828–835. [[CrossRef](#)]
79. Vansteensel, M.J.; Yamazaki, S.; Albus, H.; Deboer, T.; Block, G.D.; Meijer, J.H. Dissociation between circadian *per1* and neuronal and behavioral rhythms following a shifted environmental cycle. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 1538–1542. [[CrossRef](#)]
80. Yamazaki, S.; Numano, R.; Abe, M.; Hida, A.; Takahashi, R.; Ueda, M.; Block, G.D.; Sakaki, Y.; Menaker, M.; Tei, H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **2000**, *288*, 682–685. [[CrossRef](#)]
81. Takamura, M.; Murakami, N.; Takahashi, K.; Kuroda, H.; Etoh, T. Rapid reentrainment of the circadian clock itself, but not the measurable activity rhythms to a new light-dark cycle in the rat. *Physiol. Behav.* **1991**, *50*, 443–449. [[CrossRef](#)]
82. Davidson, A.J.; Castanon-Cervantes, O.; Leise, T.L.; Molyneux, P.C.; Harrington, M.E. Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *Eur. J. Neurosci.* **2009**, *29*, 171–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Nagano, M.; Adachi, A.; Nakahama, K.; Nakamura, T.; Tamada, M.; Meyer-Bernstein, E.; Sehgal, A.; Shigeyoshi, Y. An abrupt shift in the day/night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 6141–6151. [[CrossRef](#)]
84. Nakamura, W.; Yamazaki, S.; Takasu, N.N.; Mishima, K.; Block, G.D. Differential response of period 1 expression within the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 5481–5487. [[CrossRef](#)]
85. Albus, H.; Vansteensel, M.J.; Michel, S.; Block, G.D.; Meijer, J.H. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 886–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Abrahamson, E.E.; Moore, R.Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* **2001**, *916*, 172–191. [[CrossRef](#)]
87. Leak, R.K.; Moore, R.Y. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *433*, 312–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Shinohara, K.; Honma, S.; Katsuno, Y.; Abe, H.; Honma, K. Circadian rhythms in the release of vasoactive intestinal polypeptide and arginine-vasopressin in organotypic slice culture of rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* **1994**, *170*, 183–186. [[CrossRef](#)]
89. Moffitt, J.R.; Bambah-Mukku, D.; Eichhorn, S.W.; Vaughn, E.; Shekhar, K.; Perez, J.D.; Rubinstein, N.D.; Hao, J.; Regev, A.; Dulac, C.; et al. Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region. *Science* **2018**, *362*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Park, J.; Zhu, H.; O'Sullivan, S.; Ogunnaike, B.A.; Weaver, D.R.; Schwaber, J.S.; Vadigepalli, R. Single-cell transcriptional analysis reveals novel neuronal phenotypes and interaction networks involved in the central circadian clock. *Front. Neurosci.* **2016**, *10*, 481. [[CrossRef](#)]
91. Romanov, R.A.; Zeisel, A.; Bakker, J.; Girach, F.; Hellysaz, A.; Tomer, R.; Alpar, A.; Mulder, J.; Clotman, F.; Keimpema, E.; et al. Molecular interrogation of hypothalamic organization reveals distinct dopamine neuronal subtypes. *Nat. Neurosci.* **2017**, *20*, 176–188. [[CrossRef](#)]
92. Lee, I.T.; Chang, A.S.; Manandhar, M.; Shan, Y.; Fan, J.; Izumo, M.; Ikeda, Y.; Motoike, T.; Dixon, S.; Seinfeld, J.E.; et al. Neuromedin s-producing neurons act as essential pacemakers in the suprachiasmatic nucleus to couple clock neurons and dictate circadian rhythms. *Neuron* **2015**, *85*, 1086–1102. [[CrossRef](#)]
93. Mieda, M.; Ono, D.; Hasegawa, E.; Okamoto, H.; Honma, K.; Honma, S.; Sakurai, T. Cellular clocks in avp neurons of the SCN are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron* **2015**, *85*, 1103–1116. [[CrossRef](#)]
94. Low-Zeddies, S.S.; Takahashi, J.S. Chimera analysis of the clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell* **2001**, *105*, 25–42. [[CrossRef](#)]

95. Smyllie, N.J.; Chesham, J.E.; Hamnett, R.; Maywood, E.S.; Hastings, M.H. Temporally chimeric mice reveal flexibility of circadian period-setting in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 3657–3662. [[CrossRef](#)]
96. Prolo, L.M.; Takahashi, J.S.; Herzog, E.D. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 404–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Girardet, C.; Lebrun, B.; Cabirol-Pol, M.J.; Tardivel, C.; Francois-Bellan, A.M.; Becquet, D.; Bosler, O. Brain-derived neurotrophic factor/trkb signaling regulates daily astroglial plasticity in the suprachiasmatic nucleus: Electron-microscopic evidence in mouse. *Glia* **2013**, *61*, 1172–1177. [[CrossRef](#)]
98. Barca-Mayo, O.; Pons-Espinal, M.; Follert, P.; Armirotti, A.; Berdondini, L.; De Pietri Tonelli, D. Astrocyte deletion of *bmal1* alters daily locomotor activity and cognitive functions via gaba signalling. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Tso, C.F.; Simon, T.; Greenlaw, A.C.; Puri, T.; Mieda, M.; Herzog, E.D. Astrocytes regulate daily rhythms in the suprachiasmatic nucleus and behavior. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 1055–1061. [[CrossRef](#)]
100. Brancaccio, M.; Patton, A.P.; Chesham, J.E.; Maywood, E.S.; Hastings, M.H. Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via glutamatergic signaling. *Neuron* **2017**, *93*, 1420–1435 e1425. [[CrossRef](#)]
101. Brancaccio, M.; Edwards, M.D.; Patton, A.P.; Smyllie, N.J.; Chesham, J.E.; Maywood, E.S.; Hastings, M.H. Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science* **2019**, *363*, 187–192. [[CrossRef](#)]
102. Aschoff, J. Circadian rhythms in man. *Science* **1965**, *148*, 1427–1432. [[CrossRef](#)]
103. Cambras, T.; Weller, J.R.; Angles-Pujoras, M.; Lee, M.L.; Christopher, A.; Diez-Noguera, A.; Krueger, J.M.; de la Iglesia, H.O. Circadian desynchronization of core body temperature and sleep stages in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7634–7639. [[CrossRef](#)]
104. Abrahamson, E.E.; Moore, R.Y. Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2006**, *252*, 46–56. [[CrossRef](#)]
105. Vujovic, N.; Gooley, J.J.; Zhou, T.C.; Saper, C.B. Projections from the subparaventricular zone define four channels of output from the circadian timing system. *J. Comp. Neurol.* **2015**, *523*, 2714–2737. [[CrossRef](#)]
106. Bur, I.M.; Cohen-Solal, A.M.; Carmignac, D.; Abecassis, P.Y.; Chauvet, N.; Martin, A.O.; van der Horst, G.T.; Robinson, I.C.; Maurel, P.; Mollard, P.; Bonnefont, X. The circadian clock components *CRY1* and *CRY2* are necessary to sustain sex dimorphism in mouse liver metabolism. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 9066–9073. [[CrossRef](#)]
107. Davies, J.S.; Carter, D.A.; Wells, T. Photic stimulation inhibits growth hormone secretion in rats: A hypothalamic mechanism for transient entrainment. *Endocrinology* **2004**, *145*, 2950–2958. [[CrossRef](#)]
108. Willoughby, J.O.; Martin, J.B. The suprachiasmatic nucleus synchronizes growth hormone secretory rhythms with the light-dark cycle. *Brain Res.* **1978**, *151*, 413–417. [[CrossRef](#)]
109. Yulyaningsih, E.; Loh, K.; Lin, S.; Lau, J.; Zhang, L.; Shi, Y.; Berning, B.A.; Enriquez, R.; Driessler, F.; Macia, L.; et al. Pancreatic polypeptide controls energy homeostasis via *npY_{6R}* signaling in the suprachiasmatic nucleus in mice. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 58–72. [[CrossRef](#)]
110. Glad, C.A.; Kitchen, E.E.; Russ, G.C.; Harris, S.M.; Davies, J.S.; Gevers, E.F.; Gabrielsson, B.G.; Wells, T. Reverse feeding suppresses the activity of the gh axis in rats and induces a preobesogenic state. *Endocrinology* **2011**, *152*, 869–882. [[CrossRef](#)]
111. Freeman, G.M., Jr.; Krock, R.M.; Aton, S.J.; Thaben, P.; Herzog, E.D. Gaba networks destabilize genetic oscillations in the circadian pacemaker. *Neuron* **2013**, *78*, 799–806. [[CrossRef](#)]
112. Liu, C.; Reppert, S.M. Gaba synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* **2000**, *25*, 123–128. [[CrossRef](#)]
113. Maywood, E.S.; Chesham, J.E.; O'Brien, J.A.; Hastings, M.H. A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14306–14311. [[CrossRef](#)]
114. Brancaccio, M.; Maywood, E.S.; Chesham, J.E.; Loudon, A.S.; Hastings, M.H. A *gq-ca²⁺* axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus. *Neuron* **2013**, *78*, 714–728. [[CrossRef](#)]
115. Enoki, R.; Kuroda, S.; Ono, D.; Hasan, M.T.; Ueda, T.; Honma, S.; Honma, K. Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 21498–21503. [[CrossRef](#)]

116. Enoki, R.; Oda, Y.; Mieda, M.; Ono, D.; Honma, S.; Honma, K.I. Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E2476–E2485. [[CrossRef](#)]
117. Hong, J.H.; Jeong, B.; Min, C.H.; Lee, K.J. Circadian waves of cytosolic calcium concentration and long-range network connections in rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **2012**, *35*, 1417–1425. [[CrossRef](#)]
118. Kruse, F.; Junker, J.P.; van Oudenaarden, A.; Bakkers, J. Tomo-seq: A method to obtain genome-wide expression data with spatial resolution. *Methods Cell Biol.* **2016**, *135*, 299–307.
119. Abel, J.H.; Meeker, K.; Granados-Fuentes, D.; St John, P.C.; Wang, T.J.; Bales, B.B.; Doyle, F.J., 3rd; Herzog, E.D.; Petzold, L.R. Functional network inference of the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 4512–4517. [[CrossRef](#)]
120. Taylor, S.R.; Wang, T.J.; Granados-Fuentes, D.; Herzog, E.D. Resynchronization dynamics reveal that the ventral entrains the dorsal suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythm.* **2017**, *32*, 35–47. [[CrossRef](#)]
121. Hafner, M.; Koepl, H.; Gonze, D. Effect of network architecture on synchronization and entrainment properties of the circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus. *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Inouye, S.T.; Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 5962–5966. [[CrossRef](#)]
123. Meijer, J.H.; Schaap, J.; Watanabe, K.; Albus, H. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: In vivo versus in vitro models. *Brain Res.* **1997**, *753*, 322–327. [[CrossRef](#)]
124. Tsuji, T.; Tsuji, C.; Ludwig, M.; Leng, G. The rat suprachiasmatic nucleus: The master clock ticks at 30 hz. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 3629–3650. [[CrossRef](#)]
125. Ono, D.; Honma, S.; Nakajima, Y.; Kuroda, S.; Enoki, R.; Honma, K.I. Dissociation of *per1* and *bmal1* circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus in parallel with behavioral outputs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E3699–E3708. [[CrossRef](#)]
126. Yamaguchi, S.; Kobayashi, M.; Mitsui, S.; Ishida, Y.; van der Horst, G.T.; Suzuki, M.; Shibata, S.; Okamura, H. View of a mouse clock gene ticking. *Nature* **2001**, *409*, 684. [[CrossRef](#)]
127. Mei, L.; Fan, Y.; Lv, X.; Welsh, D.K.; Zhan, C.; Zhang, E.E. Long-term in vivo recording of circadian rhythms in brains of freely moving mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 4276–4281. [[CrossRef](#)]
128. Jones, J.R.; Simon, T.; Lones, L.; Herzog, E.D. Scn vip neurons are essential for normal light-mediated resetting of the circadian system. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 7986–7995. [[CrossRef](#)]
129. Colwell, C.S. Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **2000**, *12*, 571–576. [[CrossRef](#)]
130. Ghosh, K.K.; Burns, L.D.; Cocker, E.D.; Nimmerjahn, A.; Ziv, Y.; Gamal, A.E.; Schnitzer, M.J. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 871–878. [[CrossRef](#)]
131. Ziv, Y.; Burns, L.D.; Cocker, E.D.; Hamel, E.O.; Ghosh, K.K.; Kitch, L.J.; El Gamal, A.; Schnitzer, M.J. Long-term dynamics of *ca1* hippocampal place codes. *Nat. Neurosci.* **2013**, *16*, 264–266. [[CrossRef](#)]
132. Chen, K.S.; Xu, M.; Zhang, Z.; Chang, W.C.; Gaj, T.; Schaffer, D.V.; Dan, Y. A hypothalamic switch for rem and non-rem sleep. *Neuron* **2018**, *97*, 1168–1176. [[CrossRef](#)]
133. Jennings, J.H.; Ung, R.L.; Resendez, S.L.; Stamatakis, A.M.; Taylor, J.G.; Huang, J.; Veleta, K.; Katak, P.A.; Aita, M.; Shilling-Scriver, K.; et al. Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors. *Cell* **2015**, *160*, 516–527. [[CrossRef](#)]
134. Remedios, R.; Kennedy, A.; Zelikowsky, M.; Grewe, B.F.; Schnitzer, M.J.; Anderson, D.J. Social behaviour shapes hypothalamic neural ensemble representations of conspecific sex. *Nature* **2017**, *550*, 388–392. [[CrossRef](#)]
135. Kohl, J.; Babayan, B.M.; Rubinstein, N.D.; Autry, A.E.; Marin-Rodriguez, B.; Kapoor, V.; Miyamishi, K.; Zweifel, L.S.; Luo, L.; Uchida, N.; et al. Functional circuit architecture underlying parental behaviour. *Nature* **2018**, *556*, 326–331. [[CrossRef](#)]
136. Guo, F.; Chen, X.; Rosbash, M. Temporal calcium profiling of specific circadian neurons in freely moving flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E8780–E8787. [[CrossRef](#)]
137. Li, M.T.; Cao, L.H.; Xiao, N.; Tang, M.; Deng, B.; Yang, T.; Yoshii, T.; Luo, D.G. Hub-organized parallel circuits of central circadian pacemaker neurons for visual photoentrainment in drosophila. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4247. [[CrossRef](#)]

138. Liang, X.; Holy, T.E.; Taghert, P.H. Synchronous drosophila circadian pacemakers display nonsynchronous $ca(2)(+)$ rhythms in vivo. *Science* **2016**, *351*, 976–981. [[CrossRef](#)]
139. Liang, X.; Holy, T.E.; Taghert, P.H. A series of suppressive signals within the drosophila circadian neural circuit generates sequential daily outputs. *Neuron* **2017**, *94*, 1173–1189. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- Abitbol, K., Debiecse, S., Molino, F., Mesirca, P., Bidaud, I., Minami, Y., Mangoni, M.E., Yagita, K., Mollard, P., and Bonnefont, X. (2017). Clock-dependent and system-driven oscillators interact in the suprachiasmatic nuclei to pace mammalian circadian rhythms. *PLOS ONE* *12*, e0187001.
- Akashi, M., and Nishida, E. (2000). Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev.* *14*, 645–649.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., and Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in Cultured Cells. *MOL CELL BIOL* *22*, 11.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Shibata, S. (1999). Inhibition of Light- or Glutamate-Induced *mPer1* Expression Represses the Phase Shifts into the Mouse Circadian Locomotor and Suprachiasmatic Firing Rhythms. *J. Neurosci.* *19*, 1115–1121.
- Albus, H., Vansteensel, M.J., Michel, S., Block, G.D., and Meijer, J.H. (2005). A GABAergic Mechanism Is Necessary for Coupling Dissociable Ventral and Dorsal Regional Oscillators within the Circadian Clock. *Curr. Biol.* *15*, 886–893.
- Antonini, A., Bovetti, S., Moretti, C., Succol, F., Rajamanickam, V.P., Bertoncini, A., Liberale, C., and Fellin, T. (2018). Extended field-of-view ultrathin microendoscopes with built-in aberration correction for high-resolution imaging with minimal invasiveness (Neuroscience).
- Aschoff, J. (1954). Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. *Naturwissenschaften* *41*, 49–56.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J., and Herzog, E.D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* *8*, 476–483.
- Augustine, G.J., Santamaria, F., and Tanaka, K. (2003). Local calcium signaling in neurons. *Neuron* *40*, 331–346.
- Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. (1998). A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. *Cell* *93*, 929–937.
- Bargiello, T.A., and Young, M.W. (1984). Molecular genetics of a biological clock in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *81*, 2142–2146.
- Barretto, R.P.J., Messerschmidt, B., and Schnitzer, M.J. (2009). In vivo fluorescence imaging with high-resolution microlenses. *Nat. Methods* *6*, 511–512.
- Barretto, R.P.J., Ko, T.H., Jung, J.C., Wang, T.J., Capps, G., Waters, A.C., Ziv, Y., Attardo, A., Recht, L., and Schnitzer, M.J. (2011). Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy. *Nat. Med.* *17*, 223–228.

- Belle, M.D.C. (2015). Circadian Tick-Talking Across the Neuroendocrine System and Suprachiasmatic Nuclei Circuits: The Enigmatic Communication Between the Molecular and Electrical Membrane Clocks. *J. Neuroendocrinol.* *27*, 567–576.
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* *21*, 13–26.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 11–21.
- Bloch, G., Bar-Shai, N., Cytter, Y., and Green, R. (2017). Time is honey: circadian clocks of bees and flowers and how their interactions may influence ecological communities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *372*, 20160256.
- Bocarsly, M.E., Jiang, W., Wang, C., Dudman, J.T., Ji, N., and Aponte, Y. (2015). Minimally invasive microendoscopy system for in vivo functional imaging of deep nuclei in the mouse brain. *Biomed. Opt. Express* *6*, 4546–4556.
- Brancaccio, M., Es, M., Je, C., As, L., and Mh, H. (2013). A Gq-Ca²⁺ axis controls circuit-level encoding of circadian time in the suprachiasmatic nucleus (Neuron).
- 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.
- Brown, T.M., and Piggins, H.D. (2007). Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog. Neurobiol.* *82*, 229–255.
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z., and Keesler, G.A. (2001). Human casein kinase I δ phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett.* *489*, 159–165.
- Cermakian, N., and Sassone-Corsi, P. (2002). Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr. Opin. Neurobiol.* *12*, 359–365.
- Cobbold, P.H., and Rink, T.J. (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem. J.* *248*, 313–328.
- Colwell, C.S. (2000). Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus: Rhythmic Ca²⁺ in SCN. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 571–576.
- Colwell, C.S. (2011). Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 553–569.
- Colwell, C.S., Michel, S., Itri, J., Rodriguez, W., Tam, J., Lelievre, V., Hu, Z., Liu, X., and Waschek, J.A. (2003). Disrupted circadian rhythms in VIP- and PHI-deficient mice. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *285*, R939–R949.
- Courbin, N., Loveridge, A.J., Fritz, H., Macdonald, D.W., Patin, R., Valeix, M., and Chamailé-Jammes, S. (2019). Zebra diel migrations reduce encounter risk with lions at night. *J. Anim. Ecol.* *88*, 92–101.

- Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 517–549.
- D’Ortous de Mairan, J.-J. (1729). Observation botanique. In *Histoire de l’Académie Royale des Sciences*. In *Observation Botanique*, pp. 35–36.
- 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.
- El Cheikh Hussein, L., Mollard, P., and Bonnefont, X. (2019). Molecular and Cellular Networks in The Suprachiasmatic Nuclei. *Int. J. Mol. Sci.* *20*, 2052.
- Enoki, R., Kuroda, S., Ono, D., Hasan, M.T., Ueda, T., Honma, S., and Honma, K. -i. (2012). Topological specificity and hierarchical network of the circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 21498–21503.
- Enoki, R., Ono, D., Kuroda, S., Honma, S., and Honma, K.I. (2017a). Dual origins of the intracellular circadian calcium rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Sci. Rep.* *7*, 41733–41733.
- Enoki, R., Oda, Y., Mieda, M., Ono, D., Honma, S., and Honma, K. (2017b). Synchronous circadian voltage rhythms with asynchronous calcium rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E2476–E2485.
- Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC) (2014). Un siècle de neurosciences.
- Foley, N.C., Tong, T.Y., Foley, D., LeSauter, J., Welsh, D.K., and Silver, R. (2011). Characterization of orderly spatiotemporal patterns of clock gene activation in mammalian suprachiasmatic nucleus: Spatiotemporal gene expression patterns. *Eur. J. Neurosci.* *33*, 1851–1865.
- Francois-Bellan, A.M., Kachidian, P., Dusticier, G., Tonon, M.C., Vaudry, H., and Bosler, O. (1990). GABA neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: Involvement in chemospecific synaptic circuitry and evidence for GAD-peptide colocalization. *J. Neurocytol.* *19*, 937–947.
- 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.
- Ghosh, K.K., Burns, L.D., Cocker, E.D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., Gamal, A.E., and Schnitzer, M.J. (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat. Methods* *8*, 871–878.
- Gong, R., Xu, S., Hermundstad, A., Yu, Y., and Sternson, S.M. (2020). Hindbrain Double-Negative Feedback Mediates Palatability-Guided Food and Water Consumption. *Cell* *182*, 1589-1605.e22.
- Gross, G.G., Junge, J.A., Mora, R.J., Kwon, H.-B., Olson, C.A., Takahashi, T.T., Liman, E.R., Ellis-Davies, G.C.R., McGee, A.W., Sabatini, B.L., et al. (2013). Recombinant Probes for Visualizing Endogenous Synaptic Proteins in Living Neurons. *Neuron* *78*, 971–985.

- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* *260*, 3440–3450.
- Gu, X., and Spitzer, N.C. (1995). Distinct aspects of neuronal differentiation encoded by frequency of spontaneous Ca²⁺ transients. *Nature* *375*, 784–787.
- Guillou, A., Romanò, N., Steyn, F., Abitbol, K., Le Tissier, P., Bonnefont, X., Chen, C., Mollard, P., and Martin, A.O. (2015). Assessment of Lactotroph Axis Functionality in Mice: Longitudinal Monitoring of PRL Secretion by Ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology* *156*, 1924–1930.
- Guo, F., Chen, X., and Rosbash, M. (2017). Temporal calcium profiling of specific circadian neurons in freely moving flies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, E8780–E8787.
- Guo, H., Brewer, J.M., Lehman, M.N., and Bittman, E.L. (2006). Suprachiasmatic Regulation of Circadian Rhythms of Gene Expression in Hamster Peripheral Organs: Effects of Transplanting the Pacemaker. *J. Neurosci.* *26*, 6406–6412.
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J.M., and Silver, R. (2001). Expression of Period Genes: Rhythmic and Nonrhythmic Compartments of the Suprachiasmatic Nucleus Pacemaker. *J. Neurosci.* *21*, 7742–7750.
- Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.-C., et al. (2002). The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei. *Cell* *109*, 497–508.
- Harrisingh, M.C., Wu, Y., Lnenicka, G.A., and Nitabach, M.N. (2007). Intracellular Ca²⁺ Regulates Free-Running Circadian Clock Oscillation In Vivo. *J. Neurosci.* *27*, 12489–12499.
- Harvey, J.R.M., Plante, A.E., and Meredith, A.L. (2020). Ion Channels Controlling Circadian Rhythms in Suprachiasmatic Nucleus Excitability. *Physiol. Rev.* *100*, 1415–1454.
- Hastings, J.W., and Sweeney, B.M. (1958). A Persistent Diurnal Rhythm of Luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *Biol. Bull.* *115*, 440–458.
- Hastings, M.H., Reddy, A.B., and Maywood, E.S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 649–661.
- Hastings, M.H., Maywood, E.S., and Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Rev. Neurosci.* *19*, 453–469.
- Hazlerigg, D.G., Ebling, F.J.P., and Johnston, J.D. (2005). Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Curr. Biol.* *15*, R449–R450.
- Herzog, E.D., Takahashi, J.S., and Block, G.D. (1998). Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* *1*, 708–713.
- Herzog, E.D., Aton, S.J., Numano, R., Sakaki, Y., and Tei, H. (2016). Temporal Precision in the Mammalian Circadian System: A Reliable Clock from Less Reliable Neurons. *J. Biol. Rhythms.*

- Herzog, E.D., Hermansteyne, T., Smyllie, N.J., and Hastings, M.H. (2017). Regulating the Suprachiasmatic Nucleus (SCN) Circadian Clockwork: Interplay between Cell-Autonomous and Circuit-Level Mechanisms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*, a027706.
- Hisano, S., Chikamori-Aoyama, M., Katoh, S., Kagotani, Y., Daikoku, S., and Chihara, K. (1988a). Suprachiasmatic nucleus neurons immunoreactive for vasoactive intestinal polypeptide have synaptic contacts with axons immunoreactive for neuropeptide Y: An immunoelectron microscopic study in the rat. *Neurosci. Lett.* *88*, 145–150.
- Hisano et al. (1988b). PII: 0304-3940(88)90116-4 | Elsevier Enhanced Reader.
- Hong, J.H., Min, C.H., Jeong, B., Kojiya, T., Morioka, E., Nagai, T., Ikeda, M., and Lee, K.J. (2010). Intracellular Calcium Spikes in Rat Suprachiasmatic Nucleus Neurons Induced by BAPTA-Based Calcium Dyes. *PLoS ONE* *5*, e9634.
- Honma, S., and Honma, K. (2003). The biological clock: Ca²⁺ links the pendulum to the hands. *Trends Neurosci.* *26*, 650–653.
- Honma, S., Shirakawa, T., Katsuno, Y., Namihira, M., and Honma, K. (1998). Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neurosci. Lett.* *250*, 157–160.
- Honma, S., Nakamura, W., Shirakawa, T., and Honma, K. (2004). Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci. Lett.* *358*, 173–176.
- Hurst, W.J., Mitchell, J.W., and Gillette, M.U. (2002). Synchronization and phase-resetting by glutamate of an immortalized SCN cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *298*, 133–143.
- Ikeda, M. (2004). Calcium dynamics and circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *10*, 315–324.
- Ikeda, M., and Ikeda, M. (2014). Bmal1 Is an Essential Regulator for Circadian Cytosolic Ca²⁺ Rhythms in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *J. Neurosci.* *34*, 12029–12038.
- Ikeda, M., Sugiyama, T., Wallace, C.S., Gompf, H.S., Yoshioka, T., Miyawaki, A., and Allen, C.N. (2003a). Circadian Dynamics of Cytosolic and Nuclear Ca²⁺ in Single Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *Neuron* *38*, 253–263.
- Ikeda, M., Yoshioka, T., and Allen, C.N. (2003b). Developmental and circadian changes in Ca²⁺ mobilization mediated by GABA_A and NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 58–70.
- Inagaki, N., Honma, S., Ono, D., Tanahashi, Y., and Honma, K. (2007). Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 7664–7669.
- Irwin, R.P., and Allen, C.N. (2007). Calcium Response to Retinohypothalamic Tract Synaptic Transmission in Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *J. Neurosci.* *27*, 11748–11757.
- Irwin, R.P., and Allen, C.N. (2010). Neuropeptide-mediated calcium signaling in the suprachiasmatic nucleus network: Peptides and Ca²⁺ signaling in the SCN. *Eur. J. Neurosci.* *32*, 1497–1506.

- 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.
- 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.
- Johnson, M.S. (1939). Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (*Peromyscus*). *J. Exp. Zool.* 82, 315–328.
- Johnson, R.F., Smale, L., Moore, R.Y., and Morin, L.P. (1988). Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5301–5304.
- Jones, C.R., Campbell, S.S., Zone, S.E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P.J., Jones, B., Czajkowski, L., and Ptáček, L.J. (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat. Med.* 5, 1062–1065.
- Jones, J.R., Simon, T., Lones, L., and Herzog, E.D. (2018). SCN VIP Neurons Are Essential for Normal Light-Mediated Resetting of the Circadian System. *J. Neurosci.* 38, 7986–7995.
- Kim, T.H., Zhang, Y., Lecoq, J., Jung, J.C., Li, J., Zeng, H., Niell, C.M., and Schnitzer, M.J. (2016). Long-Term Optical Access to an Estimated One Million Neurons in the Live Mouse Cortex. *Cell Rep.* 17, 3385–3394.
- Klein D, Moore RY, and Reppert SM (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock* (Oxford University Press).
- Kodandaramaiah, S.B., Flores, F.J., Holst, G.L., Singer, A.C., Han, X., Brown, E.N., Boyden, E.S., and Forest, C.R. (2018). Multi-neuron intracellular recording in vivo via interacting autopatching robots. *ELife* 7, e24656.
- Koike, N., Yoo, S.-H., Huang, H.-C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T.-K., and Takahashi, J.S. (2012). Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science* 338, 349–354.
- Kojima, S., Shingle, D.L., and Green, C.B. (2011). Post-transcriptional control of circadian rhythms. *J. Cell Sci.* 124, 311–320.
- Kuhlman, S.J., and McMahon, D.G. (2004). Rhythmic regulation of membrane potential and potassium current persists in SCN neurons in the absence of environmental input. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1113–1117.
- Leak, R.K., Card, J.P., and Moore, R.Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res.* 819, 23–32.
- Lecoq, J., Savall, J., Vučinić, D., Grewe, B.F., Kim, H., Li, J.Z., Kitch, L.J., and Schnitzer, M.J. (2014). Visualizing mammalian brain area interactions by dual-axis two-photon calcium imaging. *Nat. Neurosci.* 17, 1825–1829.

- Lehman et al., N. (1987). Circadian Rhythmicity Restored by Neural Transplant. Immunocytochemical Characterization of the Graft and Its Integration with the Host Brain. *J. Neurosci.* 13.
- Lévi, F., Okyar, A., Dulong, S., Innominato, P.F., and Clairambault, J. (2010). Circadian timing in cancer treatments. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 377–421.
- Liang, X., Holy, T.E., and Taghert, P.H. (2017). A Series of Suppressive Signals within the *Drosophila* Circadian Neural Circuit Generates Sequential Daily Outputs. *Neuron* 94, 1173–1189.e4.
- Lin, M.Z., and Schnitzer, M.J. (2016). Genetically encoded indicators of neuronal activity. *Nat. Neurosci.* 19, 1142–1153.
- Liu, C., and Reppert, S.M. (2000). GABA Synchronizes Clock Cells within the Suprachiasmatic Circadian Clock. *Neuron* 25, 123–128.
- Liu, A.C., Welsh, D.K., Ko, C.H., Tran, H.G., Zhang, E.E., Priest, A.A., Buhr, E.D., Singer, O., Meeker, K., Verma, I.M., et al. (2007). Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network. *Cell* 129, 605–616.
- Lowrey, P.L. (2000). Positional Syntenic Cloning and Functional Characterization of the Mammalian Circadian Mutation tau. *Science* 288, 483–491.
- Lundkvist, G.B. (2005). A Calcium Flux Is Required for Circadian Rhythm Generation in Mammalian Pacemaker Neurons. *J. Neurosci.* 25, 7682–7686.
- Mao, T., O'Connor, D.H., Scheuss, V., Nakai, J., and Svoboda, K. (2008). Characterization and Subcellular Targeting of GCaMP-Type Genetically-Encoded Calcium Indicators. *PLoS ONE* 3, e1796.
- Meffre, J., Sicre, M., Diarra, M., Marchessaux, F., Paleressompoulle, D., and Ambroggi, F. (2019). Orexin in the Posterior Paraventricular Thalamus Mediates Hunger-Related Signals in the Nucleus Accumbens Core. *Curr. Biol.* 29, 3298–3306.e4.
- Menet, J.S., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C., and Rosbash, M. (2012). Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. *ELife* 1, e00011.
- Meng, G., Liang, Y., Sarsfield, S., Jiang, W., Lu, R., Dudman, J.T., Aponte, Y., and Ji, N. (2019). High-throughput synapse-resolving two-photon fluorescence microendoscopy for deep-brain volumetric imaging in vivo. *ELife* 8, e40805.
- Meredith, A.L., Wiler, S.W., Miller, B.H., Takahashi, J.S., Fodor, A.A., Ruby, N.F., and Aldrich, R.W. (2006). BK calcium-activated potassium channels regulate circadian behavioral rhythms and pacemaker output. *Nat. Neurosci.* 9, 1041–1049.
- Moore, R.Y., and Eichler, V.B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42, 201–206.
- Mure, L.S., Le, H.D., Benegiamo, G., Chang, M.W., Rios, L., Jillani, N., Ngotho, M., Kariuki, T., Dkhissi-Benyahya, O., Cooper, H.M., et al. (2018). Diurnal transcriptome atlas of a primate across major neural and peripheral tissues. *Science* 359, eaao0318.

- Nagano, M., Adachi, A., Nakahama, K., Nakamura, T., Tamada, M., Meyer-Bernstein, E., Sehgal, A., and Shigeyoshi, Y. (2003). An Abrupt Shift in the Day/Night Cycle Causes Desynchrony in the Mammalian Circadian Center. *J. Neurosci.* *23*, 6141–6151.
- Nagoshi, E., Saini, C., Bauer, C., Laroche, T., Naef, F., and Schibler, U. (2004). Circadian Gene Expression in Individual Fibroblasts: Cell-Autonomous and Self-Sustained Oscillators Pass Time to Daughter Cells. *Cell* *119*, 693–705.
- Nakamura, W. (2005). Differential Response of Period 1 Expression within the Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurosci.* *25*, 5481–5487.
- Noguchi, T., Leise, T.L., Kingsbury, N.J., Diemer, T., Wang, L.L., Henson, M.A., and Welsh, D.K. (2017). Calcium Circadian Rhythmicity in the Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Modulation. *Eneuro* *4*, ENEURO.0160-17.2017.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* *109*, 307–320.
- Park, J., Zhu, H., O’Sullivan, S., Ogunnaiké, B.A., Weaver, D.R., Schwaber, J.S., and Vadigepalli, R. (2016). Single-Cell Transcriptional Analysis Reveals Novel Neuronal Phenotypes and Interaction Networks Involved in the Central Circadian Clock. *Front. Neurosci.* *10*.
- Patton, A.P., Chesham, J.E., and Hastings, M.H. (2016). Combined Pharmacological and Genetic Manipulations Unlock Unprecedented Temporal Elasticity and Reveal Phase-Specific Modulation of the Molecular Circadian Clock of the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurosci.* *36*, 9326–9341.
- Patton, A.P., Edwards, M.D., Smyllie, N.J., Hamnett, R., Chesham, J.E., Brancaccio, M., Maywood, E.S., and Hastings, M.H. (2020). The VIP-VPAC2 neuropeptidergic axis is a cellular pacemaking hub of the suprachiasmatic nucleus circadian circuit. *Nat. Commun.* *11*, 3394.
- Pennartz, C.M.A., de Jeu, M.T.G., Bos, N.P.A., Schaap, J., and Geurtsen, A.M.S. (2002). Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* *416*, 286–290.
- Pittendrigh, C.S. (1954). ON TEMPERATURE INDEPENDENCE IN THE CLOCK SYSTEM CONTROLLING EMERGENCE TIME IN DROSOPHILA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *40*, 1018–1029.
- Pittendrigh, C.S. (1958). Perspectives in the study of biological clocks. *Perspect. Mar. Biol.* *239–268*.
- Ralph, M., and Menaker, M. (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* *241*, 1225–1227.
- Ralph, M.R., and Lehman, M.N. (1991). Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends Neurosci.* *14*, 362–366.

- Ralph, M., Foster, R., Davis, F., and Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247, 975–978.
- Rappaport, S. (2002). Le temps de la vertu : vertu de la lenteur. *Rev. Hist.* n° 621, 51–76.
- Rapports du Comité National (2015). I. L'évolution des méthodes d'étude en neuroscience.
- Roenneberg, T., and Merrow, M. (2016). The Circadian Clock and Human Health. *Curr. Biol.* 26, R432–R443.
- Rusak, B., and Zucker, I. (1979). Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59, 449–526.
- Sabatini, B.L., and Regehr, W.G. (1996). Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* 384, 170–172.
- Sabatini, B.L., Oertner, T.G., and Svoboda, K. (2002). The life cycle of Ca(2+) ions in dendritic spines. *Neuron* 33, 439–452.
- Schmutz, I., Wendt, S., Schnell, A., Kramer, A., Mansuy, I.M., and Albrecht, U. (2011). Protein Phosphatase 1 (PP1) Is a Post-Translational Regulator of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS ONE* 6, e21325.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., et al. (1997). Light-Induced Resetting of a Mammalian Circadian Clock Is Associated with Rapid Induction of the mPer1 Transcript. *Cell* 91, 1043–1053.
- Shirakawa, T., Honma, S., Katsuno, Y., Oguchi, H., and Honma, K. (2000). Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2833–2838.
- Slat, E., Freeman, G.M., and Herzog, E.D. (2013). The Clock in the Brain: Neurons, Glia, and Networks in Daily Rhythms. In *Circadian Clocks*, A. Kramer, and M. Merrow, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 105–123.
- Smith, S.L., and Otis, T.S. (2003). Persistent Changes in Spontaneous Firing of Purkinje Neurons Triggered by the Nitric Oxide Signaling Cascade. *J. Neurosci.* 23, 367–372.
- Spiga, F., Walker, J.J., Terry, J.R., and Lightman, S.L. (2014). HPA Axis-Rhythms. In *Comprehensive Physiology*, (American Cancer Society), pp. 1273–1298.
- 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.* 69, 1583–1586.
- Steyn, F.J., Huang, L., Ngo, S.T., Leong, J.W., Tan, H.Y., Xie, T.Y., Parlow, A.F., Veldhuis, J.D., Waters, M.J., and Chen, C. (2011). Development of a Method for the Determination of Pulsatile Growth Hormone Secretion in Mice. *Endocrinology* 152, 3165–3171.
- Takahashi, J.S. (2017). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat. Rev. Genet.* 18, 164–179.

- Takano, A., Isojima, Y., and Nagai, K. (2004). Identification of mPer1 Phosphorylation Sites Responsible for the Nuclear Entry. *J. Biol. Chem.* 279, 32578–32585.
- Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptáček, L.J., and Fu, Y.H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040–1043.
- Torres, M., Becquet, D., Blanchard, M.-P., Guillen, S., Boyer, B., Moreno, M., Franc, J.-L., and François-Bellan, A.-M. (2016). Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements. *ELife* 5, e14837.
- 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. 264, 7.
- Webb, A.B., Angelo, N., Huettner, J.E., and Herzog, E.D. (2009). Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16493–16498.
- 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., Yoo, S.-H., Liu, A.C., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2004). Bioluminescence Imaging of Individual Fibroblasts Reveals Persistent, Independently Phased Circadian Rhythms of Clock Gene Expression. *Curr. Biol.* 14, 2289–2295.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., and Kay, S.A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 551–577.
- Wen, S., Ma, D., Zhao, M., Xie, L., Wu, Q., Gou, L., Zhu, C., Fan, Y., Wang, H., and Yan, J. (2020). Spatiotemporal single-cell analysis of gene expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Nat. Neurosci.* 23, 456–467.
- Xu, Y., Padiath, Q.S., Shapiro, R.E., Jones, C.R., Wu, S.C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L.J., and Fu, Y.-H. (2005). Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434, 640–644.
- Yamaguchi, S., Isejima, H., Matsuo, T., Okura, R., Yagita, K., Kobayashi, M., and Okamura, H. (2003). Synchronization of Cellular Clocks in the Suprachiasmatic Nucleus. *Science* 302, 1408–1412.
- Yamaguchi, Y., Suzuki, T., Mizoro, Y., Kori, H., Okada, K., Chen, Y., Fustin, J.-M., Yamazaki, F., Mizuguchi, N., Zhang, J., et al. (2013). Mice Genetically Deficient in Vasopressin V1a and V1b Receptors Are Resistant to Jet Lag. *Science* 342, 85–90.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., and Takumi, T. (2004). Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol. Biol.* 5, 18.
- Yamazaki, S. (2000). Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. *Science* 288, 682–685.

Yan, L., and Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 1153–1162.

Yan, L., Takekida, S., Shigeyoshi, Y., and Okamura, H. (1999). Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* *94*, 141–150.

Yasuda, R., Nimchinsky, E.A., Scheuss, V., Pologruto, T.A., Oertner, T.G., Sabatini, B.L., and Svoboda, K. (2004). Imaging Calcium Concentration Dynamics in Small Neuronal Compartments. *Sci. STKE* *2004*, p15–p15.

Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepkka, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., et al. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 5339–5346.