



**HAL**  
open science

# Rôle de la rétine dans les fonctions non-visuelles : traitement des informations relatives à la photopériode et impact de la lumière bleue sur le comportement.

Bastien Leclercq

## ► To cite this version:

Bastien Leclercq. Rôle de la rétine dans les fonctions non-visuelles : traitement des informations relatives à la photopériode et impact de la lumière bleue sur le comportement.. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ099 . tel-03698461

**HAL Id: tel-03698461**

**<https://theses.hal.science/tel-03698461>**

Submitted on 18 Jun 2022

**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.

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives

(INCI - UPR3212 - CNRS)

## THÈSE présentée par : **Bastien LECLERCQ**

Soutenue le : **22 Janvier 2021**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : **Sciences de la vie / Neurosciences**

**Rôle de la rétine dans les fonctions non-visuelles :  
traitement des informations relatives à la photopériode et  
impact de la lumière bleue sur le comportement**

### THÈSE dirigée par :

Dr LAURENT Virginie

Maître de Conférences, INCI, Université de Strasbourg

### RAPPORTEURS :

Dr DKHISSI-BENYAHYA Ouria

Chargé de Recherche INSERM, Stem Cell and Brain  
Research Institute, Bron

Dr TORRIGLIA Alicia

Directeur de Recherche INSERM, Centre de Recherche  
des Cordeliers, Paris

Dr SIMONNEAUX Valérie

Directeur de Recherche, INCI, Strasbourg

---

### MEMBRE INVITÉ

Dr VANDEWALLE Gilles

Chercheur Qualifié (FNRS), Sleep & Chronobiology Lab,  
GIGA Institute, Université de Liège (Belgique)



# Thèse de Doctorat

---

Bastien LECLERCQ

**Rôle de la rétine dans les fonctions non-visuelles :**  
Traitement des informations relatives à la photopériode et  
impact de la lumière bleue sur le comportement

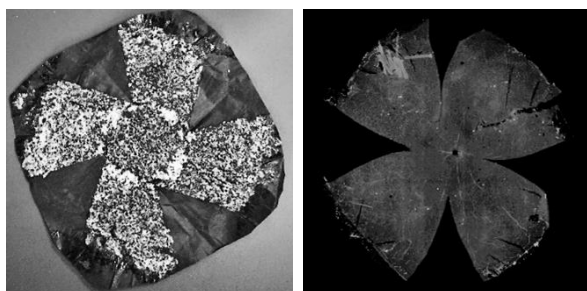
Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives  
*INCI – CNRS (UPR 3212)*

**Directeur de Thèse : Dr Virginie LAURENT**  
*Maître de Conférences des Universités (HDR)*

Thèse soutenue le **22 Janvier 2021**



*Faire une thèse sur la rétine, c'est ne plus être capable de regarder un emballage de muffin sans penser au travail.*





## REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier avant tout les membres de mon jury de thèse, qui ont accepté d'évaluer ces 4 années de travail. Merci aux Dr Ouria Dkhissi-Benyahya, Dr Alicia Torriglia, Dr Valérie Simonneaux et au Dr Gilles Vandewalle.

Un très grand merci à ma directrice de thèse. Merci pour la liberté que tu m'as offerte, tant dans la proposition de mes idées que dans la création des protocoles. Cela m'a vraiment permis de vivre à fond mon sujet de recherche et rien que pour ça, cette thèse a été extraordinairement enrichissante. Ces 4 dernières années n'ont pas été un long fleuve tranquille et je ne suis pas sûr que j'aurais réussi à garder le cap avec un autre directeur de thèse. J'ai toujours trouvé ta porte ouverte quand j'étais dans le besoin et tu as toujours été de très bon conseil, je t'en remercie. Merci également de m'avoir permis de m'épanouir dans l'enseignement et la médiation scientifique, notamment en m'invitant dans tes projets avec la Maison pour la science en Alsace. Cela m'a vraiment conforté dans l'idée de continuer à enseigner et à rendre la science accessible à tous. Enfin, merci pour toutes nos discussions toujours très enrichissantes, scientifiques ou non, de jour... comme de nuit.

Merci à David, d'avoir partagé ton expertise scientifique sur la vision, ainsi que pour tes conseils et ton aide qui ont permis à mes recherches de se dérouler au mieux. Merci également pour ton aide précieuse et l'expérience que tu as apportées pour l'écriture (je dirai même les réécritures) et la publication de l'article.

Merci à toute l'équipe rétine pour nos discussions, vos commentaires et vos conseils lors des réunions : Marie-Paule, David, Frank, Jorge, Virginie, Cristina, Amandine, Nadia, Nora, Noëmi, Guillaume, Fabiana, Ana, Schumet, Udit. Merci notamment à Viviane, pour toute l'aide et les conseils précieux que tu m'as prodigués sur la partie comportementale.

Merci à tout le personnel du Chronobiotron pour les soins procurés aux animaux et l'aide que j'ai toujours trouvé auprès de vous lors des manip : Nicolas, Olivier, Bruno, Sophie. Un grand merci à Dom, non seulement pour l'excellence technique que tu m'as constamment transmise dans la mise en place des protocoles, mais surtout pour ton soutien et toutes ces discussions entre deux portes qui ont su résoudre un nombre incalculable de problèmes.

Merci à Marie-Paule et Cristina, pour le travail monumental que vous avez réalisé pour la génération des souris mélatonine-proficientes. Merci à Marie-Paule, d'avoir toujours été à l'écoute et d'avoir toujours su trouver une solution dans la course à la mélatonine. Merci Cristina pour toutes les connaissances techniques et théoriques que tu as partagées avec moi en biologie moléculaire et pour ton soutien constant.

Merci à Chrystelle, pour tout le temps que tu m'as consacré lors des expériences en IRM, pour ta bonne humeur et ton optimisme, même quand rien ne marchait. Merci également pour l'aide et l'expertise que tu as apportées dans la rédaction de la thèse.



Merci à Paul, d'avoir partagé ton expertise en histologie, qui a été très enrichissante et m'a permis d'affronter tous mes problèmes techniques. Merci également de m'avoir initié à l'enseignement à la faculté.

Merci à Béatrice, d'avoir pris le temps de me former et pour ton aide dans la réalisation des dosages RIA.

Merci à tous les étudiants et ex-étudiants du 1<sup>er</sup> étage : Nora, Sébastien, Guigui, Noëmi, Clarisse, Zélie, Eleni, Fabiana, Hassan, Fernando, Marine... pour tous ces bons moments passés ensemble, pour votre bonne humeur et vos folies, qui rendent le quotidien au travail si agréable. Merci à Clarisse de m'avoir aidé sur toute la partie hybridation et notamment pour ton aide précieuse avec les souris mél-pro.

Merci à Nora et à Perrine, vous m'avez beaucoup manqué après votre départ. Merci à Perrine pour ta gentillesse, ta patience et pour m'avoir formé à toutes les techniques quand j'étais encore un petit master. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et le soutien que j'ai toujours trouvé auprès de toi. Le laboratoire n'est plus pareil sans toi. Merci à Nora, la meilleure collègue de bureau du monde. Pour nos repas de midi à 16h, à tirer au sort pour savoir ce qu'on aller bien pouvoir manger. Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour tous ces bons moments passés ensemble.

Un grand merci à Guigui, le meilleur compagnon de bureau au monde. Pour tous ces bons souvenirs dans notre palace qu'est la pièce 1316b, pour nos discussions et débats sans fin, ainsi que pour nos séances D&CO dans le bureau. Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur, mon côté juke-box et pour toutes les fois où tu m'as aidé quand c'était la catastrophe. Au roi des tableurs Excel, je te souhaite une pluie de  $p < 0.05$  pour le reste de ta thèse. Imotep.

Un grand merci à Noëmi, qui m'a supporté contre vents et marées pendant toute l'écriture de ma thèse. Merci pour toutes tes petites attentions, tes plats toujours au top et pour ton soutien indéfectible, qui m'ont remonté le moral et aidé à rester positif jusqu'au bout.

A ma famille et aux amis hors labo. Merci à mes parents, mon frère et Justine, qui ont toujours été présents et d'un grand soutien, tant dans les meilleurs moments que dans les moments les plus difficiles. Merci à cette bande de joyeux lurons et amis : Mathilde, Rodolphe, Maxime, Antoine et Gabriel d'être là, pour tous ces supers moments passés avec vous, qui m'ont redonné la pêche quand j'en avais besoin. Merci à Julien, de m'avoir accompagné de loin dans mes séances intensives d'écriture de nuit, pour nos pauses *geek* et nos discussions tardives sur tout et rien.

Merci à Alexandra Elbakyan, de permettre à la connaissance scientifique d'être accessible à tous.

# COMMUNICATIONS & PUBLICATIONS

---

## Communications (posters)

Leclercq B., Laurent V., Hicks D., (2016) Role of the retina in photoperiod integration in mammals. **XLV congrès de la Société francophone de Chronobiologie (SFC)** à Strasbourg.

Leclercq B., Laurent V., Hicks D., (2019) Photoperiod integration in C3H *rd1* mice implicates changes in melanopsin expressing retinal cells. **XVI European Biological Rhythms Society Congress (EBRS)** à Lyon.

## Communications (orales)

Leclercq B., (2017) Role of the retina in photoperiod integration in mammals. **Ecole d'été "Neurobiology of rhythms"** à Strasbourg.

Leclercq B., (2018) A blue Light history: From photons to our behaviour. **Ecole d'été « Light and Transmission »** en collaboration avec les Universités de Nagoya (Japon) et Freiburg (Allemagne).

## Publications

LECLERCQ B., LAURENT V., HICKS D. (2020), Photoperiod integration in C3H *rd1* mice. *Journal of Pineal Research*. doi: 10.1111/jpi.12711



# SOMMAIRE

---

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>6</b>
<b>COMMUNICATIONS &amp; PUBLICATIONS .....</b>	<b>8</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>18</b>
<b>I. Organisation, connectivité et fonction visuelle de la rétine .....</b>	<b>18</b>
1. Généralités sur l'œil et la rétine .....	18
2. La couche nucléaire externe (ONL) .....	19
a. Les bâtonnets et les cônes .....	19
b. La phototransduction .....	22
c. Connection avec l'épithélium pigmentaire rétinien.....	23
3. La couche nucléaire interne (INL).....	24
a. Cellules bipolaires.....	24
b. Cellules amacrines et horizontales .....	25
4. La couche des cellules ganglionnaires rétiniennes (GCL).....	25
5. Connexions neuroanatomiques et fonction visuelle .....	27
<b>II. Horloges biologiques circadiennes et intégration de la photopériode .....</b>	<b>28</b>
1. Généralités sur les rythmes biologiques et circadiens.....	28
2. De la machinerie moléculaire aux horloges circadiennes .....	28
3. Les Noyaux Suprachiasmatiques .....	30
a. Anatomie et fonctionnement des noyaux suprachiasmatiques .....	30
b. Afférences et efférences des SCN .....	32
4. Entraînement et photoentraînement des SCN : du circadien au zeitgeber .....	33
a. Notion de zeitgeber .....	33
b. Du temps circadien (CT) au temps du zeitgeber (ZT).....	33
c. Photoentraînement des SCN.....	34
5. Contrôle de la synthèse de la mélatonine par les SCN et la lumière .....	37
6. La mélatonine .....	38
a. Généralités et mécanismes de synthèse.....	38
b. Les récepteurs de la mélatonine : fonction et localisation .....	39
c. Rôle dans les rythmes saisonniers chez les rongeurs.....	41
7. D'autres horloges circadiennes .....	42
a. Notion d'horloges « esclaves », « semi-autonomes » et « autonomes » .....	42
b. L'horloge circadienne de la rétine .....	43
<b>III. Les Cellules Ganglionnaires Rétiniennes intrinsèquement photosensibles .....</b>	<b>44</b>
1. Découverte et généralités sur la mélanopsine et les ipRGCs.....	44
2. Caractéristiques anatomo-fonctionnelles et connectivités intra-rétiniennes des différents types d'ipRGCs chez la souris .....	47
a. Type M1.....	47

b. Types M2 et M3.....	48
c. Types M4 et M5.....	49
d. Type M6.....	50
3. Les types d'ipRGCs chez l'Homme et d'autres mammifères.....	52
4. Mécanisme de phototransduction au sein des ipRGCs.....	52
5. Régulation du fonctionnement des ipRGCs.....	54
a. Régulation par la lumière et par l'horloge circadienne de la rétine.....	54
b. Régulation par la dopamine et la mélatonine.....	55
6. Projections anatomiques et fonctions des différents types d'ipRGCs.....	56
a. Type M1.....	58
b. Type M2.....	59
c. Type M3.....	60
d. Type M4.....	60
e. Type M5.....	61
f. Type M6.....	61
7. Implication des bâtonnets et des cônes dans les fonctions non-visuelles.....	61
a. Contribution des bâtonnets/cônes au photoentraînement des SCN.....	61
b. Contribution des bâtonnets/cônes dans d'autres fonctions non-visuelles.....	62
8. IpRGCs et photopériode.....	63
<b>IV. Impact de la lumière artificielle enrichie en bleu sur la santé et le comportement .</b>	<b>65</b>
1. Généralités sur la lumière naturelle, artificielle et l'utilisation des écrans.....	65
2. Effet des LEDs et de la lumière bleue sur la vision.....	65
3. Effet des LEDs et de la lumière bleue sur le sommeil et les fonctions cognitives.....	67
4. Effet des LEDs et de la lumière bleue sur le comportement et l'humeur.....	69
a. Utilisation des écrans et troubles de l'humeur et du comportement.....	69
b. Comportement agressif/anxieux : Connectome et régulation circadienne.....	70
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>74</b>
<b>MATERIELS &amp; METHODES.....</b>	<b>76</b>
<b>I. Axe 1 : Rétine et photopériode .....</b>	<b>76</b>
1. Animaux et protocoles d'exposition.....	76
2. Contrôle de la vision par électrorétinogramme (ERG).....	77
3. Suivi de l'activité locomotrice par actimétrie.....	78
4. Mise à mort des animaux C3H <i>rd1</i> .....	78
5. Marquage par immunohistochimie de la mélanopsine sur rétine à plat.....	78
6. Acquisition au NanoZoomer et analyse du marquage des ipRGCs.....	79
a. Généralité sur le NanoZoomer.....	79
b. Comptage des ipRGCs et analyse de l'intensité de marquage.....	79
7. Dosage de la mélatonine dans la glande pinéale par RadiImmunoAssay (RIA).....	80
8. Enrobage des cerveaux au polyéthylène glycol (PEG) et coupes au microtome.....	80
9. Hybridation <i>in situ</i> (ISH) non-radioactive et analyse du marquage.....	81
10. Etude de l'expression de la mélanopsine dans la rétine.....	81
a. Extraction des ARNm.....	81
b. Protocole détaillé de la RT-qPCR.....	82

11. Genèse des souris C57BL/6 productrices de mélatonine et <i>Opn4</i> KO .....	83
a. <i>Génotypage pour les gènes Aanat et Hiomt</i> .....	83
b. <i>Mesure de la sécrétion de mélatonine chez les hétérozygotes</i> .....	84
c. <i>Génotypage pour le gène <i>Opn4</i> des souris C57BL/6 productrices de mélatonine</i> .....	85
<b>II. Axe 2 : impact de la lumière bleue sur le comportement .....</b>	<b>86</b>
1. Design expérimental et système d'éclairage.....	86
a. <i>Protocole d'exposition avec néons (2017-2018)</i> .....	86
b. <i>Protocole d'exposition avec rubans LEDs (2020)</i> .....	87
2. Injections intraoculaires chez les animaux C3H <i>rd1</i> .....	89
a. <i>Préparation des produits injectables</i> .....	89
b. <i>Protocole d'injection intravitréen</i> .....	89
3. Tests comportementaux et analyses.....	89
a. <i>Principe du test résident/intrus</i> .....	90
b. <i>Principe du test de la boîte éclairée/sombre</i> .....	90
4. Traitement des données d'actimétrie pour les protocoles néons et LEDs .....	91
5. Protocoles d'expositions aiguës aux néons/LEDs et mise à mort .....	92
a. <i>Protocoles d'expositions aiguës</i> .....	92
b. <i>Récupération des tissus</i> .....	92
6. Immunohistochimie .....	92
a. <i>Coupes de cerveau et marquages de la protéine C-FOS</i> .....	92
b. <i>Marquage sur coupes transversales de rétine</i> .....	94
c. <i>Acquisition et analyse des marquages immunohistochimiques C-FOS et OPN4</i> .....	95
7. Génotypage des souris MAOA KO .....	100
8. IRMf chez le petit animal.....	101
a. <i>Préparation et anesthésie</i> .....	101
b. <i>Matériel et paramètres d'acquisition</i> .....	102
c. <i>Paradigmes</i> .....	102
d. <i>Traitements des images</i> .....	102
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>104</b>
<b>I. Axe 1 : Rétine &amp; photopériode.....</b>	<b>104</b>
1. Article 1 : Étude de l'intégration de la photopériode chez les souris C3H <i>rd1</i> .....	104
2. Données préliminaires sur les souris C57BL/6 productrices de mélatonine.....	130
a. <i>Production de mélatonine et homozygotie pour l'AANAT et l'HIOMT</i> .....	130
b. <i>Les animaux C57 croisés CBA présentent un ERG normal</i> .....	131
<b>II. Axe 2 : Impact de la lumière bleue sur le comportement .....</b>	<b>133</b>
1. Protocole d'exposition avec néons (2017-2018).....	133
a. <i>Validation du modèle monoamine oxydase KO</i> .....	133
b. <i>Protocole d'exposition avec néons (2017-2018)</i> .....	135
2. Protocole d'exposition avec Ruban LEDs (2020) .....	143
a. <i>Les souris C3H <i>rd1</i> n'ont plus d'activité visuelle</i> .....	143
b. <i>L'enrichissement en bleu entraîne peu de modification de l'activité locomotrice</i> .....	144
c. <i>Modification des comportements de type anxieux/agressif selon l'exposition</i> .....	147
d. <i>Immunohistochimie chez les animaux C3H <i>rd1</i> exposés aux LEDs</i> .....	149
3. IRMf chez le petit animal.....	156

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>158</b>
<b>I. Les ipRGCs, actrices de l'intégration de la photopériode chez les souris C3H <i>rd1</i>...</b>	<b>158</b>
1. Intégration de la photopériode par la rétine .....	158
2. Modifications de l'activité locomotrice photopériode-dépendante.....	161
3. Intégration centrale de la photopériode : de la mélatonine à la TSH .....	162
4. Perspectives de l'axe 1 .....	165
<b>II. Un enrichissement en lumière bleue induit des modifications comportementales</b>	<b>166</b>
1. Modification du comportement et du connectome de l'agressivité par la lumière .....	166
2. L'enrichissement en lumière bleue ne semble pas affecter la locomotion .....	173
3. Perspectives de l'axe 2 .....	176
<b>III. Conclusion.....</b>	<b>178</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>180</b>

## ABRÉVIATIONS

	<b>Appellation anglaise</b>	<b>Appellation française</b>
<b>AA</b>	<i>Anterior amygdala</i>	Amygdale antérieure
<b>AANAT</b>	<i>Araalkylamine N-acetyltransferase</i>	Arylalkylamine N-acétyltransferase
<b>ACs</b>	<i>Amacrine cells</i>	Cellules amacrines
<b>AMPA</b>	<i>α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate receptor</i>	Récepteur au α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
<b>APT</b>	<i>Anterior pretectal nucleus</i>	Noyau prétectal antérieur
<b>ARC</b>	<i>Arcuate nucleus</i>	Noyau arqué
<b>AVP</b>	<i>Arginine vasopressin</i>	Arginine-vasopressine
<b>BCs</b>	<i>Bipolar cells</i>	Cellules bipolaires
<b>BMAL1</b>	<i>Brain and muscle arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNTL)-like 1</i>	
<b>BMA</b>	<i>Basomedial amygdala</i>	Noyau basomédian de l'amygdale
<b>BNST</b>	<i>Bed nucleus of the stria terminalis</i>	Noyau du lit de la strie terminale
<b>BRN3</b>	<i>Brain-specific homeobox 3</i>	
<b>CDH3</b>	<i>Cadherin-3</i>	Cadhérine-3
<b>CeA</b>	<i>Central amygdala</i>	Amygdale centrale
<b>CL</b>	<i>Thalamic centrolateral nucleus</i>	Noyau centro-latéral thalamique
<b>CLOCK</b>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>	
<b>CM</b>	<i>Thalamic centomedian nucleus</i>	Noyau centro-médian thalamique
<b>CNG</b>	<i>Cyclic nucleotide gated channel</i>	Canaux cationiques nucléotides cycliques dépendants
<b>CRE</b>	<i>Calcium/cAMP Response Element sequence</i>	
<b>CREB</b>	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>	
<b>Cry</b>	<i>Cryptochrome</i>	
<b>CT</b>	<i>Circadian time</i>	Temps circadien
<b>CTB</b>	<i>Cholera toxin B subunit</i>	Sous-unité B de la toxine cholérique
<b>DAB</b>		3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride
<b>DAG</b>	<i>Diacylglycerol</i>	Diacylglycérol
<b>DD</b>	<i>Dark/dark</i>	Obscurité constante
<b>DIO2</b>	<i>Deiodinase 2</i>	Désiodinase 2
<b>dLGN</b>	<i>Lateral geniculate nucleus (dorsal)</i>	Noyau géniculé latéral dorsal
<b>DMH</b>	<i>Dorsomedial hypothalamus</i>	Hypothalamus dorso-médian
<b>DRN</b>	<i>Dorsal raphe nucleus</i>	Noyau dorsale du Raphé
<b>ERG</b>	<i>Electroretinogram</i>	Electrorétinogramme
<b>G<sub>(i)</sub></b>	<i>Inhibitory G Protein</i>	Protéine G inhibitrice
<b>G<sub>(s)</sub></b>	<i>Stimulatory G protein</i>	Protéine G stimulatrice
<b>GABA</b>	<i>γ-aminobutyric acid</i>	acide γ-aminobutyrique
<b>GCL</b>	<i>Ganglion cells layer</i>	Couche des cellules ganglionnaires
<b>GFP</b>	<i>Green-fluorescent protein</i>	
<b>GHT</b>	<i>Geniculohypothalamic Tract</i>	Tractus géniculohypothalamique
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires



<b>GRP</b>	<i>Gastrin release peptide</i>	
<b>HCN</b>	<i>Hyperpolarisation-activated cyclic-nucleotid modulated cation non-selective channel</i>	Canaux activés par l'hyperpolarisation, modulés par des NMPc et non sélectif aux cations
<b>HCS</b>	<i>Horizontal cells</i>	Cellules horizontales
<b>HIOMT / ASMT</b>	<i>Hydroxyindole-O-methyltransferase / Acetylserotonin O-Methyltransferase</i>	Hydroxyindole-O-méthyltransferase ou N-Acetylsérotonine O-méthyltransferase
<b>IF</b>	<i>Image forming function</i>	Fonction de formation d'images
<b>IGL</b>	<i>Intergeniculate leaflet</i>	Feuillet intergénéculé
<b>IML</b>	<i>Intermediolateral nucleus of the spinal cord</i>	Colonnes intermédiolatérales de la moelle épinière
<b>INL</b>	<i>Inner nuclear layer</i>	Couche nucléaire interne
<b>IP<sub>3</sub></b>	<i>Inositol triphosphate</i>	Inositol triphosphate
<b>ipRGCs</b>	<i>Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells</i>	Cellules ganglionnaires rétiniennes intrinsèquement photosensibles
<b>IRMf</b>	<i>functional magnetic resonance imaging</i>	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>	Invalidation génétique
<b>LD</b>	<i>Light/dark</i>	Lumière obscurité
<b>LEDs</b>	<i>Light-emitting diodes</i>	Diodes électroluminescentes
<b>LH</b>	<i>Lateral hypothalamus</i>	Hypothalamus latéral
<b>LHb</b>	<i>Lateral habenula</i>	Habénula latérale
<b>LL</b>	<i>Light/light</i>	Lumière constance
<b>LP</b>	<i>Long photoperiod</i>	Photopériode longue
<b>LPO</b>	<i>Lateral preoptic area</i>	Aire préoptique latérale
<b>LS</b>	<i>Lateral septum</i>	Septum latéral
<b>MAOA</b>	<i>Monoamine oxidase A</i>	Monoamine oxydase A
<b>MeA</b>	<i>Medial amygdala</i>	Amygdale médiane
<b>mgluR</b>	<i>Metabotropic glutamate receptor</i>	Récepteur métabotrope glutamatergique
<b>MPO</b>	<i>Medial preoptic area</i>	Aire préoptique médiane
<b>MPT</b>	<i>Medial pretectal nucleus</i>	Noyau prétectal médial
<b>MT1,2,3</b>	<i>Melatonin receptor</i>	Récepteur de la mélatonine
<b>NAc</b>	<i>Accumbens nucleus</i>	Noyau accumbens
<b>NIF</b>	<i>Non-image forming function</i>	Fonction sans formation d'images
<b>NMDA</b>	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>	Récepteur à acide N-méthyl-D-aspartique
<b>NOT</b>	<i>Nucleus of the optic tract</i>	Noyau du tractus optique
<b>NPY</b>	<i>Neuropeptide Y</i>	Neuropeptide Y
<b>NQO2</b>	<i>Quinone reductase 2</i>	Quinone réductase 2
<b>ONL</b>	<i>Outer nuclear layer</i>	Couche nucléaire externe
<b>OPN4</b>	<i>Melanopsin</i>	Mélanopsine
<b>OPN5</b>	<i>Neurospin</i>	Neurospine
<b>OPT</b>	<i>Olivary pretectal nucleus</i>	Noyau olivaire prétectal
<b>PACAP</b>	<i>Pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide</i>	
<b>PAG</b>	<i>Periaqueductal gray</i>	Substance grise périaqueducule
<b>PB(S)</b>	<i>Phosphate buffer (saline)</i>	Tampon phosphate (salin)
<b>PDE</b>	<i>Phosphodiesterase</i>	Phosphodiesterase

<b>PEG</b>	<i>PolyEthylene Glycol</i>	Polyéthylène glycol
<b>Per</b>	<i>Period</i>	
<b>PFA</b>	<i>Paraformaldehyde</i>	Paraformaldéhyde
<b>PFC</b>	<i>Prefrontal cortex</i>	Cortex préfrontal
<b>PHb</b>	<i>Perihabenular nucleus</i>	Noyau perihabénulaire
<b>PIP<sub>2</sub></b>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
<b>PIPR</b>	<i>Post-illumination Pupil Response</i>	Réponse pupillaire post-illumination
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i>	
<b>PLR</b>	<i>Pupillary light reflex</i>	Reflex pupillaire
<b>PPT</b>	<i>Posterior pretectal nucleus</i>	Noyau prétectal postérieur
<b>PRC</b>	<i>Phase response curve</i>	Courbe de réponse de phase
<b>pSON</b>	<i>Supraoptic nucleus</i>	Noyaux supraoptiques
<b>PT</b>	<i>Pars tuberalis</i>	Pars tuberalis
<b>PVN</b>	<i>Hypothalamic paraventricular nucleus</i>	Noyau paraventriculaire hypothalamique
<b>PVT</b>	<i>Paraventricular thalamic nucleus</i>	Noyau paraventriculaire thalamique
<b>RCh</b>	<i>Retrochiasmatic nucleus</i>	Noyaux retrochiasmatiques
<b>rd1</b>	<i>Retinal degeneration 1</i>	
<b>REM</b>	<i>Rapid eye movement sleep</i>	Sommeil à mouvements oculaires rapides
<b>Rev-erb</b>	<i>Reverse viral erythroblastis oncogene product</i>	
<b>RGCs</b>	<i>Retinal ganglion cells</i>	Cellules ganglionnaires rétiniennes
<b>Ror</b>	<i>Retinoid-related orphan receptors</i>	
<b>RPE</b>	<i>Retinal pigment epithelium</i>	Épithélium pigmentaire rétinien
<b>SAD</b>	<i>Seasonal affective disorder</i>	Trouble affectif saisonnier
<b>SC</b>	<i>Superior colliculi</i>	Colliculi supérieurs
<b>SCG</b>	<i>Superior cervical ganglion</i>	Ganglions cervicaux supérieurs
<b>SCN</b>	<i>Suprachiasmatic nuclei</i>	Noyaux suprachiasmatiques
<b>SP</b>	<i>Short photoperiod</i>	Photopériode courte
<b>SPZ</b>	<i>Subparaventricular zone</i>	Zone subparaventriculaire
<b>T3</b>	<i>Triiodothyronine</i>	Triiodothyronine
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffer saline</i>	Tampon tris-salin
<b>TRPC</b>	<i>Transient receptor potential cation</i>	Canaux perméables aux cations
<b>TSA</b>	<i>Tyramide signal amplification</i>	Amplification de signe de tyramide
<b>TSH</b>	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>	Thyréostimuline
<b>UV</b>	<i>Ultraviolet</i>	Ultraviolet
<b>VIP</b>	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>	Peptide vasoactive intestinal
<b>vLGN</b>	<i>Lateral geniculate nucleus (ventral)</i>	Noyau géniculé latéral ventral
<b>VLPO</b>	<i>Ventrolateral preoptic area</i>	Aire préoptique ventrolatérale
<b>VMH</b>	<i>Ventromedial hypothalamus</i>	Hypothalamus ventromédian
<b>VOCC</b>	<i>Voltage-operated calcium channel</i>	Canaux calcique voltage-opérant
<b>WT</b>	<i>Wild-type</i>	Type sauvage
<b>ZI</b>	<i>Zona incerta</i>	Zona incerta
<b>ZT</b>	<i>Zeitgeber time</i>	Temps du zeitgeber



# INTRODUCTION

---

## Préface : la lumière et le vivant

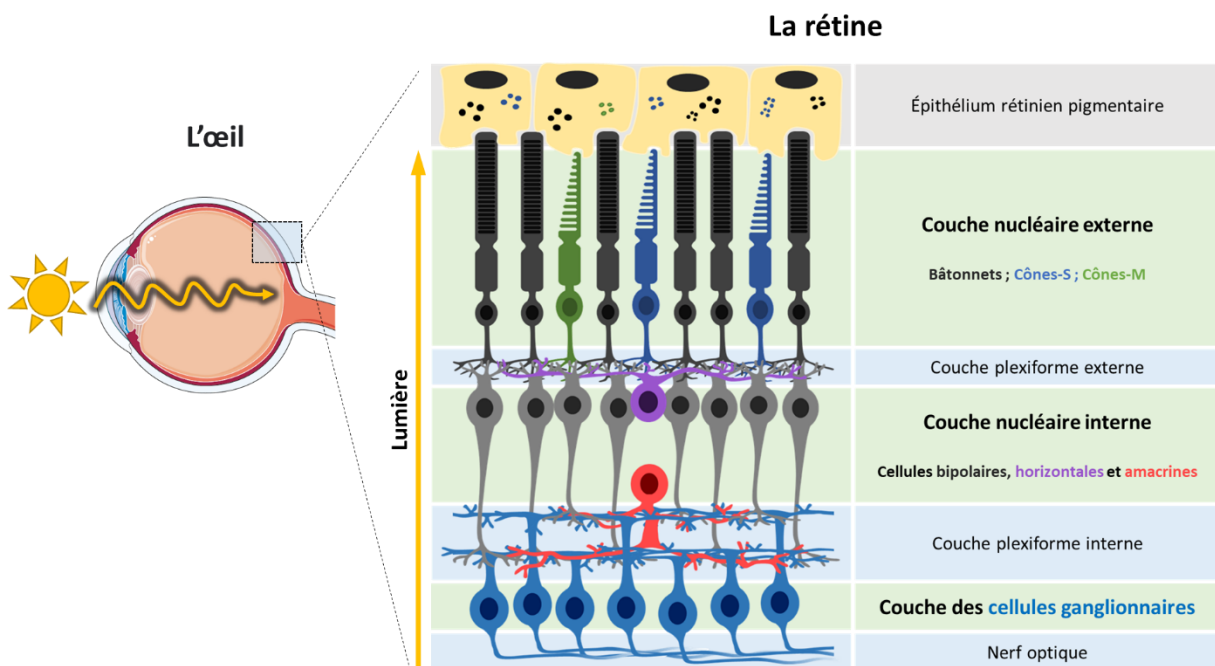
Parmi les sources d'énergie les plus utilisées par les êtres vivants pour assurer leur survie, la lumière constitue une des plus importantes d'entre elles. La photosynthèse anoxygénique est apparue peu après la méthanogenèse il y a plus de 3,8 milliards d'années et démontre que l'interaction entre les organismes et la lumière est presque aussi ancienne que le vivant lui-même. L'énergie portée par les ondes électromagnétiques a été rapidement exploitée par les êtres vivants avec l'apparition de pigments photosynthétiques, comme la chlorophylle, capables de convertir la lumière en énergie biochimique. Aujourd'hui, la majeure partie des chaînes trophiques repose sur des organismes capables de générer de la matière organique à partir de l'énergie lumineuse. Au cours de l'évolution, les liens entre lumière et processus du vivant se sont encore renforcés avec l'émergence et la diversification des opsines, des protéines photosensibles. Les opsines de type I sont retrouvées majoritairement chez les procaryotes (archées, eubactéries) et eucaryotes unicellulaires (certaines algues vertes et champignons) et assurent des fonctions de phototaxie ou de conversion de l'énergie lumineuse en énergie métabolique. Les opsines de type II, retrouvées chez les animaux, sont généralement regroupées dans des structures spécialisées (œil, ommatidie, etc.) où elles sont notamment impliquées dans les fonctions visuelles (**chapitre I**). D'autre part, la rotation de la terre sur elle-même et autour du soleil confère à la lumière une composante rythmique à l'échelle de la journée (jour/nuit) et à l'échelle de l'année (variation de la durée du jour, appelée photopériode). La lumière étant à ce titre un excellent indicateur des variations environnementales à l'échelle de la journée et des saisons (température, ressource énergétique, ...), cette rythmicité est à l'origine de l'émergence des horloges biologiques et des rythmes biologiques (**chapitre II**). Ainsi, la lumière occupe une place centrale dans la régulation de nombreuses fonctions comme le rythme d'activité veille/sommeil, la prise alimentaire, la reproduction saisonnière et même l'humeur. On parle alors de « fonctions non-visuelles » de la lumière (**chapitre III**). Chez les mammifères, Les structures assurant les fonctions visuelles (fonction de formation d'images (IF)) et les fonctions non-visuelles (fonction sans formation d'images (NIF)) de la lumière se superposent au sein de la rétine.

## I. Organisation, connectivité et fonction visuelle de la rétine

### 1. Généralités sur l'œil et la rétine

L'œil est un organe qui permet la vision chez les animaux, avec 96% des espèces animales qui possèdent un système optique qualifié de « compétent » : la forme de l'œil permet une détection de la lumière par les photorécepteurs selon des angles précis, augmentant considérablement la résolution ([Land and Fernald, 1992](#)). Alors que les systèmes de

photoréception les plus basiques ont surtout une fonction d'orientation selon la lumière du soleil, l'œil assure la formation d'images chez les mollusques, les arthropodes et également les chordés. Chez les vertébrés, le flux lumineux entrant dans l'œil est régulé par le diaphragme, la lumière passe à travers la lentille, ce qui permet le focus du flux lumineux sur la rétine. La rétine constitue la structure de photoréception et permet la détection et le traitement de l'information lumineuse avant sa transmission vers le cerveau par le nerf optique. Nous allons nous concentrer ici sur la rétine des mammifères, majoritairement celle de la souris, en comparant avec les données connues chez l'Homme. La rétine est organisée en trois couches nucléaires : La couche nucléaire externe (ONL), la couche nucléaire interne (INL) et la couche des cellules ganglionnaires (GCL).



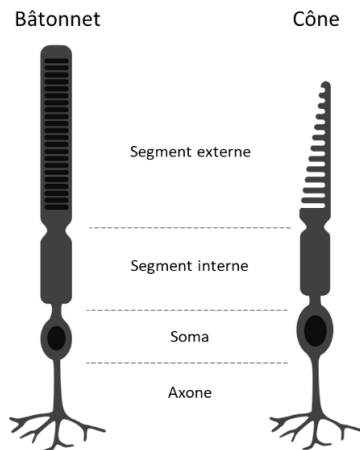
**Figure 1 : Représentation schématique de l'œil et des différentes couches de la rétine en coupe transversale.** La lumière entrant dans l'œil arrive jusqu'à la rétine, divisée en différentes couches nucléaires (en vert) : la couche nucléaire externe contenant les photorécepteurs, la couche nucléaire interne et la couche des cellules ganglionnaires. Les couches plexiformes externes et internes constituent des zones de contact synaptique. Le nerf optique est constitué par les axones des cellules ganglionnaires, qui transmettent l'information au cerveau. Le schéma de la coupe transversale de l'œil a été modifié d'après *Servier medical ART*.

## 2. La couche nucléaire externe (ONL)

### a. Les bâtonnets et les cônes

La couche nucléaire externe aussi appelée la couche des photorécepteurs, est constituée par les cônes et les bâtonnets. Ces deux types cellulaires assurent la fonction visuelle et possèdent une organisation commune (**figure 2**) : un segment externe où se situent les disques empilés contenant les protéines photoréceptrices, un segment interne où se trouve le noyau, puis la

terminaison synaptique au contact de la couche nucléaire interne. Une différence notable est que la membrane des disques des bâtonnets est indépendante de la membrane plasmique, alors que la membrane des disques des cônes est en continuité avec la membrane plasmique et est formée par des invaginations de celle-ci (Carter-Dawson and LaVail, 1979). D'un point de vue fonctionnel, ces deux types cellulaires assurent des fonctions visuelles distinctes.



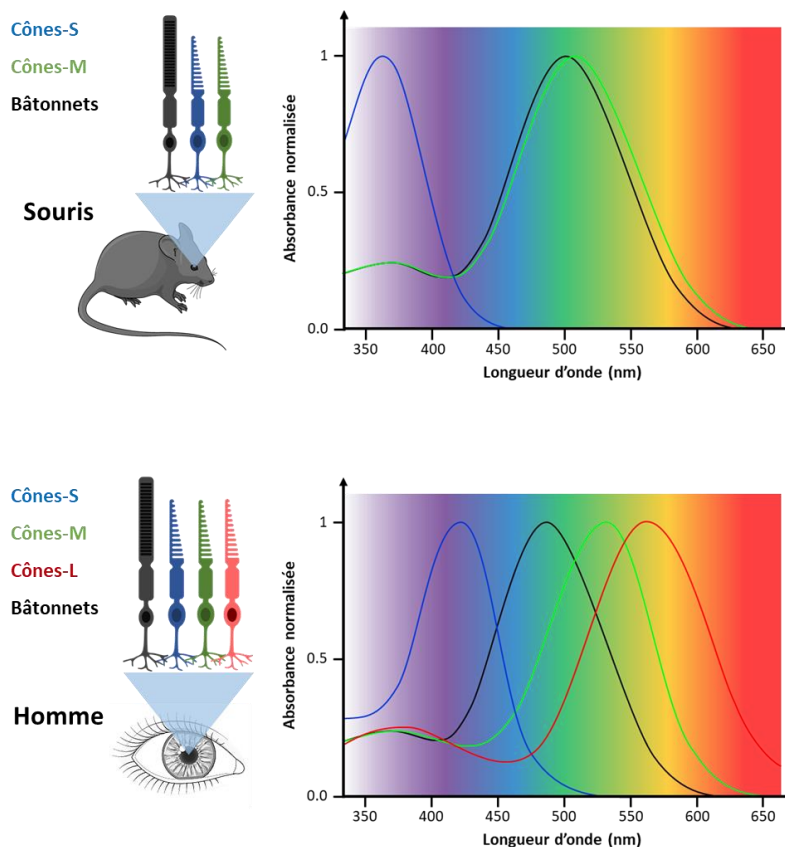
**Figure 2 : Schéma d'un bâtonnet et d'un cône.** Les deux photorécepteurs partagent une organisation similaire avant un segment externe (contenant les disques photorécepteurs), un segment interne, le soma puis l'axone qui va faire synapse avec la couche nucléaire interne

Les bâtonnets sont 100 fois plus photosensibles que les cônes. Ils peuvent répondre à la stimulation d'un seul photon/ $\mu\text{m}^{-2}$  et saturer à des stimulations supérieures à  $10^3$  photons/ $\mu\text{m}^{-2}$  (Ingram et al., 2016). Ils expriment un photopigment spécifique qui est la rhodopsine, les rendant particulièrement photosensibles aux longueurs d'ondes autour de 495nm (figure 3). Cette photosensibilité des bâtonnets bien supérieure à celle des cônes s'expliquerait à deux niveaux : d'une part, les bâtonnets possèdent un segment externe d'un volume 2,5 fois plus importante que les cônes, ce qui augmente considérablement la probabilité de capture d'un photon. D'autre part, les isoformes des protéines impliquées dans la voie de phototransduction des bâtonnets permettraient un gain de sensibilité considérable comparé aux cônes pour le même signal photique (Ingram et al., 2016). La photosensibilité accrue des bâtonnets permet la vision à très faible intensité lumineuse, appelée vision « scotopique » (vision nocturne). Ces cellules jouent également un rôle dans la perception du mouvement et des contrastes.

Les cônes commencent à répondre à une intensité de  $10^2$  photons/ $\mu\text{m}^{-2}$  et saturer à une intensité de  $10^6$  photons/ $\mu\text{m}^{-2}$  (Ingram et al., 2016). Ces cellules sont ainsi impliquées dans la vision « photopique » (vision de jour) et expriment un type spécifique d'opsines appelées photopsines. Ainsi, il existe 2 types de cônes chez les souris en fonction de l'opsine (photopsine) qu'ils expriment (figure 3) : les cônes-M (aussi appelés cônes « verts ») expriment l'opsine-M qui rend ces cellules particulièrement photosensibles aux longueurs d'onde autour de 508nm. Les cônes-S (aussi appelés cônes « UV ») expriment l'opsine-S sensible aux longueurs d'onde autour de 360nm, permettant aux souris de voir dans les ultraviolets (UV) (Jacobs and Williams, 2007). Cette propriété permet aux cônes de détecter différentes longueurs d'ondes et sont donc à la base de la perception des couleurs. Chez l'Homme, les cônes-S (appelés cônes « bleus ») répondent aux longueurs d'onde autour de

437nm et ne sont donc pas sensibles aux UV. Par ailleurs, l'Homme possède un type supplémentaire de cônes : les cônes-L (aussi appelés cônes « rouges ») exprimant l'opsine-L, qui sont photosensibles aux longueurs d'onde autour de 580nm. N'exprimant pas ce type de photopsine, les souris ne sont donc pas capables de percevoir la lumière « rouge » ( $\lambda > 580\text{nm}$ ).

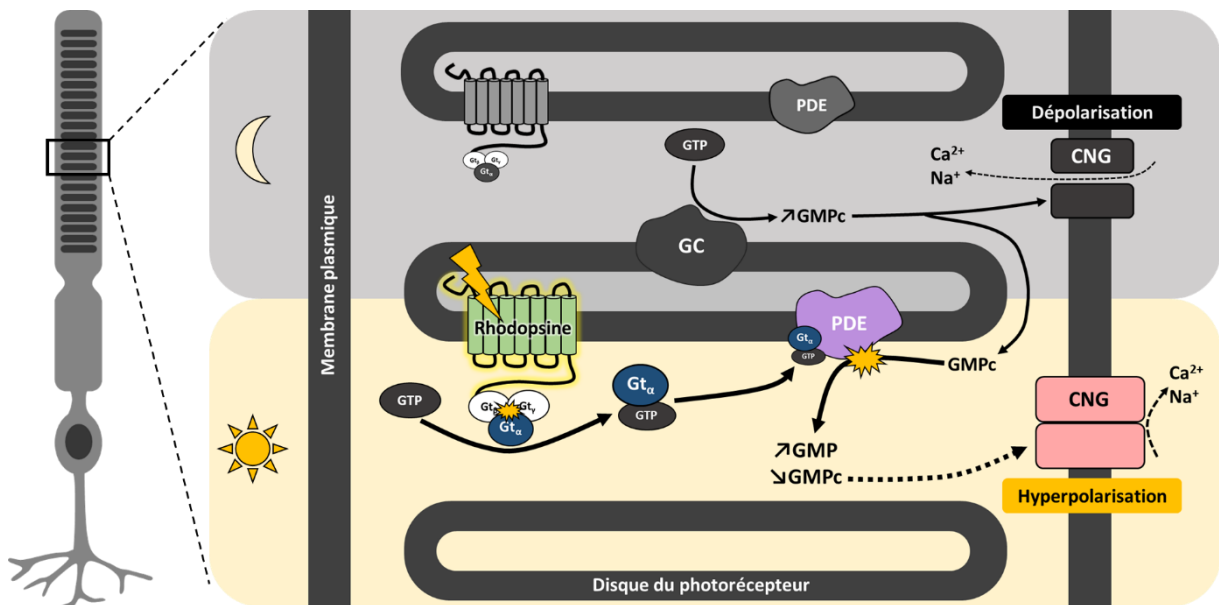
En termes de proportion, on dénombre 97,2% de bâtonnets (environ 6,4 millions) pour 2,8% de cônes (environ 180 000) chez la souris (Jeon et al., 1998). En comparaison, la rétine chez l'Homme compte environ 95% de bâtonnets (120 millions) pour 5% de cônes (6-7 millions). En termes d'organisation, les cônes sont répartis sur l'ensemble de la rétine chez les souris, avec une densité plus élevée sur la rétine inférieure et nasale que sur la rétine supérieure et temporale. Chez l'Homme, les cônes sont concentrés dans la partie centrale de la macula, appelée la fovéa, une zone se trouvant au centre de la rétine dans l'axe de la pupille, qui garantit un maximum d'acuité visuelle (Ortiñ-Martínez et al., 2014).



**Figure 3 : Sensibilités spectrales des cônes et des bâtonnets chez l'Homme et la souris.** La souris possède des cônes-S sensibles aux UV et des cônes-M sensibles aux longueurs d'onde correspondant à la couleur verte. Leurs bâtonnets présentent une sensibilité spectrale très similaire aux cônes-M. Chez l'Homme, les sensibilités spectrales des cônes-M et des bâtonnets sont bien différenciées. Par ailleurs, les cônes-S ont une sensibilité plus accrue dans les longueurs d'onde correspondant à la couleur bleue (contrairement à la souris) et les cônes-L sont plus sensibles aux longueurs d'onde correspondant à la couleur orange/rouge. Spectres dessinés selon (Thoreson and Dacey, 2019). Schémas de la souris et de l'œil humain modifiés d'après *Servier medical ART*.

## b. La phototransduction

La phototransduction est le phénomène par lequel un flux photique est converti en signal nerveux ou électrochimique (**figure 4**) (Fu and Yau, 2007). Cette conversion est possible grâce aux opsines : ces protéines possèdent une spécificité d'absorption (en termes de longueur d'onde) et sont couplées au rétinale (un chromophore permettant l'absorption du rayonnement). Ce complexe opsine-chromophore (photorécepteur) est couplé à une protéine G. Ainsi, la stimulation lumineuse provoque un changement de conformation du chromophore, qui passe de la forme *11-cis* rétinale à *all-trans* rétinale. Ce changement de conformation entraîne le passage de la rhodopsine à la forme métarhodopsine II qui active la protéine G appelée transducine (Gt) (Hargrave et al., 1993). La sous-unité  $\alpha$  de la transducine ( $Gt_{\alpha}$ ) se lie alors à une molécule de GTP qui entraîne sa libération et permet l'activation de l'enzyme phosphodiesterase (PDE6), qui hydrolyse les molécules de GMPc en GMP (Chen et al., 2008). L'activité de la phosphodiesterase entraîne une baisse de la concentration intracellulaire de GMPc et donc la fermeture de canaux cationiques nucléotides cycliques dépendants (CNG) (ici le GMPc) perméable aux sodium ( $Na^{+}$ ) et au calcium ( $Ca^{2+}$ ). Ceci a pour effet de provoquer une hyperpolarisation de la membrane des cônes et des bâtonnets par diminution des concentrations intracellulaires en cation.



**Figure 4 : Voie de signalisation de la phototransduction dans un bâtonnet.** En l'absence de lumière (zone grise), la guanylate cyclase (GC) produit du GMPc à partir de GTP, qui permet l'ouverture des canaux CNG et la dépolarisation du photorécepteur. L'arrivée de la lumière (zone claire) stimule la rhodopsine (en vert), qui active en réponse la transducine (Gt). La sous-unité  $\alpha$  de la transducine ( $Gt_{\alpha}$ ) se libère en se liant à une molécule de GTP et active la phosphodiesterase (PDE). Celle-ci hydrolyse alors les molécules de GMPc en GMP, ce qui a pour conséquence de fermer les canaux CNG sensibles à la concentration intracellulaire de GMPc. La fermeture de ces canaux empêche l'entrée des ions  $Na^{+}/Ca^{2+}$  entraînant l'hyperpolarisation du photorécepteur. Selon (Leskov et al., 2000).



A la fin de la stimulation lumineuse, les concentrations basses de  $\text{Ca}^{2+}$  provoquent l'activation de l'enzyme Guanylate Cyclase, qui transforme le GTP en GMPc et permet ainsi la réouverture des CNG perméables au  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  provoquant la dépolarisation de la membrane des cellules. En parallèle, la désactivation de la rhodopsine s'opère *via* un processus de phosphorylation, qui permet la liaison d'une protéine de la famille des arrestines, provoquant la libération du *all-trans* rétinol de la métarhodopsine II (Sommer et al., 2005).

Ainsi, en l'absence de lumière, la membrane des cônes et des bâtonnets est constamment dépolarisée, entraînant la libération de glutamate sur les cellules bipolaires (BCs) dans la couche interne de la rétine. Lors d'une stimulation lumineuse, la phototransduction entraîne l'hyperpolarisation de la membrane et l'arrêt de la libération de glutamate. A la suite de la phototransduction, le *all-trans* rétinol est recyclé en *11-cis* rétinol (par l'intermédiaire d'une isomérase) pour permettre une nouvelle réponse du photopigment. Ce mécanisme de recyclage est assuré à la fois par l'épithélium rétinien pigmentaire (RPE) (pour les bâtonnets et cônes) mais également par des cellules gliales de la rétine appelées cellules de Müller (seulement pour les cônes) (Yau and Hardie, 2009).

### c. Connection avec l'épithélium pigmentaire rétinien

Après la phototransduction, le *all-trans* rétinol est renouvelé pour permettre un nouveau cycle de phototransduction. Ainsi, le RPE (voir figure 1) joue un rôle essentiel dans le cycle visuel en réapprovisionnant les photorécepteurs en *11-cis* rétinol, par conversion du *all-trans* rétinol par une rétinol isomérase (RPE65) (Yau and Hardie, 2009), mais également en phagocytant les disques des photorécepteurs à l'extrémité du segment externe pour permettre leur renouvellement à la base du segment externe. Les photorécepteurs voient leurs disques constamment renouvelés à la manière d'un tapis roulant, où les anciens disques sont phagocytés par les cellules de l'épithélium (Young, 1967). Ces mécanismes de recyclage du rétinol et de phagocytose par le RPE permet aux photorécepteurs de renouveler rapidement leurs photopigments (après chaque stimulation) mais aussi de réduire considérablement le stress photo-oxydatif provoqué par de très longues périodes de stimulation. Par ailleurs, le RPE joue de nombreux autres rôles pour assurer la fonction visuelle : Sa richesse en pigment permet l'absorption de l'excès de lumière non captée par les photorécepteurs ce qui améliore considérablement le traitement de l'information lumineuse. Il compose également la barrière hématorétinienne, assurant un rôle dans le transport de nutriments et d'ions pour le bon fonctionnement de la rétine et joue un rôle dans le contrôle immunitaire (Strauss, 2005).

### 3. La couche nucléaire interne (INL)

#### a. Cellules bipolaires

Les BCs tiennent leur nom de leur anatomie particulière : un soma central duquel partent deux prolongements dont un vers la couche externe de la rétine où les BCs font synapses avec les photorécepteurs, l'autre vers la couche des cellules ganglionnaires (**figure 1**). Les BCs jouent un rôle très important dans le traitement de l'information visuelle, en isolant les informations selon leur provenance (bâtonnets ou cônes) mais aussi en associant une réponse ON (activation) ou une réponse OFF (inhibition) à la stimulation des photorécepteurs ([Ichinose and Hellmer, 2016](#)). Ainsi, il existe des BCs de bâtonnets (connectées aux bâtonnets) et des BCs de cônes (connectées aux cônes).

Parmi les BCs de cônes, il existe des BCs ON (qui dépolarisent lors d'une stimulation lumineuse) et des BCs OFF (qui hyperpolarisent lors d'une stimulation lumineuse). Comme une stimulation lumineuse induit une hyperpolarisation des cônes et donc un arrêt de la libération de glutamate dans les synapses cônes-BCs, cette dualité ON/OFF n'est possible que grâce à l'expression de deux types de récepteurs au glutamate : Les BCs ON de cônes expriment le récepteur métabotrope mGluR6 couplé aux protéines G ( $G\alpha_i$ ) ([Tian and Kammermeier, 2006](#)) qui induit une hyperpolarisation en présence de glutamate. La stimulation lumineuse induit donc une dépolarisation des BCs ON de cônes *via* l'arrêt de la libération du glutamate par les photorécepteurs. A l'inverse, les BCs OFF de cônes expriment des récepteurs ionotropes au glutamate (AMPA et Kainate) ([Ichinose and Hellmer, 2016](#)) qui induisent une dépolarisation en présence du glutamate. La stimulation lumineuse induit donc une hyperpolarisation des BCs OFF de cônes *via* l'arrêt de la libération du glutamate par les photorécepteurs.

Il n'existe qu'un seul type de BCs de bâtonnets ([Dacheux and Raviola, 1986](#)). Ces BCs de bâtonnets expriment le récepteur mGluR6 et sont donc toujours ON. La différenciation ON-OFF de l'activation des bâtonnets se fait par l'intermédiaire d'une cellule amacrine glycinergique (AC) de type II (**figure 5**) ([Graydon et al., 2018](#)) : L'activation de la BC de bâtonnets entraîne la dépolarisation de l'AC ce qui provoque la dépolarisation d'une BC ON de cônes *via* des jonctions GAP. Par ailleurs, la dépolarisation de la cellule amacrine induit la libération de glycine (transmission inhibitrice) à la synapse de la cellule amacrine avec une BC OFF de cônes. Pour résumer, la stimulation lumineuse d'un bâtonnet induit, *via* ce type de cellule amacrine, à la fois l'activation des BCs ON de cônes (*via* des jonctions GAP) et l'inhibition des BCs OFF de cônes (*via* des synapses glycinergiques). Enfin, les circuits de signalisation des BCs ON/OFF peuvent également interagir plus directement par un couplage des deux types de photorécepteurs *via* des jonctions GAP, notamment pendant la nuit ([Tsukamoto et al., 2001](#)). Ce traitement parallèle des signaux bâtonnets/cônes en signal ON/OFF, sera intégré par les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGCs) et contribue à l'élaboration de l'information visuelle.

## **b. Cellules amacrines et horizontales**

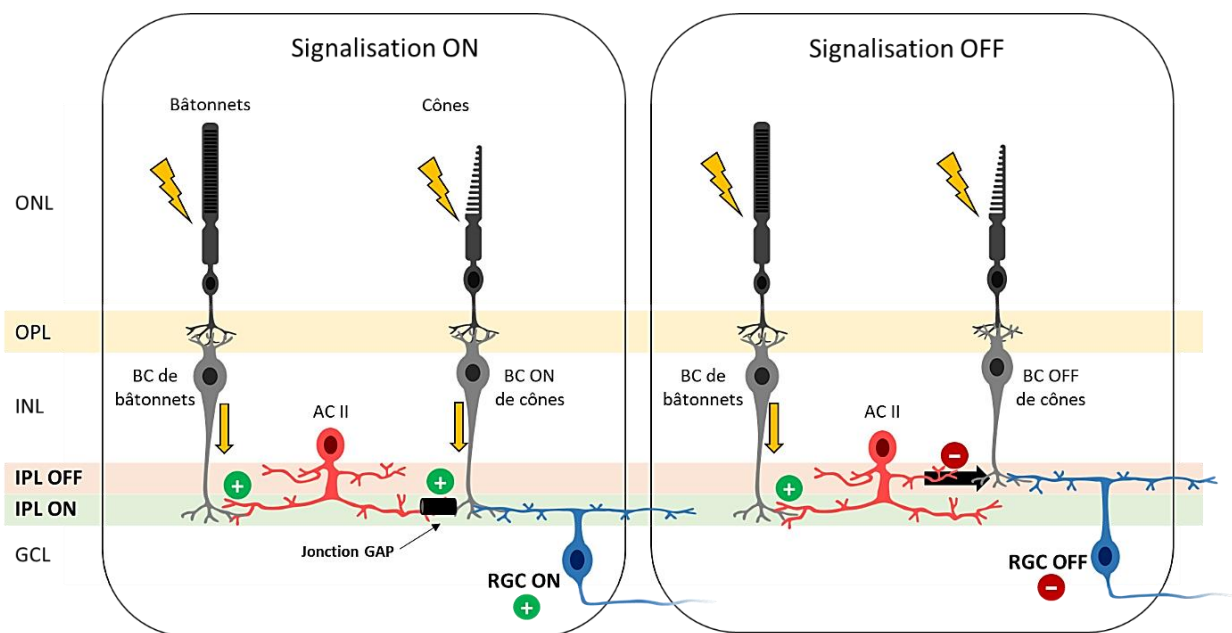
Les cellules amacrines (ACs) jouent le rôle d'interneurones et sont majoritairement inhibitrices, avec 85% des ACs GABAergiques ou glycinergiques (Balasubramanian and Gan, 2014). En revanche, certaines ACs sont capables de colibérer également de l'acétylcholine, comme les « starburst amacrine cells » (Masland, 2005), ou encore de la dopamine (Masland, 2012). Selon leurs marqueurs moléculaires, certaines études estiment qu'il y aurait plus de 60 types d'ACs différentes, même si différents types pourraient assurer des fonctions similaires (Yan et al., 2020). Cependant, cette grande hétérogénéité suppose tout de même une grande diversité dans les fonctions des ACs. Elles sont connectées à la fois entre elles (Marc et al., 2018), mais également aux BCs et aux RGCs (Demb and Singer, 2012). Elles sont ainsi impliquées dans le traitement de l'information lumineuse en régulant les signaux transmis aux BCs et aux RGCs. Ces modulations s'opèrent à travers des inhibitions « feedback » et latérales (Diamond, 2017), qui permettent la détection du mouvement, de sa direction, mais aussi d'adapter le seuil d'activation des circuits cônes/bâtonnets-BCs (Travis et al., 2018). Les ACs dopaminergiques régulent également ces fonctions en libérant de la dopamine de façon rythmique sur 24h, modulant non seulement la sensibilité d'activation des photorécepteurs, mais également en libérant des facteurs trophiques impliqués dans la survie et la croissance cellulaire (Sakamoto et al., 2005; Witkovsky, 2004).

Voisines des ACs, **les cellules horizontales** (HCs) doivent leur nom à leurs prolongements perpendiculaires aux cônes et au bâtonnets. Ces prolongements viennent au contact des synapses entre les photorécepteurs et les BCs. Elles assurent également un rôle d'interneurones inhibiteurs et sont globalement GABAergiques. Cependant, le mécanisme par lequel les HCs inhibent les photorécepteurs avoisinants n'impliquerait pas ou peu la transmission GABAergique et reste pour le moment indéterminé (Diamond, 2017). En l'absence de lumière, les HCs sont dépolarisées par le glutamate libéré *via* les photorécepteurs et en retour favorisent l'hyperpolarisation des photorécepteurs avoisinants. Quand une stimulation lumineuse survient, l'arrêt de la sécrétion de glutamate par les photorécepteurs entraîne l'hyperpolarisation des HCs qui facilite la dépolarisation des photorécepteurs avoisinants (Thoreson and Dacey, 2019). Ce mécanisme d'inhibition latérale permet aux HCs de contrôler le flux d'informations circulant entre l'ONL et l'INL et d'ajuster ainsi le seuil de détection et de transmission de l'information lumineuse au sein de l'INL puis vers les RGCs.

## **4. La couche des cellules ganglionnaires rétinienne (GCL)**

La 3<sup>ème</sup> couche nucléaire de la rétine est constituée par les RGCs dont les axones convergent vers la partie centrale de la rétine pour former le nerf optique. Les RGCs sont ainsi responsables de la transmission de l'information lumineuse vers le cerveau. Elles reçoivent des informations des BCs et des ACs dans la couche plexiforme interne (IPL). Les BCs OFF font synapses dans la couche OFF de l'INL alors que Les BCs ON font synapses dans la couche ON de l'IPL (Nelson et al., 1978). Ainsi, les RGCs peuvent être dépolarisées (RGCs ON) ou

hyperpolarisées (RGCs OFF) lors d'une stimulation lumineuse selon si elles font des synapses respectivement dans la couche ON ou OFF de l'IPL (**figure 5**).



**Figure 5 : Circuits de signalisation ON/OFF dans la rétine.** Dans la signalisation ON, la lumière induit l'activation de la BC de bâtonnets qui stimule une AC de type II. Cette AC de type II va alors stimuler *via* des jonctions GAP, la BC ON de cônes dans l'IPL ON, ce qui a pour effet de dépolariiser la RGC ON connectée. Dans la signalisation OFF, l'activation de la BC de bâtonnet induit toujours l'activation de l'AC de type II, mais celle-ci va alors libérer de la glycine au niveau de l'IPL OFF, ce qui a pour effet d'inhiber la BC OFF de cônes. Ainsi, la RGCs OFF ne dépolariise pas en présence de lumière.

Une des premières classifications des RGCs a été faite chez les primates selon des critères anatomiques (taille du soma, de l'arborisation dendritique, etc.) et du type de photorécepteurs auxquels elles étaient associées (bâtonnets et/ou cônes). Ainsi, de façon simplifiée, il est possible de diviser les RGCs en 4 grands types : Les RGCs parvocellulaires (RGCs de type-P ou « cellules naines »), magnocellulaires (RGCs de type-M ou « cellules parasoles »), koniocellulaires (RGCs de type-K, signifiant « cellules aussi petites que la poussière ») (Xu et al., 2001) ainsi que les RGCs intrinsèquement photosensibles (ipRGCs) (cf. chapitre III). Les RGCs de type-P reçoivent majoritairement des informations des cônes et sont impliquées dans l'acuité visuelle et la perception des couleurs. Les RGCs de type-M reçoivent des informations provenant de nombreux photorécepteurs (notamment des bâtonnets mais aussi des cônes) et assurent un rôle dans la détection du mouvement et des changements rapides de luminosité. Enfin les RGCs de type K reçoivent également des informations des bâtonnets et des cônes, mais seraient également impliquées dans la perception des couleurs, notamment des courtes longueurs d'onde (Nassi and Callaway, 2009).

Chez la souris, de nombreuses études ont essayé de classer les RGCs en réunissant les critères anatomiques, électrophysiologiques et de provenance des informations bâtonnets/cônes-S/cônes-M. Ainsi, il existerait entre 30 et 40 types de RGCs, dont la moitié seulement est vraiment décrite (Sanes and Masland, 2015). On peut par exemple citer au moins 7 types de RGCs qui répondent selon la direction du stimulus visuel (DS-RGCs), 4 types de RGCs $\alpha$  qui seraient impliquées dans la détection d'un mouvement selon sa distance (Krieger et al., 2017) et au moins 6 types d'ipRGCs (Sondereker et al., 2020). Alors que les RGCs présentent une grande diversité anatomique et fonctionnelle, leurs profils neurochimiques sont assez homogènes. En effet, la majorité des RGCs est glutamatergique, même si dans certains cas des transmissions GABAergiques et dopaminergiques sont retrouvées (Dumanskaya et al., 2012; Johnson et al., 2019).

Ainsi, les RGCs transmettent aux structures centrales l'information déjà partiellement traitée de manière très organisée, permettant la perception des couleurs, des contrastes, des formes et des mouvements (Livingstone and Hubel, 1988).

## 5. Connexions neuroanatomiques et fonction visuelle

La projection rétino-thalamique est la principale projection rétinothalamique. Le thalamus constitue une structure de relai pour la répartition et la transmission des informations visuelles, notamment vers le cortex visuel (Martin, 2004). La structure thalamique impliquée est le noyau géniculé latéral (LGN), qui est divisé en 3 parties chez la souris : la partie dorsale (dLGN), la partie ventrale (vLGN) ainsi que le feuillet intergéniculé (IGL). Chez l'Homme, le LGN peut être divisé en 6 couches : Les 2 premières reçoivent les projections des RGCs de type-M alors que les 4 suivantes reçoivent les projections des RGCs de type-P. Ventralement entre chacune de ces couches, se trouvent des groupes de neurones recevant des informations des RGCs de type-K. Cette organisation rétinotopique se retrouve également chez la souris, avec des projections des DS-RGCs ON-OFF dans la coquille (ou *shell* en anglais) du dLGN, puis des autres types en profondeur, dans le noyau (ou *core* en anglais) du dLGN (Kerschensteiner and Guido, 2017). Par la suite, des neurones relais projettent vers le cortex visuel, notamment le cortex visuel primaire, où l'information sera traitée pour permettre la vision. Alors que le dLGN est majoritairement impliqué dans la fonction visuelle, les rôles du vLGN et de l'IGL ne sont pas encore totalement élucidés, mais impliqueraient la régulation de fonctions « non visuelles » (Harrington, 1997; Lawrence and Studholme, 2014). D'importantes projections rétinothalamiques sont également retrouvées dans le noyau olivaire prétectal (OPN) ou encore les colliculi supérieurs (SC) (Lawrence and Studholme, 2014). Les projections vers l'OPN et les aires prétegmentales sont impliquées dans le réflexe photomoteur ou réflexe pupillaire (PLR), permettant d'ajuster l'ouverture de la pupille selon l'intensité lumineuse. Les SC constituent une interface sensori-motrice, dédiée à la synchronisation des mouvements de la tête avec la direction du regard (May, 2006).

De nombreuses autres structures sont la cible de projections rétino-fuges, notamment les aires préoptiques, l'hypothalamus ou encore de l'amygdale. Alors que ces structures ne semblent pas ou peu impliquées dans les fonctions visuelles, ces projections démontrent que la rétine pourrait jouer un rôle dans des fonctions « non-visuelles ». Une grande partie de ces fonctions serait assurée par une catégorie particulière de RGCs : les ipRGCs (Legates et al., 2014). Ces cellules seront décrites dans le **chapitre III** et jouent notamment un rôle central dans la régulation des rythmes biologiques circadiens par la lumière (**chapitre II**).

## II. Horloges biologiques circadiennes et intégration de la photopériode

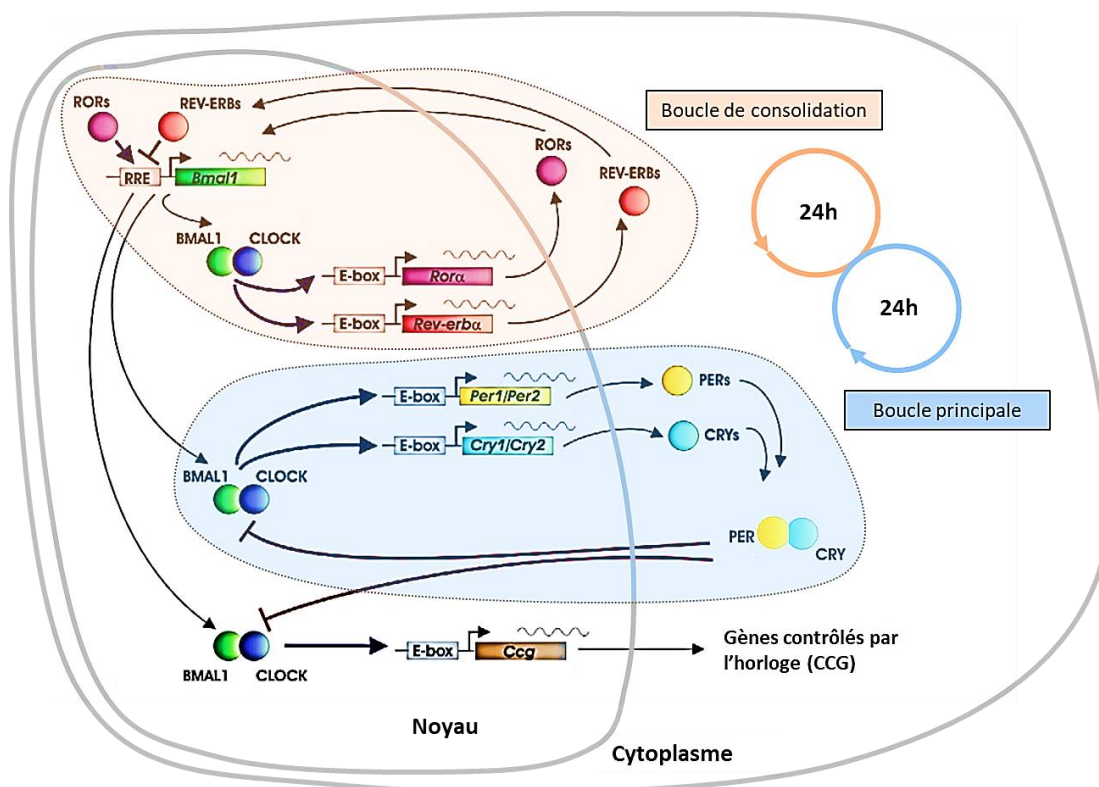
### 1. Généralités sur les rythmes biologiques et circadiens

La rotation et l'inclinaison de la terre sur son axe (obliquité) en plus de sa trajectoire elliptique autour du soleil, sont responsables à la fois d'une alternance lumière-obscurité d'une période de 24h mais également de variations saisonnières de la durée du jour (photopériode). Ces rythmes jour/nuit et saisonniers provoquent des variations environnementales importantes (température, hygrométrie, rayonnement ionisant) ayant de nombreuses conséquences sur la physiologie des organismes. Ces variations ont constitué une pression de sélection importante au cours de l'évolution, favorisant les organismes capables de s'adapter et d'anticiper ses changements environnementaux pour assurer leur survie. Cette pression environnementale est vraisemblablement à l'origine des horloges biologiques, marquant l'émergence des rythmes biologiques (Bell-Pedersen et al., 2005). Nous allons nous concentrer ici sur les rythmes biologiques circadiens, du latin *circa* « autour », et *dies* « jour », donc des fonctions biologiques rythmiques d'une période d'environ 24h. Les rythmes biologiques circadiens sont générés de manière endogène à l'organisme en l'absence de stimulus environnemental, grâce à une horloge biologique circadienne, mais sont également « entrainables » par des facteurs extérieurs qui jouent le rôle de synchroniseur. Cette propriété de fonctionnement autonome de l'horloge est due à une machinerie moléculaire complexe composée de boucles d'expressions de gènes horloges dont les protéines, dites protéines horloges, régulent leur propre expression (Takahashi et al., 2008; Welsh et al., 2010).

### 2. De la machinerie moléculaire aux horloges circadiennes

La machinerie moléculaire implique des facteurs de transcription qualifiés de protéines horloges, qui contrôlent l'expression de leurs propres gènes, appelés gènes horloges. Ces protéines horloges contrôlent également l'expression d'autres gènes dits « gènes contrôlés par l'horloge » (CCG). Cette machinerie est constituée de deux boucles moléculaires qui oscillent selon un rythme de 24h : une boucle principale et une boucle de consolidation (**figure 6**) (Buhr and Takahashi, 2013).

La boucle moléculaire principale de l'horloge commence avec l'hétérodimère de protéines horloges BMAL1 et CLOCK, des facteurs de transcription, qui permettent l'expression des gènes horloges *Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) et *Cryptochrome* (*Cry1* et *Cry2*) en se liant à leur séquence régulatrice *E-box*. Les protéines PER et CRY nouvellement traduites s'accumulent dans le cytosol puis s'hétérodimèrent en se transloquant au niveau du noyau. Par la suite, Ces hétérodimères PER-CRY interagissent avec leur séquence régulatrice *E-box*, empêchant la fixation de l'hétérodimère BMAL1-CLOCK et exerçant donc un rétrocontrôle négatif sur leur propre expression (Takahashi et al., 2008). La dégradation progressive des hétérodimères PER-CRY résultera en une nouvelle activation de leur expression par BMAL1-CLOCK au début d'un nouveau cycle. La boucle de consolidation de l'horloge moléculaire a pour origine l'expression des gènes *Ror* ( $\alpha$ - $\beta$ ) et *Rev-Erb* ( $\alpha$ - $\beta$ ), qui sont également des facteurs de transcription constituant deux familles de récepteurs nucléaires orphelins, qui entrent en compétition pour activer ou inhiber l'expression du gène *Bmal1* (Triqueneaux et al., 2004). L'hétérodimère BMAL1-CLOCK ainsi que la protéine PER2 peuvent en retour réguler l'expression des gènes *Ror* et *Rev-Erb* puisque ces deux gènes sont également sous contrôles de séquences régulatrices *E-Box*.



**Figure 6 : Schéma de fonctionnement de l'horloge moléculaire circadienne d'une cellule.** L'horloge moléculaire est composée d'une boucle principale (bleu clair) et d'une boucle de consolidation (orange clair) qui assure la robustesse du rythme circadien sur 24h. Cette machinerie contrôle l'expression des CCG qui constituent la sortie de l'horloge pour la transmission de l'information circadienne à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Adapté de (Ko and Takahashi, 2006).

La boucle principale et la boucle de consolidation interagissent afin de constituer une « horloge moléculaire » (**figure 6**). En plus de ses interactions protéines-gènes horloges, la stabilité du rythme sur 24h est assurée par d'autres mécanismes comme la phosphorylation et l'ubiquitination, qui régulent la cinétique d'expression des gènes ou encore l'interaction des protéines horloges ([Vanselow and Kramer, 2007](#)). Ainsi, l'activité de cette horloge moléculaire permet de contrôler de nombreux processus comme le cycle cellulaire ou encore le métabolisme de la cellule, en partie *via* des régulations au niveau épigénétique ([Feng and Lazar, 2012](#); [Gaucher et al., 2018](#); [Singh et al., 2019](#)). Elle est notamment responsable de l'activité rythmique de décharge des neurones constituant les structures horloges ([Brown and Piggins, 2007](#); [Herzog et al., 1998](#)). Ces mécanismes de boucles rétroactives transcription/traduction permettant la génération d'une horloge moléculaire, sont hautement conservés au cours de l'évolution ([Sun et al., 2019](#)) et sont ubiquitaires au sein des différents règnes du vivant ([Chaix et al., 2016](#)). Chez les mammifères, la majeure partie des processus circadiens sont sous contrôle d'une horloge circadienne principale : les noyaux suprachiasmatiques (SCN) de l'hypothalamus.

### 3. Les Noyaux Suprachiasmatiques

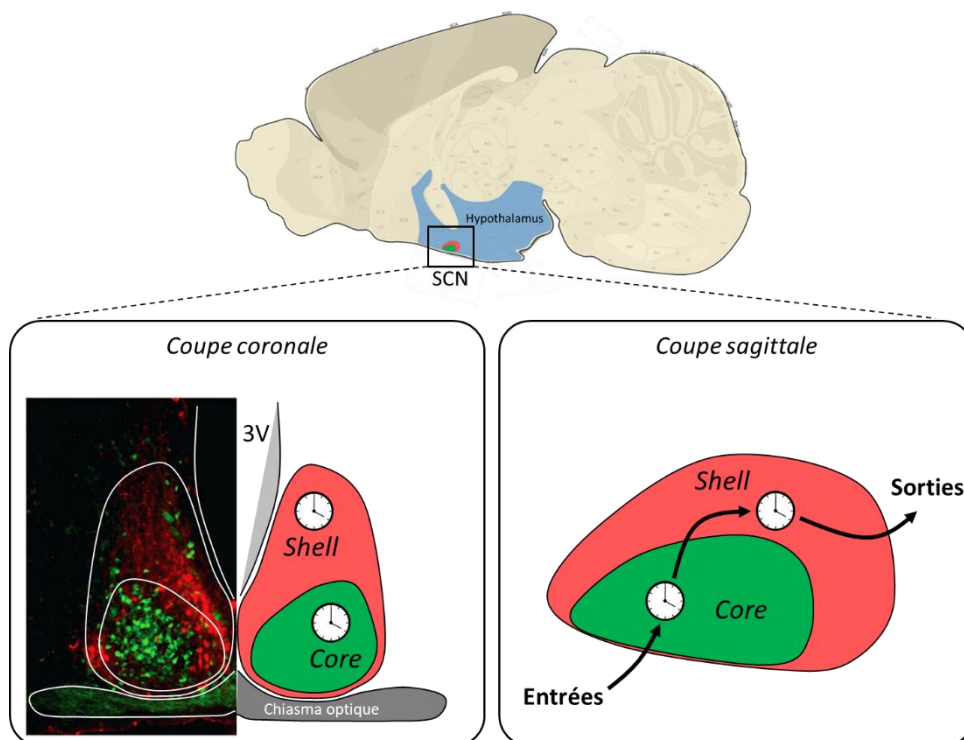
#### a. Anatomie et fonctionnement des noyaux suprachiasmatiques

Les SCN constituent l'horloge circadienne centrale ou principale chez les mammifères. Localisés au sein de l'hypothalamus antérieur, les SCN sont deux noyaux symétriques composés d'une dizaine de milliers de neurones. Ils sont responsables de la génération des rythmes circadiens comme par exemple le rythme veille/sommeil, la sécrétion des corticoïdes ou encore la sécrétion de mélatonine ([Reppert and Weaver, 2001](#); [Welsh et al., 2010](#)). Cette capacité des SCN à générer une rythmicité aussi robuste peut s'expliquer par la synergie de deux mécanismes : non seulement les neurones des SCN possèdent une horloge moléculaire (précédemment décrite) qui contrôle leur activité de décharge sur 24h, mais ils sont également interconnectés, ce qui permet de synchroniser ces horloges entre elles. Ainsi, plusieurs groupes de neurones des SCN déchargent de manière synchrone et sont ainsi responsables de l'activité électrophysiologique rythmique de ces noyaux sur 24h ([Brown and Piggins, 2007](#)). La machinerie moléculaire contrôle l'expression de nombreux gènes (gènes contrôlés par l'horloge) parmi lesquels des gènes codant pour des neuropeptides comme l'arginine-vasopressine (AVP), la prokinéticine, le peptide vasoactif intestinal (VIP) ou encore la bombésine (GRP) qui sont impliqués dans les connections intra-SCN mais également dans les voies de projections des SCN vers d'autres structures ([Evans et al., 2015](#); [Li et al., 2012](#)). Alors que les neurones des SCN sont majoritairement GABAergiques et minoritairement glutamatergiques, il est possible de diviser les SCN en deux parties, selon le type de neuropeptide coexprimé : le noyau (*core*) du SCN et la coquille (*shell*) du SCN.

Le *core* du SCN se trouve en position antéro-ventrale et est majoritairement composé de neurones GABAergiques coexprimant le neuropeptide VIP ([Welsh et al., 2010](#)). Cette partie



des SCN reçoit des afférences rétiniennes et constitue l'interface pour l'entrée d'informations dans l'horloge principale. Le *core* transmet des informations *via* des afférences GABA-VIP vers le *shell* des SCN. Le *shell* des SCN est en position postéro-dorsale, situé au-dessus du *core* et est majoritairement composé de neurones GABAergiques coexprimant l'AVP (Welsh et al., 2010). Cette partie des SCN constitue la voie de sortie de l'horloge centrale, envoyant de nombreuses efférences vasopressinergiques, GABAergiques et glutamatergiques, pour transmettre l'information circadienne vers d'autres structures cérébrales. Le *core* et le *shell* possèdent leur propre rythmicité, bien que l'activité du *shell* soit fortement affectée par l'activité du *core* (*via* des connexions et intra-SCN). Cette communication entre ces deux parties de l'horloge participe non seulement à sa robustesse grâce à l'inertie importante du *shell* (l'horloge maintient une rythmicité stable), mais permet également une certaine plasticité. En effet, le *core* des SCN reçoit des informations et module en réponse l'activité du *shell* qui intègre et transmet ces informations aux autres structures (Evans, 2016). Ainsi, le *core* et le *shell* des SCN peuvent manifester un déphasage plus ou moins marqué. Ce mécanisme de couplage/découplage entre les neurones/différentes parties des SCN est à l'origine de leur capacité à encoder des informations à travers la phase, l'amplitude et la période d'oscillation (Evans et al., 2015). En modifiant ces paramètres, les SCN modulent les informations de sorties vers les autres structures.



**Figure 7 : Représentation des SCN de souris en coupe coronale et en coupe transversale.** Les SCN, localisés au sein de l'hypothalamus, constituent l'horloge circadienne principale des mammifères. Le *core* (en vert) reçoit et intègre des informations provenant d'autres structures, avant de les transmettre au *shell* (en rouge). L'activité du *shell* est régulée par les informations provenant du *core*, modulant en réponse la sortie circadienne qui est transmise au reste de l'organisme. La photographie des SCN provient de l'article de Welsh et al., 2010. Vue sagittale du cerveau adaptée de Allen Brain atlas. Redessiné selon Evans et al., 2015. 3V = 3<sup>ème</sup> ventricule.

Alors que les SCN sont largement étudiés dans le contexte des rythmes circadiens, leur capacité d'intégration a été plus récemment étudiée dans un contexte saisonnier. En effet, il a été montré que des variations de la photopériode pouvaient être encodées non seulement à travers l'expression des gènes horloges, mais également à travers le profil électrophysiologique des SCN (Tournier et al., 2009; VanderLeest et al., 2009). Plusieurs études ont alors assimilé les SCN à une « horloge saisonnière » (Coomans et al., 2015). Cet encodage se fait à travers un allongement (en photopériode longue) ou un raccourcissement (en photopériode courte) de la phase d'activité électrophysiologique de l'horloge (Rohling et al., 2006) et fait intervenir un couplage/découplage des neurones de l'horloge *via* des transmissions GABAergiques (Myung et al., 2015). Cette plasticité saisonnière au sein des SCN pourrait constituer un mécanisme central dans l'adaptation de la physiologie et des comportements à l'échelle de l'année (Mendoza-Viveros et al., 2017; Porcu et al., 2018).

### **b. Afférences et efférences des SCN**

La principale afférence est constituée par le tractus rétinohypothalamique (RHT) en raison de sa position au-dessus du chiasma optique. Le RHT est composé quasi-exclusivement d'axones d'ipRGCs chez la souris (99%), alors que la proportion d'ipRGCs est moins importante chez le rat et le hamster (70 à 90%) (Baver et al., 2008; Morin et al., 2003; Sollars et al., 2003). Cette voie assure le photoentraînement des SCN (**cf. partie II.4.c**) (Hattar, 2002; Stephan and Zucker, 1972). La rétine contacte également les SCN indirectement *via* une afférence des neurones à neuropeptique Y (NPY) du feuillet intergénéral thalamique (IGL) qui constitue le tractus géniculohypothalamique (GHT). La fonction du GHT n'est pas encore totalement clarifiée (Moore, 2013), mais cette projection pourrait également être impliquée dans la régulation du photoentraînement de l'horloge (Brown, 2016). Toujours dans les fonctions relatives au photoentraînement, les SCN reçoivent des afférences du tronc cérébral, notamment des noyaux du Raphé, dont les projections sérotoninergiques joueraient un rôle antagoniste à la lumière dans l'entraînement de l'horloge (Muscat et al., 2005). Les SCN jouant un rôle central dans le rythme de prise alimentaire et le métabolisme, l'horloge reçoit en retour d'autres afférences provenant de la partie « métabolique de l'hypothalamus » comme le noyau arqué (ARC) ou encore l'hypothalamus dorso-médian (DMH) (Challet, 2019).

En termes d'efférences, les SCN sont connectés à de nombreuses structures hypothalamiques dont les noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN) qui projettent indirectement vers la glande pinéale, régulant la sécrétion de mélatonine (Simonneaux and Ribelayga, 2003). Les SCN projettent également sur la zone subparaventriculaire (SPZ), qui constitue un relai pour le contrôle circadien du rythme de repos/activité (Abrahamson and Moore, 2006). Plus récemment, il a été démontré que cette projection SCN-SPZ est également impliquée dans la régulation circadienne du comportement agressif chez la souris (Todd et al., 2018). Une autre efférence retrouvée chez de nombreux modèles de rongeurs est celle que forme la projection vers les noyaux paraventriculaires thalamiques (PVT), qui relaye l'information des

SCN vers des structures comme l'amygdale et le cortex préfrontal (Peng and Bentivoglio, 2004; Sylvester et al., 2002). Les efférences des SCN reflètent ainsi leur implication dans de nombreuses fonctions physiologiques et comportementales.

#### **4. Entraînement et photoentraînement des SCN : du circadien au zeitgeber**

##### **a. Notion de zeitgeber**

Les SCN génèrent une rythmicité selon une période endogène qui leur est propre (autour de 24h). Cependant, des facteurs exogènes sont capables de synchroniser l'horloge principale, qui en réponse transmet la nouvelle information circadienne au reste de l'organisme. Ce mécanisme d'entraînement des SCN permet de synchroniser la physiologie de l'organisme avec les variations rythmiques de l'environnement. Ces facteurs extérieurs sont utilisés par l'horloge à la condition qu'ils constituent des indicateurs fiables permettant l'anticipation de ces variations. Ces facteurs sont alors définis par le terme Allemand « zeitgebers » (qui signifie « donneurs de temps »), en hommage à Jürgen Aschoff, considéré comme le père de la chronobiologie.

Parmi les nombreux zeitgebers décrits, il en existe deux catégories : la première catégorie regroupe les zeitgebers « non-photiques », qui ne sont donc pas relatifs à la lumière, comme par exemple le moment de la prise alimentaire ou le moment de l'activité physique (Challet and Mendoza, 2010). La deuxième catégorie regroupe Les zeitgebers « photiques », qui sont relatifs aux différents paramètres de la lumière, comme par exemple l'alternance jour/nuit, la photopériode ou encore la longueur d'onde. Les zeitgebers photiques, notamment l'alternance jour/nuit, sont ceux ayant le potentiel de synchronisation le plus fort sur les SCN (Refinetti, 2015). Cette synchronisation ou entraînement de l'horloge, se traduit par la mise en place d'une relation de phase entre la période d'oscillation des SCN et la période d'oscillation du zeitgeber, comme une remise à l'heure de l'horloge centrale.

##### **b. Du temps circadien (CT) au temps du zeitgeber (ZT)**

Afin de pouvoir se repérer au sein du cycle circadien, il est important d'avoir une unité de temps relative à la période endogène de l'horloge circadienne : Il s'agit du temps circadien (CT). Ce temps circadien se note de CT0 à CT24, puisque la période endogène de l'horloge est proche de 24h. Mais à quoi correspond CT0 ou encore CT12 ?

Parmi les nombreux paramètres physiologiques et comportementaux contrôlés par les SCN, l'activité locomotrice constitue un marqueur fiable de l'activité des SCN (Houben et al., 2009), alors qu'une lésion des SCN entraîne une arythmie de l'activité locomotrice (Stephan and Zucker, 1972). Chez les animaux strictement diurnes, la phase d'activité locomotrice coïncide avec la phase d'activité électrophysiologique des SCN. A l'inverse, chez les animaux strictement nocturnes, la phase d'activité locomotrice est opposée à la phase d'activité électrophysiologique des SCN. En l'absence de tout zeitgeber, les animaux (diurnes ou

nocturnes) présentent une activité locomotrice en « libre cours » (*freerun*) (**figure 8**) d'une période correspondante à la période endogène des SCN. Par convention, CT0 correspond au moment d'initiation de la période d'activité locomotrice d'un animal diurne, où CT12 correspondra alors à l'initiation de la période d'activité locomotrice chez un animal nocturne ([Golombek and Rosenstein, 2010](#)). Dans l'horloge (SCN), cela signifie que CT0 correspond au début de la phase d'activité électrophysiologique alors que CT12 correspond à la fin de cette période.

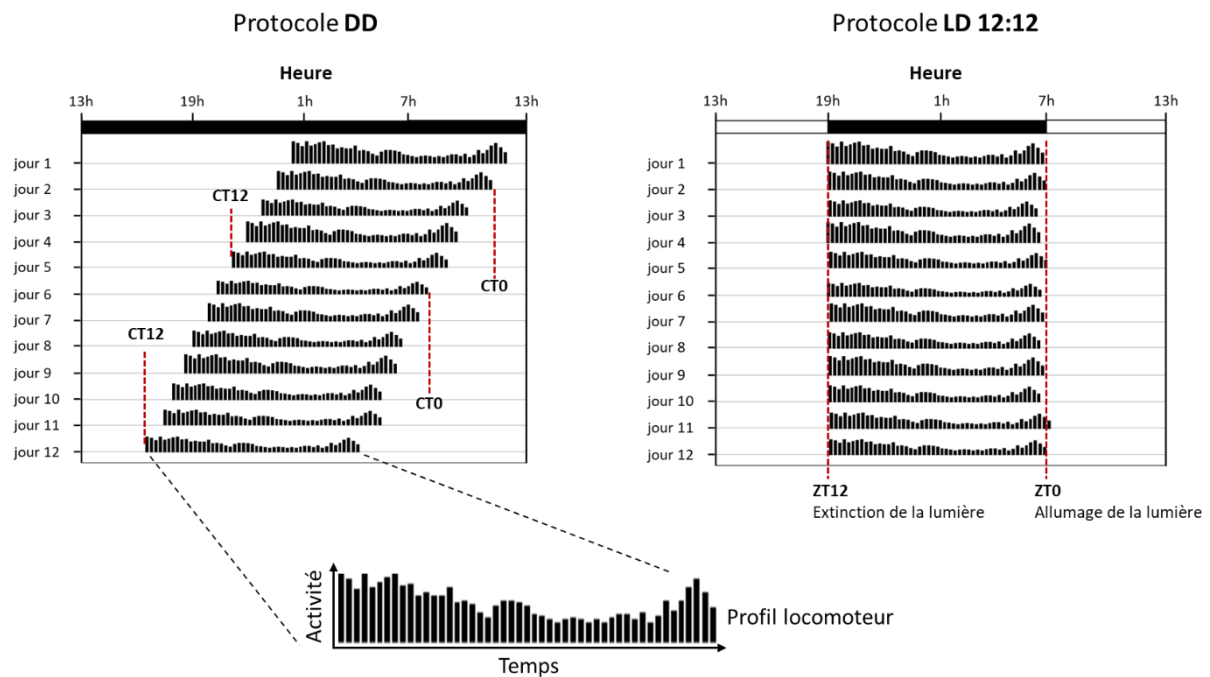
La même démarche est appliquée aux zeitgeber pour obtenir une unité de temps relative : on parle de temps zeitgeber (ZT). Par convention, ZT0 représente le moment d'arrivée du zeitgeber. Par exemple si la lumière est le zeitgeber, ZT0 correspondra à l'allumage de la lumière.

### c. Photoentraînement des SCN

La technique la plus utilisée pour étudier l'impact de la lumière sur l'horloge est l'actimétrie, qui consiste à enregistrer l'activité locomotrice d'un animal dans son environnement durant plusieurs jours ou plusieurs semaines ([Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2015](#)). Le profil locomoteur est souvent représenté sous forme d'actogramme (**figure 8**) permettant de visualiser la répartition de l'activité locomotrice en fonction des jours et de l'heure de la journée (sur 24h).

Lorsque qu'une souris est placée en obscurité constante (DD), celle-ci présente un rythme d'activité locomotrice en libre cours sur la période de ses SCN. Comme la souris possède une période endogène légèrement plus courte que 24h ( $\pm 23,5$ h selon les souches), l'activité locomotrice de la souris va commencer tous les jours un peu plus tôt. Ce phénomène se traduit par une avance de phase, c'est à dire un début d'activité avancée chaque jour, se manifestant par une dérive vers la gauche du profil locomoteur sur l'actogramme au fur et à mesure des jours/semaines d'enregistrement. En termes de temps circadien, cela signifie que le CT12 de la souris survient un peu plus tôt tous les jours.

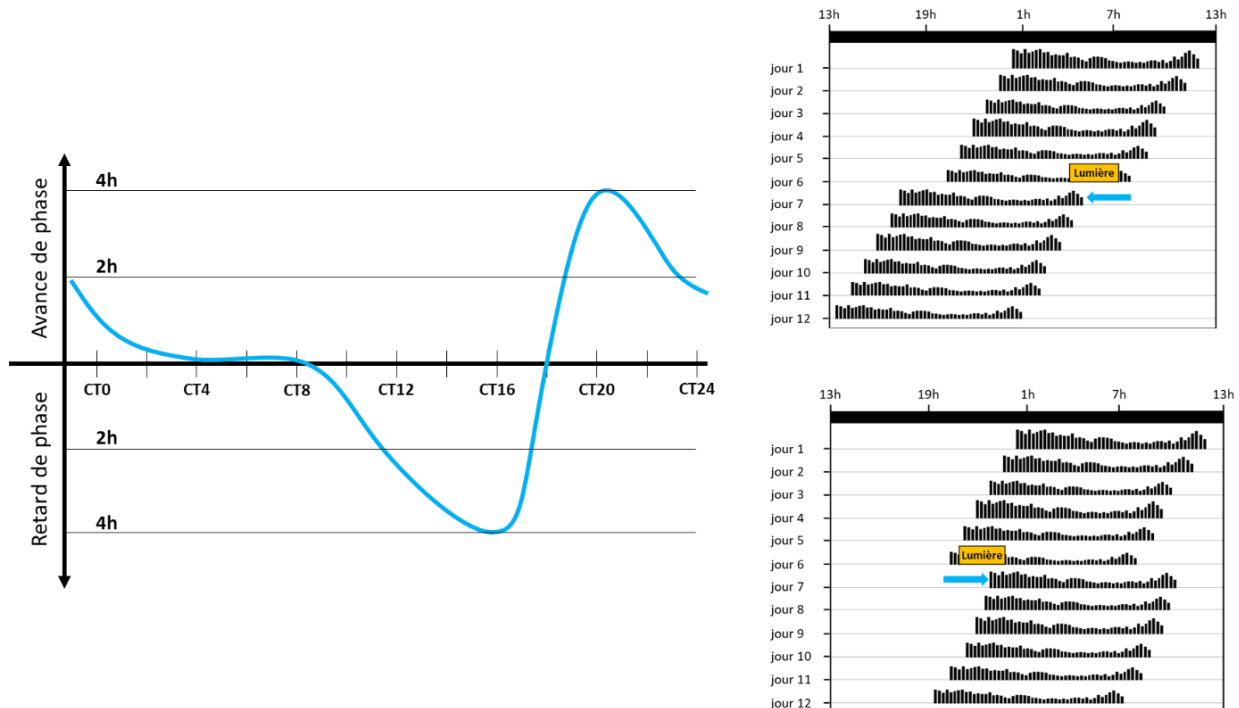
Lorsqu'une souris (espèce nocturne) précédemment placée en DD est placée en cycle lumière/obscurité (LD) avec par exemple 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (LD12:12), son activité locomotrice va rapidement se synchroniser au cycle LD : l'activité locomotrice de l'animal commencera tous les jours à ZT12 (transition jour/nuit) et sa période d'activité sera restreinte à la période nocturne entre ZT12 et ZT24/0. La lumière joue le rôle de zeitgeber et l'activité des SCN va être entraînée par le cycle LD : c'est le photoentraînement. Dans des protocoles d'exposition LD12:12, lorsque les SCN sont parfaitement synchronisés au cycle LD, le ZT0 (heure d'allumage de la lumière, transition nuit-jour) viendra se superposer au début d'activité électrophysiologique des SCN, traduisant l'arrêt de l'activité locomotrice.



**Figure 8 : Représentations schématiques d'un actogramme de souris en DD et en LD.** En DD, l'activité locomotrice de l'animal (tracé noir) est en libre cours car il n'y a aucun zeitgeber pour entraîner les SCN. Les SCN ayant une période d'oscillation légèrement inférieure à 24h, l'activité de l'animal commence un peu plus tôt tous les jours (CT12) et s'arrête quand l'activité des SCN augmente (CT0). En LD, la lumière assure le photoentraînement des SCN. L'activité de la souris est alors synchronisée au cycle lumière/obscurité (12h/12h). La souris étant un animal nocturne, son activité débute à l'extinction de la lumière (ZT12) et s'arrête à son allumage (ZT0).

Cette capacité de la lumière à induire des décalages de la phase d'activité des SCN réside au sein des synapses entre le RHT et le *core* de l'horloge. En réponse à une stimulation lumineuse, les ipRGCs/RGCs libèrent du glutamate et du PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating peptide) sur les neurones des SCN (von Gall et al., 1998), mais également du GABA (Sonoda et al., 2020a). La libération de glutamate entraîne une augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  via notamment des canaux ionotropiques NMDA (Colwell, 2001) provoquant l'activation de différentes kinases (MAPK, CaMK, PKA, PKC et PKG). Ces enzymes phosphorylent la protéine CREB (C-AMP Response Element-Binding protein) (Reppert and Weaver, 2001), ce qui entraîne son interaction avec des séquences promotrices CRE (Calcium/cAMP Response Element) et l'augmentation de l'expression des gènes horloges *per1* et *per2*. Par ailleurs, l'expression des gènes *per1* et *per2* est également sous dépendance de l'hétérodimère BMAL1-CLOCK (Takahashi et al., 2008). Ainsi, la cinétique endogène d'expression des gènes horloges couplée à la variation circadienne de l'excitabilité des neurones du SCN modifie profondément la réponse des SCN à une stimulation lumineuse en fonction du CT (Cloues and Sather, 2003; Colwell, 2001; Lundkvist and Block, 2005). En conséquence, la sortie comportementale varie selon un pattern précis en fonction du CT auquel intervient la stimulation lumineuse : C'est la courbe de réponse de phase (PRC) (Rusak and Groos, 1982; von Gall et al., 1998). Si un animal est en libre cours et qu'il reçoit une stimulation lumineuse entre CT9 et CT18, celui-ci

présentera le lendemain un retard de phase (**figure 9**) : son activité locomotrice commencera plus tard que la veille. En revanche, si la stimulation lumineuse survient entre CT0 et CT3 ou CT18 et CT24, l'animal présentera une avance de phase : son activité locomotrice commencera plus tôt que la veille. Enfin, une stimulation lumineuse entre CT3 et CT9, n'entraîne pas de décalage de phase de l'horloge.



**Figure 9 : Représentation graphique de la courbe de réponse de phase (PRC).** L'application d'un créneau de lumière (en jaune) induit une réponse différentielle sur l'activité locomotrice selon le CT auquel il est appliqué : c'est la PRC (courbe en bleu). Entre CT9 et C18, un créneau de lumière induit un retard de phase de l'activité locomotrice (actogramme du bas). Tandis qu'un créneau de lumière entre CT18 et CT3 entraîne une avance de phase de l'activité locomotrice (actogramme du haut).

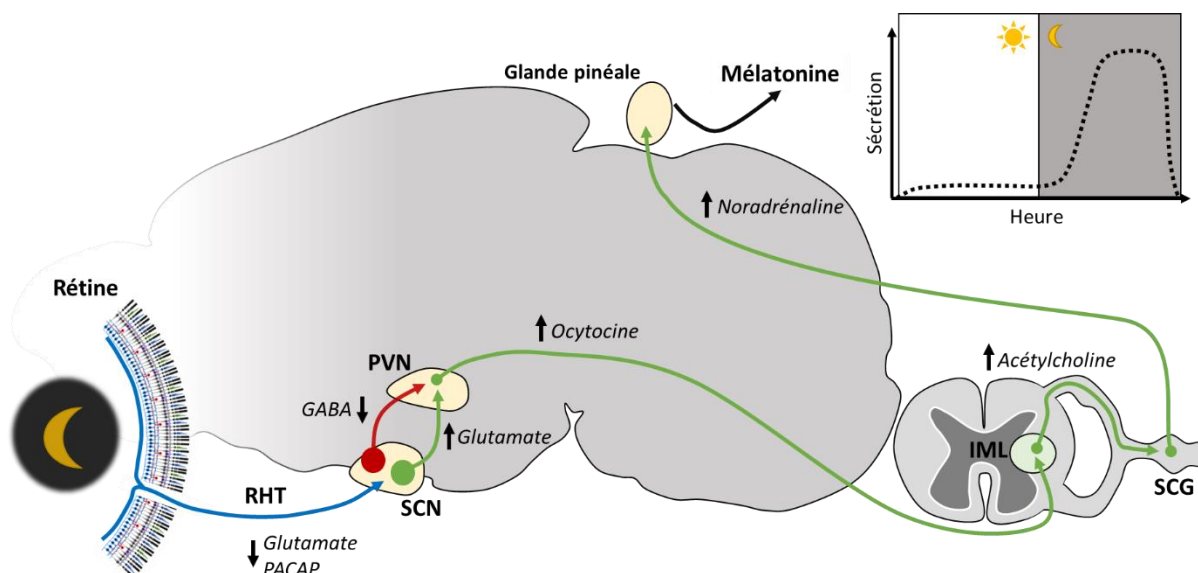
Si le glutamate et le PACAP sont connus pour être colibérés au niveau des SCN, les rôles respectifs de ces deux neurotransmetteurs sur le photoentraînement de l'horloge ne sont pas encore totalement établis. Des animaux transgéniques dont les ipRGCs ne peuvent plus libérer de glutamate présentent une altération du photoentraînement, mais sans perte totale de la fonction, les SCN continuant de répondre électrophysiologiquement à la lumière (Allen et al., 2018; Purrier et al., 2014). Ces résultats suggèrent que le PACAP et/ou d'autres RGCs projetant vers les SCN continuent d'assurer partiellement le photoentraînement. En effet, le PACAP pourrait jouer un rôle important dans la modulation du signal glutamatergique (Reppert and Weaver, 2001) mais serait également particulièrement impliqué dans la réponse d'avance de phase (Beaulé et al., 2009). Par ailleurs, il a été récemment démontré que les SCN reçoivent des entrées inhibitrices (GABAergiques) *via* une petite population d'ipRGCs (Sonoda et al., 2020a). Le rôle de cette libération n'est pas encore totalement élucidé, mais les données indiquent que le GABA assurerait un rôle de modulateur dans le photoentraînement des SCN, en atténuant l'entrée excitatrice vers l'horloge (Sonoda et al., 2020a).

Enfin, le photoentraînement des SCN ne doit pas être confondu avec un autre phénomène : l'effet de masquage négatif par la lumière. En effet, chez les animaux nocturnes, un créneau de lumière appliqué pendant la nuit induit une rapide inhibition de l'activité locomotrice et ce, indépendamment des SCN (Redlin, 2001). Des animaux arythmiques en condition DD peuvent ainsi présenter une synchronisation de leur activité locomotrice en cycle LD par effet de masquage (Pendergast and Yamazaki, 2011).

## 5. Contrôle de la synthèse de la mélatonine par les SCN et la lumière

La libération de mélatonine est sous contrôle de l'activité des SCN (Simonneaux and Ribelayga, 2003) et implique une voie polysynaptique initiée par la projection des SCN vers les noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN). Cette projection est à la fois GABAergique et glutamatergique. Le glutamate est sécrété de façon continue alors que le GABA est sécrété le jour, lorsque les SCN sont particulièrement actifs (stimulés notamment *via* le RHT). Ainsi, l'activité des PVN est fortement inhibée pendant la journée (Perreau-Lenz et al., 2003). Lorsque l'activité des SCN diminue (pendant la nuit), la levée d'inhibition GABAergique concomitante à la stimulation glutamatergique entraîne l'activation des PVN qui stimule alors les cellules des colonnes intermédiolatérales de la moelle épinière (IML) au niveau thoracique (**figure 10**). Par la suite, ces neurones projettent au niveau des ganglions cervicaux supérieurs (SCG) liés à la glande pinéale par voie noradrénergique (Arendt, 1998). La stimulation des récepteurs  $\beta_1$  noradrénergiques exprimés par les pinéalocytes entraîne une augmentation intracellulaire d'AMPc qui a pour effet d'augmenter l'expression de l'Arylalkylamine N-acétyltransferase (AANAT) et donc la synthèse de mélatonine (**figure 11**) (Falcón, 1999). L'AANAT, alors seulement exprimée durant la nuit, est l'enzyme limitante dans la voie de biosynthèse de la mélatonine (Foulkes et al., 2000). La mélatonine est ainsi sécrétée exclusivement pendant la nuit chez tous les mammifères et son rythme de sécrétion est considéré comme circadien (Kalsbeek et al., 2000).

Un créneau de lumière pendant la nuit induit une suppression de la sécrétion de mélatonine (Zeitzer et al., 2000), *via* la voie précédemment décrite. Alors que l'influence excitatrice sur les PVN est décrite comme constante (Perreau-Lenz et al., 2003), la lumière favorise l'inhibition des PVN à travers l'activation des neurones GABAergiques des SCN, entraînant la suppression de la libération de mélatonine. Ainsi, la synthèse de mélatonine est dépendante de la communication entre SCN et PVN et du traitement de l'information lumineuse (Kalsbeek et al., 2000).



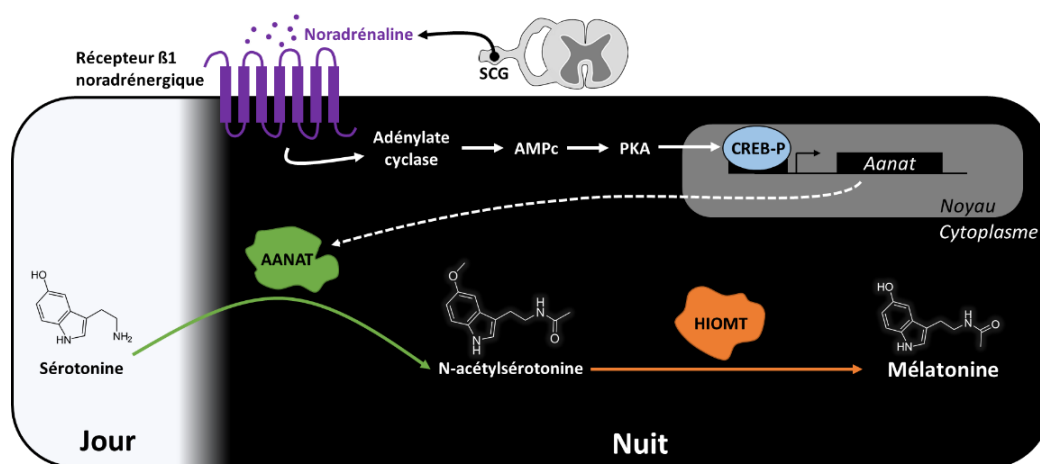
**Figure 10 : Circuit de régulation de la sécrétion de la mélatonine.** La nuit, les RGCs sont peu activées ce qui réduit les entrées glutamatergiques et PACAPergiques vers les SCN. Cette diminution de l'entrée excitatrice favorise la stimulation glutamatergique des PVN. Les PVN entraînent alors l'activation de l'IML, suivi des SCG qui stimulent la production de mélatonine dans la glande pinéale. Le jour, l'augmentation de la stimulation des SCN *via* le RHT favorise l'inhibition GABAergique des PVN, entraînant un arrêt de la production de mélatonine. Illustré d'après [Simonneaux & Ribelayga, 2003](#).

## 6. La mélatonine

### a. Généralités et mécanismes de synthèse

La mélatonine est une neurohormone synthétisée au sein de la glande pinéale par les pinéalocytes. Ce sont les travaux de Julius Axelrod dans la deuxième partie du XX<sup>ème</sup> siècle, qui ont démontré que la sécrétion de mélatonine est corrélée aux rythmes biologiques. Cette indolamine est principalement connue pour son rôle dans la régulation du rythme veille/sommeil ([Emet et al., 2016](#)) et joue un rôle central dans les rythmes biologiques comme hormone « donneuse de temps » ([Arendt, 1998](#)). Elle contribue à la distribution du message circadien dans le reste de l'organisme ([Stehle et al., 2003](#)). Son rôle clé dans la régulation des rythmes biologiques a été démontré par le fait qu'une injection systémique de mélatonine peut induire soit un décalage soit une resynchronisation du rythme circadien d'activité locomotrice selon le moment de l'injection ([Redman and Armstrong, 1988](#)). La mélatonine est synthétisée par les pinéalocytes, à partir de la sérotonine. La voie de biosynthèse fait intervenir deux enzymes principales : l'Arylalkylamine N-acétyltransferase (AANAT) et l'Hydroxyindole-O-méthyltransferase (HIOMT) aussi appelée N-Acetylsérotonine O-méthyltransferase (ASMT). La sérotonine est stockée dans la glande pinéale au fur et à mesure de sa synthèse pendant la journée. La nuit, la réaction de synthèse de mélatonine commence par la conversion de la sérotonine en N-acétylsérotonine par l'AANAT, avant que celle-ci ne soit transformée en mélatonine par l'HIOMT (**figure 11**).





**Figure 11 : Régulation de la synthèse de mélatonine au sein d'un pinéaloocyte.** Le jour, la sérotonine est accumulée dans le pinéaloocyte. La nuit, la libération de noradrénaline sur son récepteur induit une voie de signalisation AMPc dépendante qui va entraîner la phosphorylation du facteur de transcription CREB et l'expression du gène codant pour l'AANAT. L'AANAT convertit alors la sérotonine accumulée la journée en N-acétylsérotinine puis celle-ci est finalement convertie en mélatonine par l'HIOMT, exprimée de façon constitutive. Illustré d'après [Simonneaux & Ribelayga, 2003](#).

En plus de la production de mélatonine au sein de la pinéale, la mélatonine est également produite localement dans la rétine ([Tosini and Menaker, 1996](#)) au niveau de la couche nucléaire externe et au niveau de la couche ganglionnaire chez les rongeurs ([Gianesini et al., 2015](#)). Cette mélatonine rétinienne est impliquée dans diverses fonctions physiologiques de la rétine parmi lesquelles la régulation de la réponse électrophysiologique des photorécepteurs ([Sengupta et al., 2011](#)), la phagocytose des disques des photorécepteurs ([Laurent et al., 2017](#)) ou encore la viabilité des photorécepteurs ([Gianesini et al., 2016](#)). Enfin la mélatonine est également synthétisée dans de l'intestin inférieur, indépendamment de la production par la pinéale, où elle jouerait un rôle de régulateur de la motilité intestinale et un rôle antiinflammatoire ([C. Q. Chen et al., 2011](#)). Par sa capacité à « capturer » les radicaux libres, la mélatonine est également étudiée pour ses propriétés antioxydantes, révélant une efficacité contre le stress oxydatif ([Poeggeler et al., 1993](#); [Proietti et al., 2017](#)).

### **b. Les récepteurs de la mélatonine : fonction et localisation**

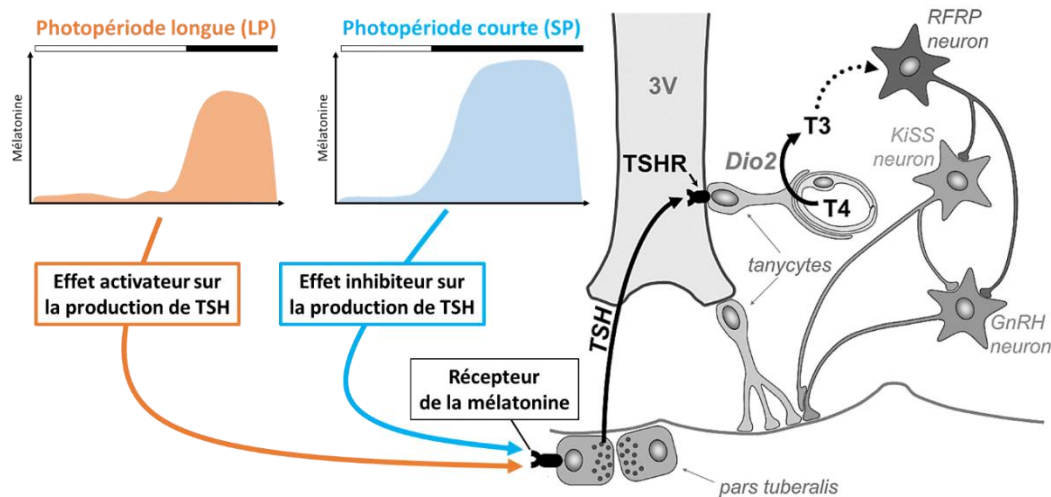
Les récepteurs de la mélatonine ont été particulièrement étudiés *via* l'utilisation de la 2<sup>[125I]</sup>-iodomélatonine, permettant leur ciblage et les études par séquençage ont permis de mettre en évidence au moins deux récepteurs : MT1 et MT2 ([Dubocovich and Markowska, 2005](#)). Il existe également un troisième récepteur à la mélatonine, qui a été nommé MT3 et qui n'a pas encore été retrouvé chez l'humain ([Nosjean et al., 2001](#)). Ce récepteur n'est pas membranaire et ses propriétés se superposeraient à celle de la quinone réductase 2 (NQO2) ([Nosjean et al., 2001](#)). Selon la même étude, l'affinité de ce « récepteur » pour la mélatonine est de l'ordre du [nM], bien inférieure à celle des MT1/MT2 [pM], au point de rendre ce récepteur théoriquement incapable d'interagir avec des concentrations circulantes de mélatonine ([Goldman, 2001](#)).

Les récepteurs MT1 et MT2 sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. L'activation du récepteur MT1 entraînerait à la fois une cascade de signalisation de type  $G\alpha_i$  (baisse d'AMPc, baisse d'activité de la protéine kinase A et donc baisse de la phosphorylation du facteur CREB) (Witt-Enderby et al., 1998), une signalisation de type  $G\alpha_q$  (activation de la phospholipase C (PLC), production d'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) et de diacylglycérol (DAG) avec augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire) et l'ouverture de canaux Kir3 (potassique) (Jiang et al., 1995). Le récepteur MT2 est également couplé à des protéines  $G\alpha_i$  et  $G\alpha_q$  qui lui confèrent des voies de signalisation intracellulaires similaires à celles du récepteur MT1 (Baisse de la concentration de CREB-P et activation de la voie PLC/DAG/ $IP_3$ ). En revanche, le MT2 serait également capable d'inhiber la voie de signalisation GMPc dépendante par baisse d'activité de la guanylate cyclase (Petit et al., 1999). En somme, l'activation des récepteurs MT1/MT2 par la mélatonine entraîne une grande diversité de cascades de signalisations intracellulaires qui vont moduler à la fois le transcriptome de la cellule mais également son profil électrophysiologique (Jiang et al., 1995; Slominski et al., 2012). Plusieurs études ont également démontré que les récepteurs MT1/MT2 pouvaient former un hétéromère, mais les fonctions de cette hétérodimérisation sont encore largement méconnues (Jockers et al., 2008). En termes de localisation, le récepteur MT1 est très largement distribué en dehors du cerveau, notamment dans les glandes mammaires, les vaisseaux sanguins, le foie, les reins ou encore dans la peau. Ce récepteur est aussi distribué dans un grand nombre de structures du système nerveux central parmi lesquelles on peut citer l'hypothalamus, la rétine, le thalamus, l'amygdale, les aires préoptiques, la substance noire ou encore l'aire tegmentale ventrale (Dubocovich and Markowska, 2005; Klosen et al., 2019; Pandi-Perumal et al., 2008; Scher et al., 2002). Le récepteur MT2 est distribué de façon plus restreinte dans le système nerveux central, avec une diversité de structures encore plus notable que le récepteur MT1. On trouve le récepteur MT2 dans la rétine, le bulbe olfactif, le septum, l'amygdale, l'hippocampe, les aires préoptiques, l'hypothalamus, le thalamus, l'habenula ou encore dans les noyaux du Raphé (Klosen et al., 2019; Musshoff et al., 2002). Par ailleurs, Les travaux récents de Klosen et collaborateurs sur la localisation des récepteurs MT1/MT2 ont également démontré que ces récepteurs sont très rarement coexprimés par une même cellule (Klosen et al., 2019). Cette donnée vient donc appuyer le manque de données fonctionnelles sur de possibles hétérodimérisations en conditions physiologiques. A travers la distribution de ses récepteurs, la mélatonine est impliquée dans de nombreuses fonctions neurobiologiques. Par exemple les récepteurs MT1 et MT2 sont exprimés dans le SCN, où le MT1 régule négativement l'activité électrophysiologique des SCN (probablement *via* le canal potassique Kir3) (Jiang et al., 1995; Von Gall et al., 2000) tandis que le MT2 est impliqué dans le décalage de phase de l'horloge (Liu et al., 1997). Le SCN contrôlant la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale (Simonneaux and Ribelayga, 2003), cette signalisation « feedback » de la mélatonine jouerait un rôle important dans la modulation/l'ajustement de l'activité locomotrice (Houdek et al., 2016; Klante et al., 1999). Par ailleurs, les récepteurs MT1 et MT2 sont exprimés dans la rétine (Scher et al., 2002) et notre équipe a récemment démontré, par l'utilisation de souris MT1<sup>-/-</sup>

et MT2<sup>-/-</sup>, que ces récepteurs modulent les effets de la mélatonine sur les photorécepteurs (Gianesini et al., 2016). Enfin plus récemment, il a été montré que la mélatonine jouait un rôle notable dans l'efficacité de la mémoire de travail, en cohérence avec l'expression de ses récepteurs au sein de l'hippocampe (Jilg et al., 2019; Klosen et al., 2019; Musshoff et al., 2002).

### c. Rôle dans les rythmes saisonniers chez les rongeurs

La longueur du pic de mélatonine augmente avec la durée de la nuit et participe à l'organisation des rythmes saisonniers chez les mammifères (Arendt, 1998). L'information relative à la photopériode est intégrée par les SCN (Coomans et al., 2015), qui vont en réponse moduler la longueur du pic de mélatonine. Plus la photopériode est longue (en été), plus le pic de mélatonine est court et inversement. Ainsi, les variations de la photopériode sont encodées *via* le pic de sécrétion de la mélatonine. Ce mécanisme permet par exemple à l'animal de réguler sa reproduction saisonnière (Malpaux et al., 1999). En effet, il a été montré que l'augmentation de la longueur du pic de mélatonine avait un effet inhibiteur sur la fonction reproductive de certaines espèces, par modulation de la sécrétion de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) (Malpaux et al., 1999). Mais quels sont les cibles de la mélatonine ? Les travaux de Wittkowski et collaborateurs démontrent que des cellules de la *pars tuberalis* (PT) expriment de la thyrostimuline (TSH) en photopériode longue (Wittkowski et al., 1988). Un peu plus tard, des variations saisonnières du nombre de récepteur de la mélatonine sont décrites au niveau de la PT, suggérant que celle-ci pourrait être la cible de la mélatonine dans le cadre de la reproduction saisonnière (Gauer et al., 1994). Enfin, une étude de Bockmann et collaborateurs démontre que l'inhibition de la production de TSH dans la PT provoquée par une photopériode courte peut être empêchée par une pinéalectomie (Bockmann et al., 1996). L'hypothèse du décodage du signal mélatonénergique au niveau de la PT est renforcée par la présence de cellules sécrétrices de TSH et exprimant le récepteur MT1 (Dardente et al., 2003). Finalement, c'est en 2010 que le mécanisme moléculaire est proposé : le pic long de mélatonine en photopériode courte induit l'inhibition du facteur de transcription EYA3, responsable de l'expression du gène codant pour la TSH *via* une séquence E-box. En photopériode longue, la diminution de sécrétion nocturne de mélatonine entraîne une levée d'inhibition sur EYA3, qui va provoquer l'expression de la TSH par les cellules de la PT (Dardente et al., 2010; Wood et al., 2020). L'augmentation de la sécrétion de TSH permet la production de triiodothyronine (T3) *via* l'enzyme désiodinase 2 (DIO2), au sein des tanocytes localisés autour du 3<sup>ème</sup> ventricule dans l'hypothalamus médiobasal. La T3 va alors indirectement agir sur les neurones à GnRH *via* les neurones à kisspeptine et à RFRP (**figure 12**) (Klosen et al., 2013). En hiver, la sécrétion abondante de mélatonine a un effet inhibiteur sur la production de TSH, induisant une baisse de l'activité des neurones à GnRH. En été, le raccourcissement du pic de mélatonine induit une levée d'inhibition sur l'expression de la TSH et une activation des neurones à GnRH. Ainsi, la mesure de l'expression de la TSH constitue un facteur révélateur de l'encodage et du décodage de l'information photopériodique *via* la mélatonine chez la souris (De Miera et al., 2020).



**Figure 12 : Voie de régulation de l'axe reproducteur chez la souris *via* la sécrétion de mélatonine et la production de TSH.** En LP (orange), la production de TSH au niveau de la PT est permise par le raccourcissement du pic de sécrétion de la mélatonine, favorisant l'activation de l'axe reproducteur. En SP (bleu), l'augmentation de la sécrétion de mélatonine induit une inhibition de la production de TSH, ayant pour conséquence l'inactivation de l'axe reproducteur. Adapté de [Klosen et al., 2013](#).

## 7. D'autres horloges circadiennes

### a. Notion d'horloges « esclaves », « semi-autonomes » et « autonomes »

Les SCN constituent l'horloge circadienne principale, mais ne sont pourtant pas la seule horloge au sein du système nerveux central. Il existe plusieurs structures cérébrales qui contiennent une horloge et qui présentent une rythmicité circadienne ([Abe et al., 2002](#)). Cependant, selon leur capacité à osciller de manière auto-entretenue et à transmettre leur rythmicité à d'autres régions, les horloges sont classées en 3 grandes catégories : « esclaves », « semi-autonomes » et « autonomes » ([Guilding and Piggins, 2007](#)). Les horloges dites « esclaves », présentent une rythmicité lorsqu'elles sont soumises à un pacemaker (une horloge « autonome »). Sans le signal de ce pacemaker, ces horloges restent arythmiques. Par exemple l'amygdale constitue un oscillateur « esclave » : on y trouve une expression circadienne de PER2, mais la lésion des SCN (pacemaker) entraîne une perte totale de rythmicité au sein de cette structure ([Harbour et al., 2013](#)). Les horloges dites « semi-autonomes » présentent une rythmicité générée de manière endogène (autonome et auto-entretenue), mais nécessite tout de même le signal d'un pacemaker pour correctement synchroniser ses oscillateurs internes. En l'absence de pacemaker, ces horloges « semi-autonomes » sont constituées d'une multitude d'oscillateurs internes non synchronisés qui rendent la structure globalement arythmique. Les noyaux dorso-médian hypothalamiques (DMH) sont par exemple décrits comme étant « semi-autonomes » ([Gooley et al., 2006](#); [Guilding and Piggins, 2007](#)). Enfin les horloges dites « autonomes », sont capables d'osciller de manière auto-entretenue, de transmettre leur rythmicité à d'autres structures et sont entraînaibles par un synchroniseur (lumière, nourriture, etc...). On trouve plusieurs horloges

autonomes dans le système nerveux central, comme par exemple les SCN mais également la rétine (Guilding and Piggins, 2007).

### b. L'horloge circadienne de la rétine

En effet, la rétine contient une horloge circadienne autonome, indépendante des SCN (Tosini and Menaker, 1996). A la différence des SCN dont la rythmicité varie en partie à travers le couplage du *core* et du *shell* (Evans et al., 2015), il existe dans la rétine au moins un oscillateur par couche nucléaire (ONL, INL, GCL) et le couplage de ses oscillateurs semble être au cœur du fonctionnement de l'horloge circadienne rétinienne (Jaeger et al., 2015). Tout comme les SCN, l'horloge rétinienne est entraînable par le cycle lumière/obscurité (Tosini and Menaker, 1996), mais les photorécepteurs responsables du photoentraînement de l'horloge rétinienne sont encore discutés. En effet, Buhr et collaborateurs se sont intéressés à la neuropsine (OPN5), particulièrement sensible aux UV ( $\lambda=380\text{nm}$ ) et exprimée au sein des RGCs, ACs et HCs (Buhr et al., 2015). Leurs travaux suggèrent que l'OPN5 serait nécessaire voire l'unique responsable du photoentraînement de l'horloge rétinienne (Buhr and Van Gelder, 2014). Cependant, Dkhissi-Benyahya et collaborateurs ont étudié en détail l'expression des gènes horloges et l'induction de C-FOS dans les différentes couches nucléaires de la rétine après des stimulations lumineuses à différentes longueurs d'ondes. Leurs travaux démontrent clairement que la mélanopsine (OPN4) et les bâtonnets sont impliqués dans le bon fonctionnement de l'horloge circadienne et dans sa réponse à la lumière (Calligaro et al., 2019; Dkhissi-Benyahya et al., 2013). L'horloge dans la rétine est responsable de la propriété circadienne de nombreuses fonctions physiologiques parmi lesquelles on retrouve la phagocytose des disques des photorécepteurs (Bobu and Hicks, 2009), l'expression des différentes opsines et notamment de la mélanopsine (Freedman et al., 1999; Hannibal et al., 2013), le couplage nocturne *via* des jonctions GAP entre les bâtonnets et les cônes (Ribelayga et al., 2008) ou encore la libération locale de mélatonine par les photorécepteurs (Tosini and Fukuhara, 2003). En outre, la libération circadienne de mélatonine joue un rôle important en inhibant la sécrétion locale de dopamine (Doyle et al., 2002). Elles présentent donc chacune un rythme de sécrétion en antiphase, en cohérence avec leur antagonisme connu depuis longtemps également au sein d'autres structures du système nerveux comme l'hippocampe ou l'hypothalamus postérieur (Zisapel et al., 1982). En retour, ces deux neurohormones régulent le fonctionnement de l'horloge circadienne rétinienne (Hiragaki et al., 2014; Ruan et al., 2008) mais influencent également le profil électrophysiologique des photorécepteurs, notamment des ipRGCs (cf. **partie III.5.b**) (W Pack et al., 2015; Sakamoto et al., 2005; Van Hook et al., 2012). Ainsi, le fait que l'horloge rétinienne puisse réguler directement les propriétés photoréceptrices, suggère que celle-ci pourrait moduler la détection et la transmission des informations servant à assurer les fonctions visuelles et non-visuelles. Afin de mieux appréhender l'implication de la rétine dans cet éventail de fonctions non-visuelles allant du photoentraînement des rythmes biologiques à régulation de l'humeur, il est maintenant nécessaire de parler des ipRGCs.

### III. Les Cellules Ganglionnaires Rétiniennes intrinsèquement photosensibles

#### 1. Découverte et généralités sur la mélanopsine et les ipRGCs

La découverte des ipRGCs il y a 20 ans (Berson et al., 2002; Provencio et al., 2000) a été faite dans le contexte de la chronobiologie, où de nombreuses équipes cherchaient à comprendre quelle structure dans la rétine était responsable du photoentraînement des rythmes biologiques (cf. chapitre III). En effet, dans les années 90, certains travaux avaient montré que des souris dépourvues de cônes et de bâtonnets étaient encore capables de synchroniser leur activité locomotrice en fonction de l'alternance jour/nuit (Kopp et al., 1998). Ces souris de souche C3H, sont porteuses d'une mutation (*retinal degeneration 1* ou *rd1*) au niveau du gène codant pour la phosphodiesterase 6 (PDE6) dans les bâtonnets qui rend cette enzyme inactive. En conséquence, une phototoxicité très importante renforcée par le stress oxydatif aboutit à la dégénérescence complète des bâtonnets en quelques semaines, puis de celle de 98% des cônes dans un second temps (*via* un mécanisme encore débattu) (Carter-Dawson et al., 1978; Han et al., 2013).

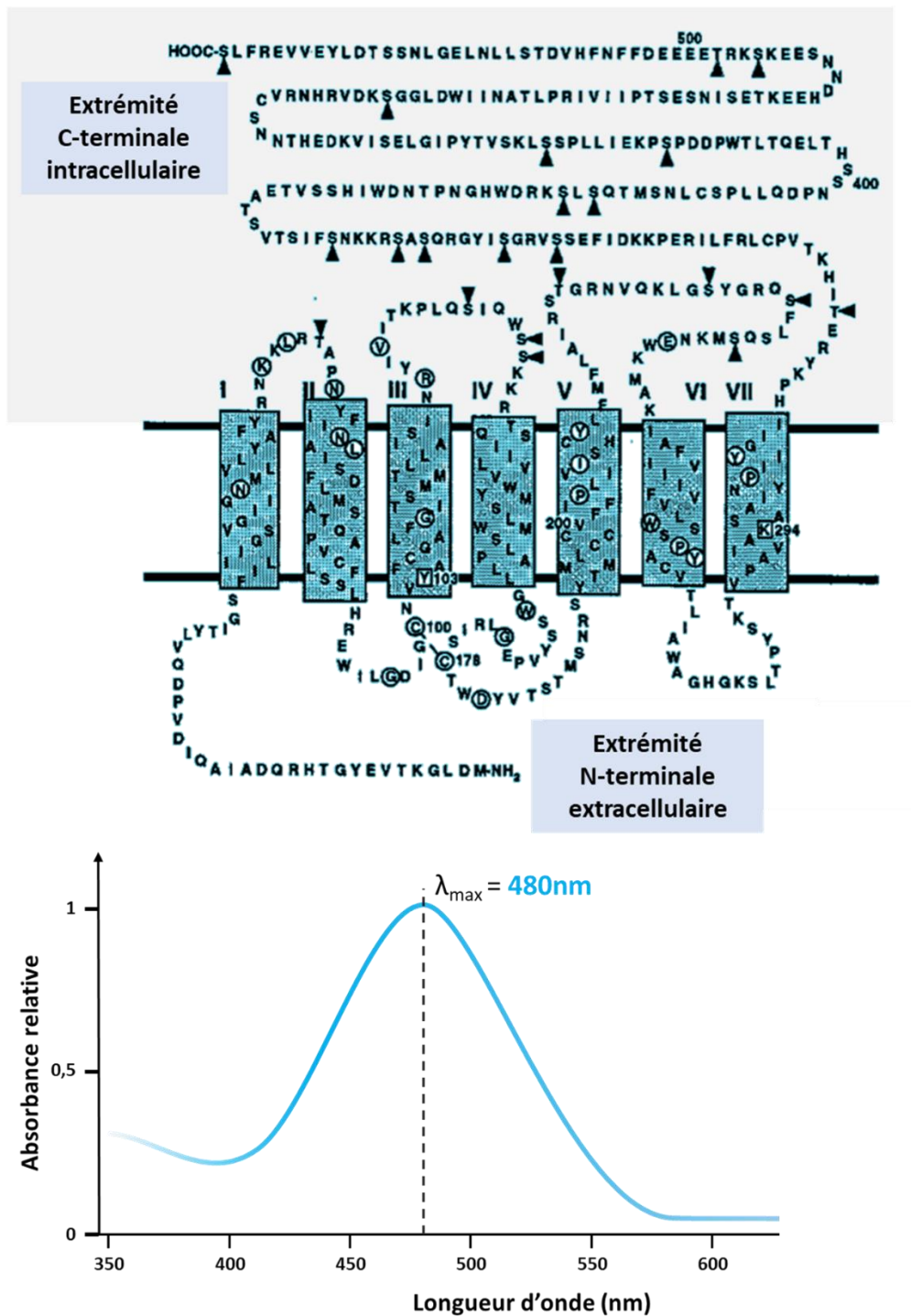
De ce fait, deux hypothèses ont été proposées : soit les 2% de photorécepteurs restants permettent d'assurer la perception de la lumière pour synchroniser les rythmes biologiques, soit un autre type de photorécepteur assurerait cette fonction. Alors que certaines études suggéraient un rôle des cryptochromes (des flavoprotéines photosensibles) (Lucas and Foster, 1999), des expériences d'énucléation confirmèrent qu'un autre photorécepteur dans la rétine, sensible à des longueurs d'onde autour de 500nm, devait être responsable du mécanisme de photoentraînement (Freedman et al., 1999).

Dans la même période, deux articles venaient de décrire une population particulière de RGCs qui sont à l'origine du RHT, principale voie anatomique pour la transmission de l'information photique vers les SCN (Moore et al., 1995). En 1998, Ignacio Provencio et son équipe découvrent la mélanopsine (OPN4), une protéine photosensible exprimée non seulement dans les mélanophores du xénope (*Xenopus laevis*), mais également dans la rétine des mammifères (Provencio et al., 1998). Enfin, la mélanopsine sera retrouvée dans une population spécifique de RGCs, en cohérence avec les précédentes publications (Provencio et al., 2000). Cette petite population de RGCs exprimant la mélanopsine (2 à 5% des RGCs selon l'espèce), sera nommée ipRGCs (Berson et al., 2002). L'expression de la mélanopsine par ces cellules leur confère une photosensibilité particulièrement accrue aux longueurs d'onde autour de 480nm (**figure 13**) chez les rongeurs et les primates (Bailes et al., 2013; Hankins et al., 2008; Lucas et al., 2014). En termes de profil neurochimique, les ipRGCs colibèrent du glutamate et le neuropeptide PACAP (Hannibal and Fahrenkrug, 2004). Plus récemment, il a été démontré que certaines ipRGCs seraient dopaminergiques ou encore GABAergiques (Johnson et al., 2019; Sonoda et al., 2020a).

La mélanopsine est un photopigment appartenant à la famille des opsines de type rhabdomérique. Celles-ci diffèrent des opsines retrouvées dans les cônes et les bâtonnets qui appartiennent à la famille des opsines de type ciliaires. Les opsines ciliaires doivent leur nom au compartiment cilié membranaire dans laquelle elles sont localisées (Jan and Revel, 1974) et constituent la majorité des opsines visuelles chez les vertébrés. En revanche, les opsines rhabdomériques de type OPN4 assurent le rôle de pigments visuels chez de nombreux invertébrés. Chez les insectes notamment, ces opsines sont localisées dans des rhabdomes, des structures translucides centrales au niveau des ommatidies (Wernet et al., 2015), qui donnent leur nom aux opsines rhabdomériques.

La mélanopsine est constituée de 7 segments transmembranaires avec une extrémité N-terminale extracellulaire et une C-terminale intracellulaire (**figure 13**). A la différence des opsines ciliées, où le chromophore (rétinal) se dissocie à la suite du changement de conformation pour être recyclé, le chromophore de la mélanopsine est lié de manière covalente et ne se dissocie pas. Ainsi, le rétinol alterne constamment entre la conformation *cis*-rétinal et *all-trans* rétinol au fur et à mesure de l'arrivée des photons (Van Gelder and Buhr, 2016). Ce mécanisme qualifié de « bistabilité » (Mure et al., 2007), ne semble cependant pas permanent. En effet, une récente étude a montré que les réponses photiques prolongées des ipRGCs reposaient en partie sur un cycle de réapprovisionnement en rétinol par le RPE (Harrison et al., 2020). Par ailleurs, la mélanopsine peut être exprimée en deux isoformes différentes (par épissage alternatif) : une isoforme longue (OPN4L) de 521 acides aminés, 40 fois moins abondante que l'isoforme courte (OPN4S) de 466 acides aminés (Pires et al., 2009). La différence entre ces deux isoformes réside au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine, l'OPN4L possédant 4 sites de phosphorylation supplémentaires (Do, 2019). Ces deux isoformes sont exprimées de façons différentielles selon les types d'ipRGCs (détaillé dans la **partie III.2**) et assurent des fonctions distinctes (Jagannath et al., 2015).

Les ipRGCs, particulièrement photosensibles à la lumière bleue, régulent en réponse à la lumière de nombreuses fonctions physiologiques et comportementales. Elles jouent un rôle dans les fonctions dites « non visuelles » mais aussi visuelles, à travers une grande hétérogénéité anatomo-fonctionnelle (**partie III.2**) et une grande diversité de fonctions *via* leurs projections centrales (**partie III.6**). La souris est le modèle le plus utilisé pour l'étude des ipRGCs grâce aux nombreuses approches transgéniques, comme le modèle OPN4-Tau-lacZ, qui a permis de mieux étudier l'anatomie et les projections de ces cellules (Hattar, 2002). En 2020, les ipRGCs sont classées en 6 différents types, des M1 aux M6, selon leur anatomie et leurs fonctions (Do, 2019).



**Figure 13 : Structure et sensibilité spectrale de la mélanopsine (OPN4).** Schéma du haut : la mélanopsine est une protéine photosensible à 7 domaines transmembranaires avec une extrémité N-terminale extracellulaire. Les deux isoformes de la mélanopsines (non représentées) diffèrent au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire, qui contient plusieurs sites potentiels de phosphorylation (indiqués par les petits triangles) impliqués dans la régulation du fonctionnement de la protéine. Schéma du bas : la mélanopsine est particulièrement sensible à la lumière bleue, avec un maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$  à 480nm chez les rongeurs et les primates. Adapté de [Proviencio et al., 1998](#) ; [Hankins et al., 2008](#).



## 2. Caractéristiques anatomo-fonctionnelles et connectivités intra-rétiniennes des différents types d'ipRGCs chez la souris

Des illustrations et un bilan des caractéristiques anatomo-fonctionnelles des différents types d'ipRGCs sont présentés dans la **figure 14** à la fin de cette partie.

### a. Type M1

Les M1 ont été les premières ipRGCs à avoir été décrites. Elles expriment une très grande quantité de mélanopsine et sont facilement révélées par immunohistochimie (Hattar, 2002). Leur soma mesure environ 15,7µm de diamètre avec un arbre dendritique de taille très variable allant de 275µm à 390µm selon la souche et l'âge des souris (Berson et al., 2010; Schmidt and Kofuji, 2011). L'arbre dendritique des M1 n'est pas particulièrement ramifié et ne forme qu'une dizaine de branches (**figure 14 A**) (Sondereker et al., 2020). Leurs dendrites passent à travers l'IPL ON et s'étendent horizontalement dans la partie OFF de l'INL. Par ailleurs, il existe une minorité de M1 dont les somas se trouvent au sein de l'INL, qui ont été appelées M1-déplacées (M1d) (en violet sur la **figure 14 A**) (Berson et al., 2002). En plus de leurs caractéristiques anatomiques, les M1 peuvent être différenciées des autres types d'ipRGCs grâce à des marqueurs moléculaires spécifiques. Alors que les types M2 à M6 expriment l'isoforme OPN4L de la mélanopsine, seules les M1 sont enrichies en isoforme OPN4S (Pires et al., 2009). Par ailleurs, alors que les RGCs expriment les facteurs de transcription BRN3a, BRN3b et BRN3c (Xiang et al., 1996), les ipRGCs expriment seulement le facteur BRN3b, à l'exception d'une sous population minoritaire de M1 qui ne l'exprime pas (S. K. Chen et al., 2011; Jain et al., 2012). Ainsi, les ipRGCs de type M1 peuvent être séparées en deux populations : M1 BRN3b-positives (80%) et M1 BRN3b-négatives (20%). Ces deux populations présentent des projections anatomiques distinctes qui seront présentées dans la **partie III.e** (S. K. Chen et al., 2011). En termes de répartition, les ipRGCs de type M1 sont asymétriquement distribuées sur la rétine, avec une forte abondance de M1 sur la partie dorsale de rétine comparée à la partie ventrale (Hughes et al., 2013).

Les M1 présentent la plus forte réponse dite intrinsèque (ou mélanopsinergique) : réponse électrophysiologique provenant uniquement de l'activation de mélanopsine, indépendamment de l'activation des bâtonnets/cônes. Cette réponse intrinsèque à la lumière est cohérente avec leur forte expression en mélanopsine. Elles répondent très rapidement par une large dépolarisation (latence < 1 seconde) avec un voltage mesuré proportionnel à l'intensité lumineuse appliquée (Do, 2019; Zhao et al., 2014). A titre de comparaison, les M1 commencent à répondre à une intensité proche de  $10 \log \text{ quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  alors que la réponse des autres types ipRGCs n'est visible qu'à partir de 12 à 13  $\log \text{ quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Elles présentent également une réponse extrinsèque (comme toutes les autres RGCs) : réponse électrophysiologique provenant uniquement de l'activation des bâtonnets/cônes, indépendamment de la mélanopsine. Même si cette réponse extrinsèque est moins importante que la réponse intrinsèque, elle démontre l'activation possible des ipRGCs par les

photorécepteurs (Zhao et al., 2014). De façon surprenante, malgré leur prolongement dans l'IPL OFF, la réponse extrinsèque des M1 à la lumière est de type ON (dépolarisante). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que les M1 forment des synapses *en passant* avec les BCs ON de cônes dans l'IPL OFF (Dumitrescu et al., 2009). A noter que dans des conditions où la rétine est *adaptée à l'obscurité* (« *dark-adapted* »), la réponse extrinsèque des M1 est très similaire à celle des autres types d'ipRGCs (Zhao et al., 2014), alors que l'intensité de cette réponse se trouve fortement diminuée dans des conditions où la rétine est *adaptée à la lumière* (« *light-adapted* ») (Schmidt and Kofuji, 2009; Sondereker et al., 2020). Ainsi en termes de connectivité, les M1 reçoivent des informations provenant à la fois des cônes-M/cônes-S mais aussi des bâtonnets, ce qui permet aux ipRGCs de détecter des signaux chromatiques et de très basse intensité lumineuse (Lee et al., 2019; Schmidt and Kofuji, 2010). Par ailleurs, les axones des M1 forment des collatérales qui projettent au niveau de l'INL au contact des cellules amacriques. Ces collatérales des ipRGCs fournissent un signal « feedback » sur l'INL qui régule la libération de dopamine par les ACs, entraînant des conséquences sur la transmission dopaminergique et sur l'intégration des signaux visuels (Dkhissi-Benyahya et al., 2013; Prigge et al., 2016).

### b. Types M2 et M3

Les M2 et M3 expriment une quantité plus réduite de mélanopsine comparée aux M1 et sont plus difficilement discernables en immunohistochimie. Le soma des M2 mesure environ 18,2µm avec un arbre dendritique dont la taille varie de 314µm à 445µm (Berson et al., 2010; Schmidt and Kofuji, 2009). Cet arbre dendritique diffère de celui des M1 par sa position au niveau de la couche plexiforme interne ON et par une ramification un peu plus importante avec en moyenne 24 branches (**figure 14 B**) (Sondereker et al., 2020). En revanche, la répartition des M2 sur la rétine est similaire à celle des M1, avec une abondance sur la partie dorsale de la rétine (Hughes et al., 2013). Dues à l'expression diminuée en mélanopsine, les M2 démontrent des réponses intrinsèques à la lumière 10 fois moins amples que les M1 (Estevez et al., 2012; Schmidt and Kofuji, 2009), avec une latence plus élevée ( $\pm 5$  secondes) qui se traduit par une dépoliarisation progressive et proportionnelle à l'intensité lumineuse (Zhao et al., 2014). Les M2 reçoivent également des informations provenant des cônes et notamment des cônes-M (Sondereker et al., 2020), avec une réponse extrinsèque ON similaire à celle des M1.

Concernant les M3 (**figure 14 C**), elles constituent une classe très débattue d'ipRGCs par leur rareté (moins de 10% des 2400 ipRGCs chez la souris) (Berson et al., 2010; Valiente-Soriano et al., 2014) et leurs caractéristiques mixtes entre les M1 et les M2 (Sondereker et al., 2020). Certaines études ont suggéré qu'elles pourraient provenir « d'accidents développementaux » (Do, 2019; Masland et al., 1993), figées dans un phénotype hybride M1/M2. Alors que leur soma est d'environ 16µm avec un arbre dendritique large de 450µm (Pérez De Sevilla Müller et al., 2010), les prolongements dendritiques se trouvent à la fois dans les couches ON et OFF de l'IPL. Les études sur les réponses intrinsèques et extrinsèques des M3 ont montré qu'elles sont très similaires au type M2 (Schmidt and Kofuji, 2011).

### c. Types M4 et M5

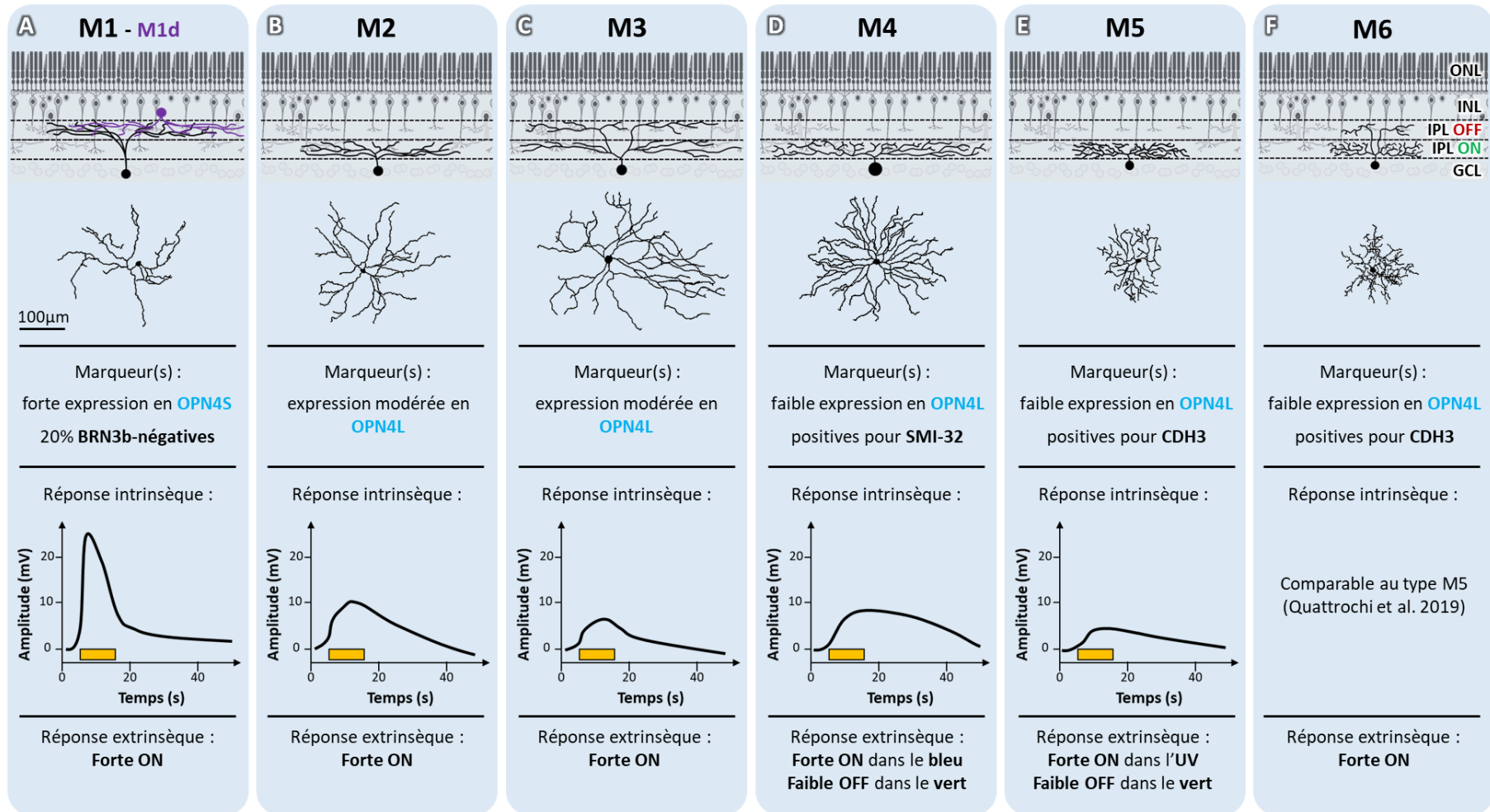
Les ipRGCs de type M4 et M5 expriment une faible quantité de mélanopsine, les rendant impossible à détecter en immunohistochimie sans amplification de signal par tyramide (TSA) (Sondereker et al., 2020).

Les M4 (**figure 14 D**) semblent correspondre anatomiquement et fonctionnellement à une population de RGCs précédemment décrite, les RGCs- $\alpha$  ON (Sondereker et al., 2020; Sonoda et al., 2020b). Elles peuvent notamment être différenciées des autres types d'ipRGCs car elles sont les seules à exprimer la protéine de neurofilament SMI-32 (Sonoda et al., 2018). Le soma des M4 est le plus large parmi les différents types d'ipRGCs : sa taille varie de 24,2 $\mu$ m à 21,3 $\mu$ m selon si la cellule se trouve respectivement dans la partie nasale de la rétine (M4<sub>(n)</sub>) ou temporale (M4<sub>(t)</sub>). Le diamètre de l'arbre dendritique varie de 207,6 $\mu$ m (M4<sub>(t)</sub>) à 371,9 $\mu$ m (M4<sub>(n)</sub>) et présente plus de branches (entre 30 et 35) que les types M1 et M2 (Estevez et al., 2012; Sondereker et al., 2020). Cet arbre dendritique se prolonge comme pour les M2 au sein de la l'IPL ON. Bien que la quantité de mélanopsine exprimée soit faible chez les M4, ce type cellulaire présente une particularité qui n'est pas encore clairement expliquée : la réponse intrinsèque est très faible lorsque la rétine est *adaptée à la lumière* (Estevez et al., 2012) mais atteint une amplitude similaire à celle des M2 en condition *adaptée à l'obscurité*, tout en restant inférieure à celle des M1 avec une latence élevée ( $\pm$  8 secondes) (Sondereker et al., 2020; Zhao et al., 2014). La réponse extrinsèque des M4 est globalement de type ON mais présente une opposition chromatique (seulement quand la rétine est *adaptée à la lumière*) : La réponse est fortement ON lorsqu'elles sont stimulées par de la lumière bleue (470nm) et faiblement OFF lorsque la lumière est verte (540nm) (Sonoda et al., 2020b). La réponse extrinsèque ON des M4 serait majoritairement due à des connections avec des BCs ON de cônes (Schwartz et al., 2012; Sondereker et al., 2020) alors que la propriété d'opposition de couleur serait médiée par des connections avec des ACs GABAergiques (Sonoda et al., 2020b; Stabio et al., 2018).

Les ipRGCs de type M5 (**figure 14 E**) ont une morphologie assez compacte, avec un soma de petite taille ( $\pm$ 14,2 $\mu$ m) et un arbre dendritique d'environ 224 $\mu$ m de diamètre (Stabio et al., 2018). Une récente étude a démontré qu'elles exprimaient avec les M6 la cadhérine-3 (CDH3) (Quattrochi et al., 2019). Elles sont facilement discernables des M1-M4 par la densité de leur arbre dendritique, qui peut former plus de 50 branches. Cet arbre dendritique s'étend dans la partie ON de l'IPL de façon similaire aux M4 (Sondereker et al., 2020; Sonoda et al., 2020b; Stabio et al., 2018). La réponse intrinsèque des M5 est faible avec une latence assez élevée ( $\pm$  6 secondes), en accord avec leur faible expression de mélanopsine (Zhao et al., 2014). La réponse extrinsèque des M5 est de type ON mais présentent également une opposition chromatique : la réponse est fortement ON lorsqu'elles sont stimulées par de l'UV (360nm) et faiblement OFF lorsque la lumière est verte (540nm). Ces caractéristiques électrophysiologiques seraient également expliquées par des connections avec des BCs ON de cônes et des ACs GABAergiques (Sonoda et al., 2020b; Stabio et al., 2018).

#### d. Type M6

Les ipRGCs de type M6 (**figure 14 F**) ont été très récemment décrites par Quattrochi et collaborateurs ([Quattrochi et al., 2019](#)). Elles expriment la cadhérine-3 (CDH3), qui permet de les visualiser facilement dans un modèle de souris transgénique Cdh3-GFP. Leur soma est le plus petit parmi les ipRGCs ( $\pm 12,7\mu\text{m}$ ) avec un arbre dendritique d'environ  $216\mu\text{m}$  de diamètre. Cet arbre dendritique est le plus dense de ceux retrouvés chez les ipRGCs, avec une centaine de branches, se prolongeant à la fois dans l'IPL ON (80%) et OFF (20%). Elles sont asymétriquement dispersées sur la rétine de façon similaire aux M5, avec une concentration ventrale plus élevée comparée à la rétine dorsale. En termes de profil électrophysiologique, elles présentent une faible réponse intrinsèque qui est cohérente avec leur faible expression de mélanopsine. Malgré une anatomie bistratifiée, les M6 démontrent une réponse extrinsèque forte de type ON. Elles formeraient comme les M1, des synapses *en passant* avec les BCs ON de cônes dans l'IPL OFF ([Quattrochi et al., 2019](#); [Sondereker et al., 2020](#)).



**Figure 14 : Comparaison anatomique et fonctionnelle des différents types d'ipRGCs chez la souris.** De haut en bas : représentation des ipRGCs sur le plan transversal ; représentation anatomique des ipRGCs vue du dessus ; marqueur(s) spécifique(s) ; tracés des réponses intrinsèques (redessinés de Zhao et al. 2014) à la suite d'une stimulation lumineuse de 10 secondes à  $13.5 \log \text{ quanta cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Ces réponses ont été obtenues en condition *dark-adapted* ; caractéristiques des réponses extrinsèques. Noter que l'opposition chromatique des M4 n'est présente qu'en condition *light-adapted*. Adapté de Sondereker et al., 2020 ; Quattrochi et al., 2019 ; Sonada et al., 2020.

### 3. Les types d'ipRGCs chez l'Homme et d'autres mammifères

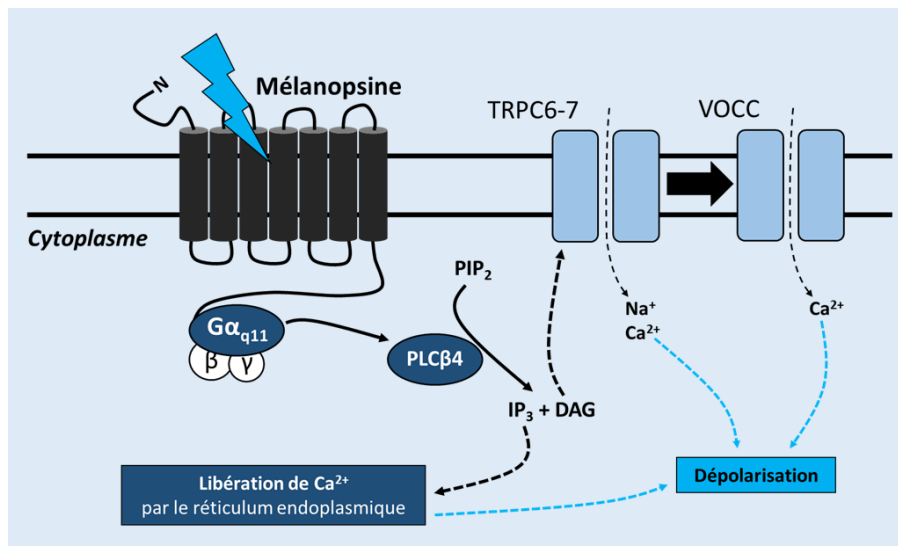
Les différentes classes d'ipRGCs semblent relativement bien conservées au sein des mammifères (Sondereker et al., 2020). Chez le rat, les types M1 à M5 trouvent leur correspondance aussi bien anatomiquement que du point de vue fonctionnel (Reifler et al., 2015). En 2017, des équivalents des types M1-M3 de souris ont été décrites chez une espèce de chauve-souris (*Rhinolophus ferrumequinum*) (Jeong et al., 2018). Enfin, une autre étude chez les Scandentiens (un ordre de petits mammifères placentaires au mode de vie arboricole) a démontré la présence d'ipRGCs similaires aux types M1 et M2 décrits chez la souris (Johnson et al., 2017). Chez l'Homme, les derniers travaux d'Hannibal et collaborateurs révèlent 5 différents types d'ipRGCs (Hannibal et al., 2017), semblables aux M1, M2, M3 et M4 de souris en plus d'un type particulier de « gigantic » M1. Ces dernières sont caractérisées par des prolongements dendritiques dans la couche plexiforme ON (similaire aux M1), mais avec un soma bien plus volumineux (similaire aux M4). Chez la souris, la majorité des réponses extrinsèques des ipRGCs sont générées par des BCs ON et des ACs, toutes les classes d'ipRGCs recevant des informations provenant des bâtonnets (Wong et al., 2007; Zhao et al., 2014). Chez l'Homme, bien que l'absence de données électrophysiologiques complique la modélisation des réponses intrinsèques et extrinsèques, la description anatomique des synapses à l'aide de différents marqueurs a permis de mettre en évidence des connections ipRGCs-BCs / ipRGCs-ACs qui sont similaires aux connections retrouvées chez la souris (Hannibal et al., 2017; Sondereker et al., 2020). En somme, il est intéressant de noter que ces données attestent d'une certaine conservation des types d'ipRGCs chez les mammifères et particulièrement du type M1, qui est connue pour être l'acteur central des effets « non visuels » de la lumière, notamment en tant que régulateur des rythmes biologiques.

### 4. Mécanisme de phototransduction au sein des ipRGCs

La phototransduction au sein des cônes et des bâtonnets est discutée dans la **partie I.2.b** et correspond à une phototransduction de type ciliaire : ce type de phototransduction utilise comme intermédiaire de signalisation un nucléotide cyclique (ici le GMPc) (Jiang et al., 2018; Yau and Hardie, 2009) qui va modifier l'ouverture des canaux CNG. La phototransduction de type rhabdomérique fait intervenir dans la voie de signalisation une PLC, qui modifie l'ouverture de canaux « *transient receptor potential cation* » (TRPC) perméables au Na<sup>+</sup> et au Ca<sup>2+</sup> (Yau and Hardie, 2009). A la différence de la phototransduction de type ciliaire, la stimulation lumineuse *via* la signalisation de type rhabdomérique induit une dépolarisation de la membrane plasmique par ouverture des canaux TRPC (**figure 15**).

La stimulation de la mélanopsine entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique des ipRGCs, ce qui est cohérent avec la nature rhabdomérique du photopigment (Isoldi et al., 2005). Plusieurs études ont ainsi cherché à préciser les différents acteurs de la cascade de signalisation intracellulaire et peu après 2010, la voie de signalisation de la mélanopsine a été

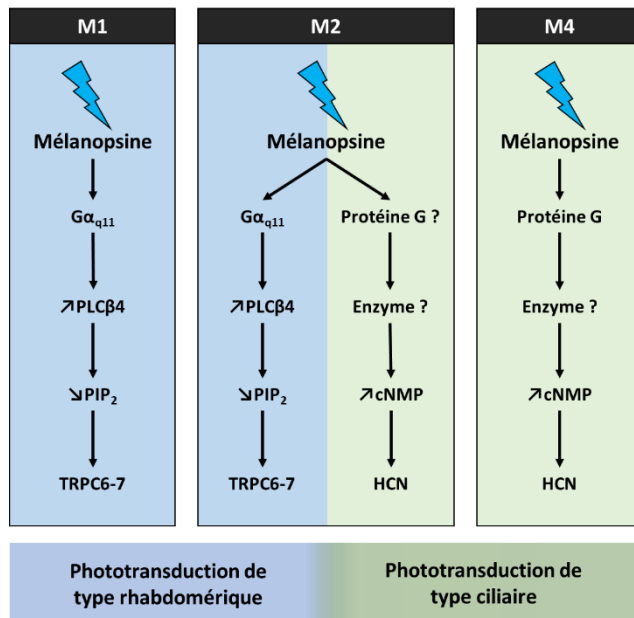
en grande partie décrite (Graham et al., 2008; Hughes et al., 2012a; Xue et al., 2011). La photostimulation de la mélanopsine provoque l'activation de la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  qui active à son tour la PLC $\beta$ 4. Celle-ci convertit le Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP $_2$ ) en IP $_3$  et en DAG. L'IP $_3$  et le DAG provoquent alors une augmentation intracellulaire de Ca $^{2+}$  qui permet l'ouverture des canaux TRPC6 et TRPC7 entraînant la dépolarisation de la membrane. La dépolarisation est amplifiée par le recrutement dans un deuxième temps de canaux calcique voltage-opérant (VOCC). L'inactivation de la mélanopsine s'opère non seulement par phosphorylation de l'extrémité C-terminale de la protéine (Blasic et al., 2012b; Somasundaram et al., 2017), mais impliquerait également des protéines de type arrestine. Alors que la  $\beta$ -arrestine-2 assure l'arrêt du signal mélanopsinergique, la  $\beta$ -arrestine-1 est nécessaire à la régénération du photopigment, participant à la capacité de signalisation soutenue dans le temps de la mélanopsine (Ruda et al., 2018).



**Figure 15 : Voie de phototransduction de type rhabdomérique dans les ipRGCs.** La stimulation de la mélanopsine par la lumière bleue (470nm) entraîne l'initiation d'une cascade de signalisation  $G\alpha_q/PLC$ . Cette signalisation aboutit à l'ouverture des canaux TRPC/VOCC provoquant la dépolarisation de la cellule par entrée de calcium et de sodium. Adapté de Hughes et al., 2012.

Ces dernières années, les études électrophysiologiques des ipRGCs de souris knock-out (KO) pour de nombreuses molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire ont remis en question ce modèle unique de phototransduction rhabdomérique au sein des ipRGCs. La délétion des gènes codant pour les protéines PLC $\beta$ 4/TRPC1-7/ $G\alpha_{q/11}$  induit la perte totale du signal mélanopsinergique au sein des M1, mais n'affecte que partiellement la réponse intrinsèque des M2/M4 (Jiang et al., 2018). Cette récente étude a également démontré qu'il existait au sein des M2/M4 une signalisation de type ciliaire (figure 16), où l'activation de la mélanopsine induisait une augmentation de nucléoside-monophosphate cyclique (NMPC) qui provoque l'ouverture de canaux HCN (activés par l'Hyperpolarisation, modulés par des NMPC et non sélectif aux Cations). Alors que cette voie de phototransduction ciliaire (NMPC-HCN)

coexiste avec la voie de signalisation rhabdomérique (PLC-TRPC) au sein des M2, elle serait la voie prédominante de signalisation au sein des M4. Pour le moment, la nature des NMPc reste à déterminer (AMPC vs GMPc) et le rationnel évolutif de l'implication de canaux HCN au lieu de canaux CNG (comme dans les bâtonnets et cônes) n'est pas encore expliqué.



**Figure 16 : Coexistence des voies de signalisation rhabdomérique et ciliaire au sein des ipRGCs.** L'activation de la mélanopsine est couplée à une voie de signalisation de type rhabdomérique (en bleue) dans les M1 tandis que la voie de signalisation est exclusivement de type ciliaire (en vert) au sein des M4. La mélanopsine des M2 présente la particularité d'être associée aux deux types de voie. Plusieurs acteurs de la voie de type ciliaire au sein des ipRGCs restent encore inconnus. Adapté de [Jiang et al., 2018](#).

La mélanopsine, en tant qu'opsine rhabdomérique, présente à la fois des motifs de signalisation rhabdomérique et ciliaire. Alors que les ipRGCs expriment toutes de la mélanopsine, les type M1, M2 et M4 démontrent chacune des stratégies de phototransduction différentes, avec un motif de signalisation exclusivement rhabdomérique (M1), exclusivement ciliaire (M4) ou mixte (M2). Les mécanismes de phototransduction au sein des ipRGCs viennent remettre en question l'histoire évolutive des voies ciliaire et rhabdomérique ([Do, 2018](#); [Jiang et al., 2018](#)), estompant un peu plus la frontière entre photorécepteurs à fonctions visuelles et non-visuelles. Cette notion sera notamment illustrée à travers la diversité de fonctions assurée par les ipRGCs (cf. **partie III.6**)

## 5. Régulation du fonctionnement des ipRGCs

### a. Régulation par la lumière et par l'horloge circadienne de la rétine

Les ipRGCs semblent particulièrement sensibles à l'environnement lumineux, la plupart des études ayant mis en évidence des modifications soit au niveau de l'expression de la mélanopsine, soit au niveau de la quantité de la protéine, en réponse à différents types de protocoles lumineux. Hannibal et collaborateurs ont montré que l'expression de l'ARNm de la mélanopsine est rythmique en obscurité constante (DD), en lumière constante (LL) et en cycle LD chez le rat brun (*Rattus norvegicus*) ([Hannibal et al., 2013](#)). En revanche, la protéine n'est rythmique qu'en cycle LD et perd sa rythmicité en DD. De plus, la quantité de mélanopsine est



fortement réduite par un protocole prolongé d'exposition LL. Ces résultats suggèrent que si l'expression de l'ARNm de la mélanopsine est sous contrôle d'un processus circadien (**cf. partie II.2**), la quantité de protéine semble être régulée de manière plus importante par le cycle LD ([Hannibal et al., 2013](#)). Pourtant chez la même espèce (*Rattus norvegicus*), une autre équipe a démontré que le rythme d'expression de l'ARNm de la mélanopsine était modifié par des changements de la photopériode, mais que ce rythme d'expression n'était plus présent en DD ([Mathes et al., 2007](#)). Cette contradiction dans les résultats concernant le rythme d'expression de l'ARNm, est expliquée par le fait que l'étude d'Hannibal et collaborateurs a été réalisée chez des animaux pigmentés, alors que des rats albinos ont été utilisés dans celle de Mathes et collaborateurs. Dans la discussion de leur article, Hannibal et collaborateurs expliquent alors qu'il est possible que l'expression d'ARNm de la mélanopsine soit sous contrôle d'une horloge circadienne uniquement chez les animaux pigmentés ([Hannibal et al., 2013](#)). D'autres études ont effectivement confirmé que l'expression de l'ARNm de la mélanopsine est sous contrôle de l'horloge circadienne de la rétine (**cf. partie II.7**) ([Bobu et al., 2013](#)) mais également que les réponses intrinsèques des ipRGCs à la lumière présentaient une variation circadienne ([Weng et al., 2009](#)). En ce qui concerne la régulation de la protéine, une autre équipe travaillant sur la toxicité des diodes électroluminescentes (LEDs) a également récemment constaté qu'une exposition prolongée à un protocole LL induisait une perte importante de l'immunoréactivité de la mélanopsine dans les dendrites des ipRGCs ([Benedetto et al., 2017](#)). En conclusion, les profils fonctionnels des ipRGCs sont très certainement affectés non seulement par une régulation circadienne de l'expression de l'ARNm de la mélanopsine, mais également par l'exposition à la lumière qui affecte à la fois l'expression de l'ARNm et la quantité de mélanopsine.

#### **b. Régulation par la dopamine et la mélatonine**

La dopamine et la mélatonine sont deux neurohormones sécrétées localement et de manière rythmique au sein de la rétine ([Doyle et al., 2002](#); [Pierce and Besharse, 1988](#)) notamment sous contrôle de l'horloge circadienne de la rétine (**cf. partie II.7**). La mélatonine est libérée durant la nuit par les photorécepteurs ([Tosini and Menaker, 1996](#)) alors que la dopamine est libérée le jour par les ACs ([Witkovsky, 2004](#)). Ces deux hormones influencent la physiologie globale de la rétine et plusieurs études se sont intéressées à leurs effets sur les photorécepteurs, y compris les ipRGCs.

Les récepteurs MT1 et MT2 sont exprimés par les 5 grandes classes de neurones de la rétine (bâtonnets/cônes, BCs, ACs, HCs et RGCs) ([Huang et al., 2013](#); [Wiechmann and Sherry, 2013](#)) et notamment par les ipRGCs de types M1 et M4 ([W Pack et al., 2015](#); [Sengupta et al., 2011](#); [Sheng et al., 2015](#)). Cette expression suggère une modulation des ipRGCs par la mélatonine. Pack et collaborateurs ont démontré par une étude électrophysiologique *in vitro* que l'application de mélatonine dans le milieu induisait une augmentation de la durée et de l'amplitude de la réponse électrophysiologique des ipRGCs de type M4 à la lumière ([W Pack et al., 2015](#)). L'application de luzindole (un antagoniste des récepteurs MT1/MT2) en plus de la mélatonine entraîne un retour à la normale de la réponse des M4. De plus, des analyses immunohistochimiques post-enregistrement ont démontré que les M4 exprimaient le

récepteur MT1. Ces résultats démontrent que la libération locale de mélatonine est capable de moduler le profil électrophysiologique des ipRGCs *via* le récepteur MT1. Parmi les études sur la dopamine, Van Hook et collaborateurs ont démontré que l'application de dopamine *in vitro* entraîne une diminution significative de la réponse intrinsèque à la lumière des ipRGCs de type M1 (Van Hook et al., 2012). De plus, l'application de SKF38393 (un agoniste des récepteurs D1 de la dopamine) mime l'effet de la dopamine alors que l'application de quinpirole (un agoniste des récepteurs D2 de la dopamine) n'a aucun effet. Enfin, le récepteur D1a a été localisé au niveau des ipRGCs par analyse immunohistochimique. Ces données démontrent que la sécrétion locale de dopamine dans la rétine est capable de moduler le profil électrophysiologique des ipRGCs de type M1 *via* le récepteur D1a. Par ailleurs, une autre étude a également constaté que la dopamine pouvait réguler à la fois l'expression de l'ARNm de la mélanopsine et de l'ARNm du PACAP, probablement *via* un récepteur de type D2 (Sakamoto et al., 2005). Il est intéressant de souligner que les M1, qui stimulent la libération de dopamine par les ACs *via* des collatérales axonales (Dkhissi-Benyahya et al., 2013), pourraient réguler à travers ce circuit leur propre réponse électrophysiologique.

En conclusion, la sécrétion nocturne de mélatonine dans la rétine entraîne une augmentation de la réponse à la lumière des M4 *via* le récepteur MT1 (W Pack et al., 2015), alors que la sécrétion diurne de dopamine provoque une diminution de réponse intrinsèque à la lumière des M1 *via* le récepteur D1a (Van Hook et al., 2012) et peut également moduler l'expression des ARNm de la mélanopsine et du PACAP *via* un récepteur de type D2 (Sakamoto et al., 2005). Cette modulation des ipRGCs par ces neurohormones pourrait ainsi jouer un rôle important dans l'ajustement de la sensibilité rétinienne et dans la régulation des fonctions visuelles et non-visuelles.

## 6. Projections anatomiques et fonctions des différents types d'ipRGCs

Les premières études s'intéressant aux projections anatomiques des ipRGCs ont été possibles grâce à des constructions génétiques chez la souris, notamment le modèle transgénique OPN4-Tau-lacZ, permettant de visualiser les projections des ipRGCs vers différentes structures centrales (Hattar, 2002). Durant cette dernière décennie, les projections des ipRGCs ont été très étudiées à l'aide de différentes méthodes (traçage, transfection virale, modèle transgénique) qui ont permis de mettre en évidence la grande diversité des structures contactées par ces ipRGCs. Le tableau ci-dessous liste les structures connues contactées par l'ensemble des ipRGCs. Il a été établi à l'aide d'un atlas de cerveau de souris (Keith B.J. Franklin & George Paxinos, 2007) en combinant les résultats de différentes études et revues (An et al., 2020; Delwig et al., 2016; Do, 2019; Kirkwood et al., 2018; Legates et al., 2014; Li and Schmidt, 2018; Sondereker et al., 2020). Avec la découverte de 6 types d'ipRGCs et de marqueurs spécifiques (BRN3b, SMI-32) (cf partie III.2), ces méthodes ont permis de mieux cartographier les projections et de comprendre les fonctions des différents types. Ce chapitre sera également l'occasion d'illustrer comment les différents types d'ipRGCs viennent remettre en question la dichotomie entre fonctions visuelles et non-visuelles.

Régions	Noyaux/Aires	Projections des ipRGCs
<b>Hypothalamus</b>	Aire préoptique latérale (LPO)	Modérées à faibles
	Aire préoptique médiane (MPO)	
	Aire préoptique ventrolatérale (VLPO)	
	Hypothalamus antérieur (AH)	Modérées
	Hypothalamus latéral (LH)	Faibles
	Hypothalamus ventromédian (VMH)	Faibles
	Noyaux rétrochiasmatiques (RCh)	Modérées
	Noyaux suprachiasmatiques (SCN)	Très abondantes
	Noyaux supraoptiques (pSON)	Modérées
	Zona Incerta (ZI)	Modérées
	Zone subparaventriculaire (SPZ)	
<b>Strie terminale</b>	Noyaux du lit de la strie terminale (BNST)	Modérées à faibles
<b>Amygdale</b>	Amygdale médiane (MeA)	Modérées
	Amygdale antérieure (AA)	Modérées à faibles
	Amygdale centrale (CeA)	
<b>Thalamus &amp; épithalamus</b>	Habénula latérale (LHb)	Modérées
	Noyau perihabénulaire (PHb)	Abondantes
	Noyau géniculé latéral dorsal (dLGN)	Très abondantes
	Noyau géniculé latéral ventral (vLGN)	
	Feuillet intergéniculé (IGL)	
	Noyau centro-latéral thalamique (CL)	Modérées à faibles
	Noyau centro-médian thalamique (CM)	Modérées à faibles
<b>Mésencéphale</b>	Colliculi supérieurs (SC)	Très Abondantes
	Noyau olivaire prétectal (OPN)	Abondantes
	Noyau prétectal antérieur (APT)	Modérées
	Noyau prétectal médial (MPT)	Abondantes
	Noyau prétectal postérieur (PPT)	Modérées
	Noyau du tractus optique (NOT)	Abondantes
	Substance grise périaqueducule (PAG)	Faibles

**Tableau 1 : Liste des structures cérébrales contenant les fibres des ipRGCs chez la souris.** Les projections ont été classées par régions cérébrales puis par noyaux/aires. Cette liste prend en compte les projections de tous les types d'ipRGCs. Pour chaque structure, l'importance des projections est estimée de très abondante (plusieurs dizaines de fibres, marquage saturé) à faible (quelques fibres, très peu de marquage). Selon [Legates et al., 2014](#) ; [Delwig et al., 2016](#) ; [Fernandez et al., 2018](#) ; [Schmidt et al., 2018](#) ; [Do 2019](#) ; [An et al., 2020](#) ; [Sondereker et al., 2020](#).

### a. Type M1

Pour préciser le rôle des ipRGCs de type M1, Jagannath et collaborateurs ont utilisé une approche par RNA interférant pour inhiber les réponses intrinsèques des ipRGCs enrichies en isoforme OPN4S (M1) ou OPN4L (non-M1) (Jagannath et al., 2015). Leurs travaux ont permis de démontrer que l'inhibition des M1 entraînait une altération de l'effet de masquage négatif, de la fonction de photoentraînement des SCN (cf. partie II.4.c) et du PLR. Leurs résultats sont complétés par d'autres études qui montrent que les M1 sont divisées en deux populations (M1 BRN3b-positives et les M1 BRN3b-négatives) (Jain et al., 2012) et que ces deux populations présentent des patterns de projections distincts. En effet, les M1 BRN3b-négatives projettent majoritairement vers les SCN et assurent le photoentraînement de l'horloge. M1 BRN3b-positives projettent vers d'autres structures comme l'OPN et régulent le PLR. Pour démontrer le lien anatomo-fonctionnel, Chen et collaborateurs ont délété génétiquement les ipRGCs BRN3b-positives dans un modèle de souris transgénique *Opn4<sup>Cre/+</sup> Brn3b<sup>Z-dta/+</sup>* ne laissant que les M1 BRN3b-négatives intactes. Ces souris présentent une altération du PLR (diminué d'environ 50%) alors que le photoentraînement des SCN est comparable à une souris contrôle (S. K. Chen et al., 2011).

La projection des M1 au niveau de la VLPO est impliquée dans la régulation par la lumière du rythme veille/sommeil, avec un effet biologique opposé selon le sous-type : les M1 BRN3b-positives participeraient à l'induction du sommeil alors que les M1 BRN3b-négatives seraient plutôt impliquées dans l'éveil (Pilorz et al., 2016; Sondereker et al., 2020). La projection des M1 vers les zones habénulaires (LHb, PHb) suggèrent également que ces cellules jouent un rôle dans la régulation de l'humeur et des comportements motivés par la lumière. Cette hypothèse a été récemment confirmée par deux études récentes : la première de Fernandez et collaborateurs démontre que les M1 BRN3b-positives sont impliquées dans l'apparition des comportements de type anxio-dépressif provoqués par un protocole lumineux aberrant *via* la voie M1-PHb (Fernandez et al., 2018). La deuxième de An et collaborateurs, indique que la voie M1-PHb-Noyau accumbens (NAc) serait au centre des effets de type-dépressifs induit par une exposition lumineuse la nuit pendant la phase active de la souris (An et al., 2020).

En termes d'implication dans les fonctions visuelles, les M1 BRN3b-positives régulent les mouvements oculo-moteurs *via* leur projection vers les SC et les zones prétegmentales (OPN, APT, MPT, NOT). En revanche, les M1 semblent peu impliquées dans le traitement de l'information visuelle en elle-même, leurs projections au niveau du dLGN étant peu conséquentes (Do, 2019). Il est cependant intéressant de noter que leurs projections sont plus importantes au sein du vLGN et de l'IGN (Dhande et al., 2015). Ces deux structures thalamiques ont été étudiées dans le contexte du photoentraînement circadien *via* le GHT, qui colibèrent du GABA et du NPY sur les SCN. Même si le rôle du GHT n'est pas encore clairement établi, il pourrait inhiber les réponses circadiennes à très basse intensité lumineuse, afin d'éviter une déstabilisation du photoentraînement (Brown, 2016). Ces données suggèrent alors que le photoentraînement des rythmes biologiques par les M1 résulterait à la fois d'entrées activatrices (RHT) et inhibitrices (GHT) (Brown, 2016; Jacob et al., 1999).

Cependant, les fonctions d'une grande partie des projections M1 ne sont toujours pas clarifiées, par la difficulté à cibler spécifiquement certaines voies neuronales et d'en isoler les sorties physiologiques et comportementales. Les projections vers les pSON, le VMH et la ZI participeraient à la régulation par la lumière de l'humeur, de la température corporelle et de la prise alimentaire/hydrique en se basant sur la fonction de ces structures (Mitrofanis, 2005; Sondereker et al., 2020). Par ailleurs, les projections M1 vers l'amygdale (MeA, AA, CeA) ont été très peu explorées et pourraient constituer une voie supplémentaire de régulation des comportements par la lumière (Delwig et al., 2016; Legates et al., 2014; Nelson and Trainor, 2007). De plus, Les SCN contrôlent de manière circadienne un nombre important de processus (prise alimentaire, humeur, vigilance, veille/sommeil) qui se superposent aux rôles de nombreuses structures directement contactées par les ipRGCs (Lazzerini Ospri et al., 2017; Stephenson et al., 2012). Cette redondance constitue une difficulté supplémentaire pour préciser les fonctions régulées directement par la lumière *via* les ipRGCs et celles indirectement régulées par la lumière *via* les SCN.

## **b. Type M2**

Les ipRGCs de type M2 ont été décrites pour la première fois en 2008 par Baver et collaborateurs, qui ont montré qu'au moins 20% des axones qui constituent le RHT proviennent du type M2 (Baver et al., 2008). Alors que cette projection suggérait déjà un rôle des M2 dans le photoentraînement des SCN, les travaux de Jagannath et collaborateurs en 2015 viennent conforter cette hypothèse, en démontrant que l'isoforme OPN4L présente dans les M2 (peu exprimée par les M1) est impliquée dans les décalages de phase de l'activité locomotrice en réponse à la lumière (cf. PRC **partie II.4**) (Jagannath et al., 2015). Cependant, le rôle exact des M2 dans la transmission d'information vers les SCN reste encore largement méconnu (Sondereker et al., 2020).

Alors que les M1 forment environ 45% des projections ipRGCs vers le *shell* de l'OPN (OPNs) les axones des M2 constituent les 55% restant avec des projections vers le *core* de l'OPN (OPNc), mettant en évidence un rôle central du type M2 dans le PLR (Baver et al., 2008). Par ailleurs à la différence des M1, les M2 projettent de manière très importante vers le dLGN, renforçant leur rôle dans les fonctions visuelles. Cette idée est largement confortée par plusieurs études démontrant que des souris sans bâtonnets ni cônes sont toujours capables de discriminer certains patterns visuels (Ecker et al., 2010; Estevez et al., 2012), bien que certaines de ces observations pourraient être attribuées aux M4 (cf. **partie III.6.e**). En somme, d'un point de vu anatomo-fonctionnel, les M2 constituent un type d'ipRGCs au carrefour entre les fonctions visuelles et non-visuelles. Cette notion est d'autant plus intéressante du fait de la découverte récente d'une mixité ciliaire/rhabdomérique au sein de la voie de phototransduction des M2 (Jiang et al., 2018).

### c. Type M3

L'anatomie des M3 présente des caractéristiques mixtes entre M1 et M2 et leur profil électrophysiologique est très similaire à celui des M2 (cf. **partie III.2.b**) (Hu et al., 2013; Zhao et al., 2014). Alors qu'il n'y a aujourd'hui presque aucune donnée concernant les voies de projections et les fonctions des M3, certaines études suggèrent que les projections et fonctions des M3 pourraient se superposer à celles des M2 (Sondereker et al., 2020).

### d. Type M4

Les ipRGCs de type M4 sont une population décrite depuis 1974 de RGCs : les RGCs- $\alpha$  ON (Boycott and Wässle, 1974; Sonoda et al., 2020b). Les M4 projettent très largement vers le dLGN avec une organisation rétinotopique et vers les colliculi supérieurs (SC) (Estevez et al., 2012), de façon cohérente avec la fonction assurée par les RGCs- $\alpha$  ON dans la vision. Les M4 sont ainsi impliquées dans la détection et la réponse au contraste : Cette fonction reste relativement conservée en l'absence de bâtonnets et de cônes mais est altérée dans les modèles OPN4 KO (Ecker et al., 2010; Sonoda et al., 2018). Les M4 sont remarquables de par leur singulière utilisation de la mélanopsine : Alors que l'activation de la mélanopsine chez les M1 entraîne une baisse de l'excitabilité de la cellule, la faible dépolarisation membranaire des M4 (due à la faible expression en mélanopsine) a pour rôle de forcer la fermeture des canaux potassiques de repos. Cette fermeture des canaux potassiques a pour conséquence l'augmentation du potentiel membranaire des M4, ce qui les rend particulièrement excitables et immédiatement réceptives aux informations provenant des BCs (Sondereker et al., 2020; Sonoda et al., 2018). Ce mécanisme unique permettrait au M4, *via* la mélanopsine, de répondre beaucoup plus rapidement à des changements brusques de l'intensité lumineuse (détection de contraste). Il est intéressant de souligner que ce mécanisme coïncide avec une voie de signalisation mélanopsinergique exclusivement ciliaire au sein des M4 (Jiang et al., 2018).

Les M4 ne se limitent pas à des fonctions visuelles et viennent comme pour les M2, remettre en question la séparation entre fonctions visuelles et fonctions non-visuelles. En effet, une récente étude de Huang et collaborateurs a démontré que l'effet antidépresseur de la luminothérapie (cf. **partie III.8**) serait lié à une voie rétine-vLGN/IGL-LHb qui régulerait la libération de dopamine et de sérotonine respectivement *via* l'Aire Tegmentale Ventrale (VTA) et le Noyau Dorsale du Raphé (DRN) (Huang et al., 2019). Leurs études par traçage montrent que les M4 sont à l'origine des projections au niveau du vLGN/IGL qui activent des neurones GABAergiques, qui à leur tour entraînent une diminution de l'activité de la LHb. La LHb exerçant un contrôle inhibiteur sur la libération de dopamine et de sérotonine. Ainsi la lumière induit *via* les M4, une baisse d'activité de la LHb, permettant l'augmentation de la sécrétion des monoamines (dopamine et sérotonine), possiblement responsables de l'effet antidépresseur de la luminothérapie (Huang et al., 2019).

### e. Type M5

Les ipRGCs de type M5 projettent également vers le dLGN, le vLGN ainsi que vers l'IGL (Stabio et al., 2018). Elles présentent comme les M4 une réponse d'opposition chromatique, renforçant l'hypothèse du rôle de ces cellules dans les fonctions visuelles (Do, 2019; Sonoda et al., 2020b; Stabio et al., 2018). En revanche, leurs projections vers d'autres structures sont encore méconnues. Certaines études montrent que des neurones dans les dLGN et dans l'OPNc présentent des réponses UV-bleu-ON/Vert-OFF cohérentes avec des entrées provenant des M4/M5 (Denman et al., 2017; Hayter and Brown, 2018; Sondereker et al., 2020). En somme, la projection vers l'OPNc constitue la seule implication connue des M5 dans les fonctions non-visuelles, alors que leur contribution précise dans les fonctions visuelles n'est pas encore élucidée.

### f. Type M6

Les types M6 ont été très récemment découvertes et leur pattern de projections est très similaire à celui des M5, formant des connections avec le dLGN, le vLGN, l'IGL, l'OPNc, le PPT et pouvant donc assurer à la fois des fonctions visuelles (dLGN) et non-visuelles (vLGN, IGL, OPNc) (Quattrochi et al., 2019). Cependant, la contribution de leur réponse mélanopsinergique ainsi que la fonction de leur bistratification à la fois dans l'IPL ON et OFF restent à déterminer (Sondereker et al., 2020).

## 7. Implication des bâtonnets et des cônes dans les fonctions non-visuelles

Alors que les ipRGCs ont été décrites il y a 20 ans comme les principales cellules impliquées dans les fonctions non-visuelles, les données actuelles discutées dans les paragraphes précédents (cf. **partie III.6**) remettent largement en question la séparation anatomique des fonctions visuelles et non-visuelles. *A contrario*, les profils électrophysiologiques des ipRGCs sont profondément façonnés par l'activité des bâtonnets/cônes (notion de réponses extrinsèques) (cf. **partie III.2**). Ainsi, les cônes et les bâtonnets contribuent également de manière significative aux fonctions non-visuelles *via* les ipRGCs.

### a. Contribution des bâtonnets/cônes au photoentraînement des SCN

En ce qui concerne le photoentraînement des SCN, deux différentes équipes ont montré en 2008 que l'intégrité structurale des ipRGCs était essentielle pour assurer cette fonction. Güler et collaborateurs ont délété génétiquement jusqu'à 95% des ipRGCs, en introduisant le gène codant pour la sous-unité A de la toxine diphtérique (DTA) sous contrôle du promoteur de l'OPN4 (Opn4<sup>aDTA</sup>). La conséquence de cette délétion est la dégénérescence du RHT accompagnée d'une perte totale de la réponse à la lumière des SCN. Les animaux présentaient alors une activité locomotrice en libre cours (Güler et al., 2008). De leur côté, Göz et collaborateurs ont réalisé des injections intraoculaires d'une immunotoxine (anticorps anti-mélanopsine couplé à la toxine saporine) qui entraîne une dégénérescence importante allant

jusqu'à 80% des ipRGCs. Les conséquences physiologiques et comportementales sont similaires à l'étude de Güler et collaborateurs lorsque le taux de délétion est supérieur à 70% (Göz et al., 2008; Güler et al., 2008; Zhang et al., 2017). En revanche dans les modèles OPN4 KO, où les ipRGCs sont intactes mais que leur réponse intrinsèque est abolie, les animaux sont encore capables de photoentraîner (Panda et al., 2002). Ces données indiquent que les bâtonnets et les cônes pourraient contribuer significativement à cette fonction *via* les ipRGCs. Mais alors, quel type d'information pourraient apporter les bâtonnets/cônes en plus de la réponse intrinsèque des ipRGCs ? Plusieurs études ont alors émis l'hypothèse que la longueur d'onde (couleur) ou encore l'intensité lumineuse pouvait constituer des facteurs importants pour le photoentraînement de l'horloge en condition écologique (Dkhissi-Benyahya et al., 2007; Van Diepen et al., 2013; Walmsley et al., 2015).

En 2007, Dkhissi-Benyahya et collaborateurs démontrent que la délétion des cônes-M entraîne une altération de la capacité des animaux à photoentraîner, notamment en fonction de l'intensité lumineuse et de la longueur d'onde (Dkhissi-Benyahya et al., 2007). Ces données suggèrent pour la première fois que les SCN sont réceptifs à la couleur. Quelques années plus tard, plusieurs études viennent confirmer ces résultats en montrant notamment que les SCN répondent électrophysiologiquement à différentes longueurs d'onde (365nm (UV), 467nm (Bleu) et 505nm (Vert)) et ce, en l'absence de mélanopsine (Van Diepen et al., 2013). Ces résultats indiquent que la couleur constitue un signal pour l'entraînement de l'horloge (Bonmati-Carrion et al., 2017; Walmsley et al., 2015), au même titre que l'intensité lumineuse avec la découverte de l'implication des bâtonnets dans l'entraînement à très basse intensité *via* les M1 (Lee et al., 2019). Enfin, les récents travaux de Mouland et collaborateurs ont démontré que la couleur jaune est celle qui produit les réponses circadiennes les plus soutenues en termes d'activité locomotrice, expliquant que ce mécanisme serait impliqué dans la prise en compte de la variation du spectre solaire selon le moment de la journée (Mouland et al., 2019).

#### **b. Contribution des bâtonnets/cônes dans d'autres fonctions non-visuelles**

Une autre fonction non-visuelle dans laquelle l'implication des cônes et des bâtonnets a été étudiée est la régulation du sommeil. En effet, Muindi et collaborateurs ont utilisé différents modèles de souris (OPN4 KO, avec ou sans bâtonnets/cônes) pour étudier l'induction du sommeil par la lumière. Leurs résultats ont démontré que la mélanopsine et les bâtonnets/cônes participent à l'induction du sommeil, mais que l'absence de l'un d'entre eux affecte son maintien dans le temps (Muindi et al., 2014). En 2016, alors qu'ils étudient le rôle des différentes longueurs d'onde sur l'induction et le maintien du sommeil, Piorz et collaborateurs découvrent un antagonisme entre la couleur bleue et la couleur verte : La couleur bleue (470nm) favorise l'éveil et la sécrétion de corticostérone, tandis que la lumière verte (530nm) provoque une rapide induction du sommeil (Piorz et al., 2016). Ce mécanisme est altéré chez les animaux OPN4 KO, mais indique un rôle important des cônes-S/cônes-M dans la régulation du sommeil.



Les cônes et les bâtonnets pourraient également contribuer à la régulation des comportements. Différentes équipes s'intéressant au DRN ont montré qu'il existait une projection rétine-DRN composée d'environ 90% de RGCs (majoritairement  $\alpha$ -ON et  $\alpha$ -OFF) et 10% d'ipRGCs de type M1 (Li et al., 2015). Cette projection modulerait des activités sérotoninergiques/GABAergiques au sein du DRN et pourrait participer à la régulation du comportement défensif par modulation de l'état de vigilance de l'animal (Huang et al., 2017; Zhang et al., 2016). Cette forte proportion de RGCs dans les projections suggère un rôle important des bâtonnets/cônes dans le fonctionnement de cette voie. En revanche, Li et collaborateurs ne mentionnent pas le lien existant entre RGCs  $\alpha$ -ON et M4 (Boycott and Wässle, 1974; Sonoda et al., 2020b), sous-estimant potentiellement la proportion RGCs/ipRGCs dans la voie rétine-DRN.

De manière générale, la propriété d'opposition chromatique des ipRGCs de type M4 et M5 (Sonoda et al., 2020b; Stabio et al., 2018) suggère que toutes les fonctions non-visuelles régulées par ces cellules pourraient également être régulées par les cônes et les bâtonnets. Dans cette perspective, Huang et collaborateurs n'ont pas discuté des effets différentiels que pourraient procurer une lumière bleue VS verte *via* le circuit M4-LHb-NAc, sur l'effet antidépresseur de la luminothérapie (Huang et al., 2019).

## 8. IpRGCs et photopériode

Alors que les ipRGCs sont largement étudiées dans le contexte circadien, très peu d'études se sont intéressées à l'implication de ces cellules dans un contexte saisonnier. Au cours de cette introduction, la régulation de la mélanopsine par la lumière et par l'horloge circadienne rétinienne a été discutée et quelques données suggèrent que la photopériode pourrait influencer le rythme d'expression de la mélanopsine (Mathes et al., 2007). Le but de cette partie est de faire le point sur les possibles implications décrites du système mélanopsinergique dans un contexte saisonnier.

Un des moyens les plus utilisés pour étudier la sensibilité des ipRGCs chez l'Homme est la réponse pupillaire post-illumination (PIPR). Cet examen consiste à appliquer une forte stimulation lumineuse sur une rétine *adaptée à l'obscurité*. Après l'arrêt de la stimulation lumineuse, la pupille reste contractée pendant plusieurs secondes avant de retrouver son diamètre initial. La durée de la contraction post-illumination est associée à la réponse transitoire des ipRGCs et reflète la sensibilité du système mélanopsinergique (Kankipati et al., 2010). Dans le contexte saisonnier, Kawasaki et collaborateurs ont mesuré le PIPR de personnes exposées à l'hiver antarctique (photopériode courte). Leurs données montrent que le PIPR est significativement augmenté dans les conditions hivernales, notamment en réponse à la lumière bleue (Kawasaki et al., 2018). Cette étude suggère que la sensibilité de la rétine, notamment des ipRGCs, est modifiée en réponse aux variations de la photopériode.

Les variations de la photopériode sont également associées à l'émergence du trouble affectif saisonnier (SAD). Le SAD est favorisé par un raccourcissement de la photopériode qui se produit en automne/hiver et correspond à un état dépressif qui se manifeste à l'arrivée de l'automne et qui disparaît spontanément à l'arrivée du printemps (Meesters and Gordijn, 2016). Un des traitements les plus efficaces pour lutter contre le SAD est la luminothérapie. Celle-ci consiste à s'exposer au moins 30 minutes en début de journée à une lumière artificielle à forte intensité (>10 000 lux) qui reproduit au maximum le spectre solaire. Le SAD affecte 1 à 10% de la population selon l'amplitude des variations de la photopériode (importante dans les hautes latitudes) mais les causes exactes du trouble ne sont pas encore élucidées. Plusieurs études suggèrent que le terrain génétique jouerait un rôle important dans la prévalence du SAD : des mutations pourraient affecter les gènes horloges, entraînant des conséquences comportementales (variation de l'humeur, du chronotype) et physiologiques (variation de la libération des monoamines) (Garbaza and Benedetti, 2018). En 2011, Vandewalle et collaborateurs ont évalué les réponses de sujets sains et de sujets atteints de SAD à des tâches émotionnelles pendant une acquisition en IRMf, tout en étant exposés à de la lumière bleue ou verte. Leurs résultats montrent une réponse différentielle au niveau de l'hypothalamus postérieur en fonction de la nature de la lumière (bleue ou verte), seulement chez les sujets atteints de SAD (Vandewalle et al., 2011). Cette étude démontre qu'en condition de SAD, la lumière a un impact différentiel sur le traitement émotionnel au niveau de l'hypothalamus, qui pourrait être relié aux altérations du sommeil, de la prise alimentaire ou encore de l'humeur.

En ce qui concerne les ipRGCs, Roecklein et collaborateurs ont découvert que des mutations dans le gène *opn4* pouvaient être associées avec une prédisposition au SAD (Roecklein et al., 2009). En 2013, la même équipe a démontré que le PIPR était significativement réduit chez les sujets SAD, témoignant d'une diminution de la réponse mélanopsinergique (Roecklein et al., 2013). En parallèle, une autre étude a démontré que la luminothérapie permettrait de réduire significativement les altérations de l'électrorétinogramme (ERG) observées chez les sujets atteints de SAD (Lavoie et al., 2009). En somme, il est plausible qu'une partie des symptômes associés au SAD soit expliquée par une altération de la modulation du système mélanopsinergique en réponse aux variations de la photopériode (Kawasaki et al., 2018; Roecklein et al., 2009). Une revue de Porcu et collaborateurs de 2018 discute d'une neuroplasticité du système circadien en réponse aux variations de la photopériode. Cette neuroplasticité se traduit à travers des modifications saisonnières de la cinétique d'expression des gènes horloges, de la neurotransmission monoaminergique et même de la connectivité au sein de structures comme l'hippocampe. Les auteurs y suggèrent que les ipRGCs pourraient prendre part à cette neuroplasticité et constituer un pivot important dans les modifications comportementales induites par les changements de saisons (Porcu et al., 2018).

## IV. Impact de la lumière artificielle enrichie en bleu sur la santé et le comportement

### 1. Généralités sur la lumière naturelle, artificielle et l'utilisation des écrans

Au cours des premiers chapitres de cette introduction, il a été montré que la lumière solaire est essentielle au bon fonctionnement de notre organisme, en régulant un grand nombre de processus physiologiques et comportementaux. Une exposition insuffisante ou aberrante à la lumière naturelle conduit à des troubles physiologiques et de l'humeur (An et al., 2020; Kirkwood et al., 2018; Roecklein et al., 2013). En 20 ans, l'utilisation des écrans (ordinateurs, smartphones, téléviseurs) dans notre société a augmenté de manière exponentielle et occupe désormais une place centrale tant au sein de la vie professionnelle que personnelle. Ces nouvelles technologies d'affichage ont également bénéficié de la généralisation de l'éclairage par LEDs qui a remplacé progressivement l'éclairage des lampes halogènes et à incandescence. L'utilisation croissante des LEDs à la fois dans l'éclairage public et dans les technologies d'affichage est soupçonnée d'entraîner des altérations de la rétine mais également du sommeil, de la sécrétion de mélatonine et des troubles de l'humeur (Bauer et al., 2018; Krigel et al., 2016; Tosini et al., 2016). Ces effets seraient liés non seulement à l'enrichissement des LEDs en lumière bleue du fait de leur haute température de couleur (< 6000K) (Dain 2020) mais également à une exposition excessive à des horaires « inappropriés » (la nuit *via* les écrans), provoquant notamment des troubles des rythmes circadiens (Bedrosian and Nelson, 2017; Touitou et al., 2016). En Avril 2019, l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES) publie un rapport concernant l'effet des LEDs sur la santé humaine et l'environnement. Le nombre de références scientifiques comportant l'ensemble des mots clés anglais « *Artificial light ; LED ; Pollution ; Night ; Health* » est passé de 20 publications par an en 2000 à 80 publications par an en 2017, témoignant de l'intérêt porté à l'impact de l'utilisation des nouvelles technologies d'éclairage sur notre santé (Rapport de l'ANSES, avril 2019). A la différence de la lumière naturelle, la lumière artificielle (LEDs), par sa nature et ses horaires d'utilisation, altère la physiologie de la rétine, les rythmes biologiques ainsi que l'humeur et le comportement. L'objectif de ce chapitre est de faire le point sur les études et les mécanismes impliqués, y compris les ipRGCs et les fonctions non-visuelles.

### 2. Effet des LEDs et de la lumière bleue sur la vision

La lumière peut induire des dommages au niveau de l'œil, qui affectent notamment la rétine et le RPE, entraînant souvent la dégénérescence des segments externes des photorécepteurs, ce qui conduit à leur apoptose (Jaadane et al., 2015). Dans un cas, la lumière peut induire des dommages « photomécaniques », probablement *via* une augmentation locale de la température, dépendant de la quantité d'énergie absorbée et indépendamment de la composition spectrale. Dans un autre cas, la lumière peut induire des dommages

« photochimiques » *via* les longueurs d'onde du domaine du visible, soit par une stimulation courte et très intense soit par une stimulation longue et moins intense (Ham et al., 1978; Organisciak and Vaughan, 2010; Tosini et al., 2016). Le fait que l'application de certaines molécules antioxydantes puissent réduire les dommages photochimiques, place le stress oxydatif comme un des principaux responsables de la dégénérescence des photorécepteurs induite par la lumière (Organisciak and Winkler, 1994; Tosini et al., 2016).

En 2016, une étude de Krigel et collaborateurs a démontré qu'une exposition aiguë aux LEDs entraîne une phototoxicité rétinienne chez différentes souches de rat (Krigel et al., 2016). En effet, une seule exposition de 24 heures à des LEDs blanc froid (Cold-white LEDs) à 500 lux entraîne une réduction significative de l'épaisseur de l'ONL chez des rats albinos et pigmentés dont la pupille a été pharmacologiquement dilatée. A l'inverse, la même exposition *via* des ampoules fluorescentes (fluorocompact bulbs (CFL)) à 500 lux n'entraîne aucun effet significatif sur l'ONL, confirmant les effets délétères de l'enrichissement en longueurs d'ondes courtes dans les LEDs (Jaadane et al., 2015; Krigel et al., 2016). Dans la même étude, les auteurs ont procédé à des expositions longues (sur 8 à 28 jours) à des LEDs blanches, bleues ou vertes (500 lux) en cycle LD 15:12 sans dilatation pupillaire pharmacologiquement induite, afin de reproduire des conditions domestiques. Leurs résultats indiquent que le nombre de photorécepteurs est significativement réduit après 8 jours d'exposition aux LEDs bleues (sur la rétine supérieure), puis sur l'ensemble de la rétine après 1 mois d'exposition aux LEDs bleues et vertes (Krigel et al., 2016). Ces résultats ne sont pas retrouvés chez les rats pigmentés, mais témoignent qu'un effet phototoxique des LEDs est avéré dans des conditions d'expositions non-extrêmes (contrairement à des protocoles d'exposition LL ou à très haute intensité lumineuse). Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces effets ne sont pas clairement élucidés (inflammation, stress oxydatif, accumulation de la lipofuscine), en partie à cause du grand nombre de facteurs pouvant induire ou atténuer la toxicité rétinienne, notamment ici la pigmentation (Krigel et al., 2016; Tosini et al., 2016; Wolf, 2003). Le couplage nocturne des bâtonnets et des cônes *via* des jonctions GAP (Jin and Ribelayga, 2016; Tsukamoto et al., 2001) sous contrôle de l'horloge circadienne rétinienne, pourrait également constituer un amplificateur des effets délétères d'une exposition aux LED la nuit, de par une augmentation importante de la photosensibilité rétinienne (Organisciak and Vaughan, 2010).

Toujours dans le cadre de la surexposition aux écrans et au LED, la question de leur implication dans le développement de la myopie ou de la prédisposition à la dégénérescence maculaire lié à l'âge (DMLA) a été soulevée à plusieurs reprises cette dernière décennie. Concernant la myopie, plusieurs études chez les plus jeunes montrent qu'il existe une corrélation entre l'exposition aux écrans et un risque plus élevé de présenter une myopie (Enthoven et al., 2020; Yang et al., 2020). Pour la DMLA, des travaux avaient déjà suggéré une implication de la phototoxicité liée aux LEDs (Jaadane et al., 2015) et une récente étude a démontré que la toxicité de la lumière bleue entraînait notamment une altération du fonctionnement mitochondrial, contribuant possiblement à l'émergence de la maladie (Alaimo et al., 2019).

Enfin, une étude récente de Blasiak et collaborateurs discute à nouveau des propriétés antioxydantes et du rôle protecteur de la mélatonine sur la dégénérescence des photorécepteurs (Blasiak et al., 2016; Gianesini et al., 2016). Leur discussion les amène à considérer la mélatonine comme un potentiel agent thérapeutique dans la prévention de la DMLA. La lumière ayant un impact notable sur la régulation de l'horloge circadienne rétinienne (qui contrôle la sécrétion de mélatonine), un dérèglement de cette horloge rétinienne suite à l'exposition inappropriée aux écrans pourrait également constituer un facteur de risque (Felder-Schmittbuhl et al., 2017).

### **3. Effet des LEDs et de la lumière bleue sur le sommeil et les fonctions cognitives**

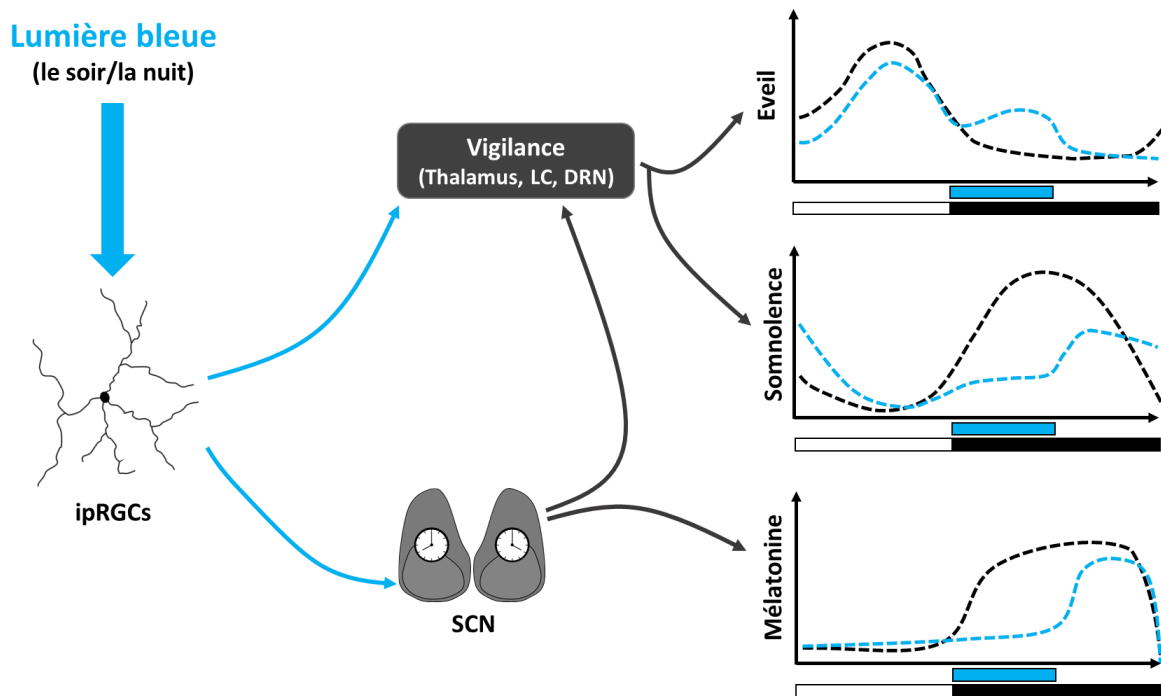
Il est maintenant très largement admis que l'utilisation des nouvelles technologies en soirée altère le sommeil et la sécrétion de mélatonine. L'utilisation des smartphones/tablettes le soir impacte le temps de sommeil et augmente le délai d'endormissement (Chindamo et al., 2019). En 2005, alors que les études s'intéressant à l'impact de la lumière sur les rythmes biologiques sont en plein essor avec la découverte récente des ipRGCs, Munch et collaborateurs démontrent que l'architecture du sommeil est altérée par une exposition à la lumière pendant la soirée, avec un effet dépendant de la longueur d'onde (Munch, 2005). Ils montrent qu'une exposition à la lumière bleue le soir affecte les différentes phases de sommeil, entraînant notamment un raccourcissement significatif de la phase de sommeil paradoxale (sommeil à mouvements oculaires rapides ou REM).

Par la suite, d'autres études viennent conforter ces résultats et montrent également que l'exposition aux LEDs en soirée entraîne une inhibition de la sécrétion de mélatonine (Chellappa et al., 2013; Prayag et al., 2019b). Cet effet serait majoritairement dû au système mélanopsinergique alors que l'implication des cônes-S est peu probable (Prayag et al., 2019a; Spitschan et al., 2019). Concernant les effets de la lumière sur le sommeil, ils pourraient s'expliquer en partie par des effets indirects de la lumière, qui induisent un décalage de phase de l'horloge circadienne (Chang et al., 2015; Wahl et al., 2019). Cette hypothèse est confortée par plusieurs études, par exemple sur l'impact d'une exposition intermittente à la lumière bleue sur la PRC chez l'Homme (Revell et al., 2012). Le décalage de phase circadien et l'altération du pic de sécrétion de la mélatonine pourraient avoir un effet synergique, entraînant des difficultés d'endormissement et la réduction du temps total de sommeil, notamment observées chez les adolescents (Chindamo et al., 2019; Touitou et al., 2016).

En parallèle, une étude par IRMf (imagerie par résonance magnétique fonctionnelle) de Vandewalle et collaborateurs en 2008 montre qu'une stimulation lumineuse durant la journée entraîne une réponse particulièrement dynamique au sein de différentes zones cérébrales (corticales et thalamiques), qui coïncide avec une augmentation de la vigilance (Vandewalle et al., 2006). En 2013, la même équipe démontre, chez des sujets aveugles (sans bâtonnets/cônes), qu'une courte exposition à la lumière bleue induit en quelques dizaines de

secondes une augmentation de l'attention et des performances cognitives (corrélée à des activations dans les zones préfrontales et thalamiques), notamment en mémoire de travail (Vandewalle et al., 2013). Ces travaux indiquent non seulement que la lumière bleue impacte directement et de manière très dynamique les processus attentionnels et cognitifs, mais également que cet effet est très probablement médié par les ipRGCs. Ces données sont particulièrement cohérentes avec les effets décrits précédemment d'une exposition à la lumière bleue en soirée. La lumière bleue, *via* les ipRGCs, favoriserait un état d'éveil par stimulation de zones corticales, thalamiques et du locus coeruleus (Vandewalle et al., 2007, 2006), inhibant la sécrétion de mélatonine et retardant l'heure d'endormissement (Prayag et al., 2019b; Schmidt et al., 2018). Par ailleurs, il a été mis en évidence que cette exposition à une lumière enrichie en bleu le soir, avait des conséquences jusqu'au lendemain matin, avec notamment une baisse significative de vigilance accompagnée d'un état de somnolence (Chang et al., 2015). À la suite de cette découverte, Münch et collaborateurs ont démontré que s'exposer à une lumière enrichie en bleu le matin, permettait de « contrer » ces effets délétères, en favorisant l'éveil et un état de vigilance élevée. Ces effets pouvaient perdurer jusqu'au soir voir même persister quelques jours (Münch et al., 2017).

En somme, l'utilisation croissante des nouvelles technologies est liée à une augmentation de l'exposition aux LED particulièrement enrichies en lumière bleue, pendant le soir/ la nuit. Cette exposition lumineuse tardive entraîne des conséquences sur la qualité du sommeil et la sécrétion de mélatonine (Chellappa et al., 2013; Prayag et al., 2019b; Schmidt et al., 2018). Ces effets seraient modulés par les ipRGCs de manière indirecte (horloge-dépendant) *via* un retard de phase des SCN (Chang et al., 2015; Wahl et al., 2019), mais également de manière plus directe (possiblement *via* des projections homologues à celles retrouvées chez la souris) en favorisant un état d'éveil/de vigilance élevée (Vandewalle et al., 2013, 2007, 2006). *A contrario*, l'exposition à une lumière enrichie en bleu pendant le matin semble procurer des effets bénéfiques, en facilitant le réveil et en augmentant l'état de vigilance (Münch et al., 2017).



**Figure 17 : Représentation des voies possiblement impliquées dans les effets de la lumière bleue sur le sommeil et la sécrétion de mélatonine chez l'Homme.** L'exposition à la lumière bleue en soirée (créneaux bleus sur les graphiques) induit un retard dans l'heure d'endormissement, l'inhibition de la sécrétion de mélatonine et une augmentation de la vigilance (courbe bleue). Cette exposition entraîne des effets délétères le lendemain avec notamment une diminution de la vigilance le matin comparée au contrôle sans exposition (courbe noire). Ces effets pourraient être dus à la stimulation des ipRGCs, qui favorise l'éveil en régulant directement et indirectement *via* les SCN les structures impliquées dans l'éveil (Thalamus, LC, DRN). D'après [Vandewalle et al., 2013](#) ; [Chang et al., 2015](#) ; [Chindamo et al., 2019](#).

#### 4. Effet des LEDs et de la lumière bleue sur le comportement et l'humeur

##### a. Utilisation des écrans et troubles de l'humeur et du comportement

Au cours des dernières années, de nombreux débats ont animé la question des effets délétères de la surexposition aux écrans (Smartphones, tablettes, télévisions) sur le versant psychologique et développemental. Cette surexposition concerne notamment les plus jeunes, avec une forte prévalence chez les enfants et les adolescents ([Christensen et al., 2016](#); [Lissak, 2018](#)).

Chez les enfants, une exposition excessive aux écrans est corrélée avec des retards développementaux (langage, déficit de l'attention) ainsi que des troubles de type anxio-dépressif ([Domingues-Montanari, 2017](#); [Hermawati et al., 2018](#); [Madigan et al., 2019](#)). Certaines études en IRMf démontrent qu'une augmentation du temps passé devant les écrans est corrélée avec une diminution de la connectivité fonctionnelle dans les régions du langage, de la vision et du contrôle cognitif ([Horowitz-Kraus and Hutton, 2018](#)). Concernant les

adolescents, une étude en Angleterre a corrélé le temps passé devant les écrans d'ordinateur avec un risque accru de développer des symptômes de type anxiodépressif (Khouja et al., 2019). Une autre étude, cette fois-ci Canadienne, montre que l'augmentation du temps d'utilisation de l'ordinateur est liée à une sévérité plus importante des symptômes de type anxieux et dépressif chez les adolescents (Maras et al., 2015). La même année, une étude Iranienne a cherché à déterminer si les comportements agressifs et violents pouvaient être expliqués par une utilisation excessive des supports multimédias. Les auteurs ont effectivement trouvé une corrélation entre l'augmentation de la durée passée devant les écrans et l'augmentation des comportements agressifs/violents, en précisant que l'impact du contenu joue un rôle probablement majeur (Kelishadi et al., 2015). Dans un contexte encore plus large, une récente étude Coréenne a mis en évidence une prévalence significative entre l'intensité de l'éclairage nocturne extérieur et la sévérité des comportements suicidaires, la lumière pouvant contribuer à l'aggravation des troubles psychologiques (Min and Min, 2018).

La plupart de ces études se fondent sur des corrélations et les effets de la surexposition aux écrans peuvent donc être expliqués par un ou plusieurs facteurs coïncidents. Bien que le contenu multimédia puisse jouer un rôle central dans la manifestation de ces troubles, il n'est pas exclu que l'exposition à la lumière artificielle y contribue de façon significative. En effet, les patterns de projections des ipRGCs décrits chez la souris sont cohérents avec les effets des LED sur le sommeil (cf. partie IV.3), la libération de mélatonine (cf. partie II.5) et la régulation de l'humeur (cf. partie III.6.d).

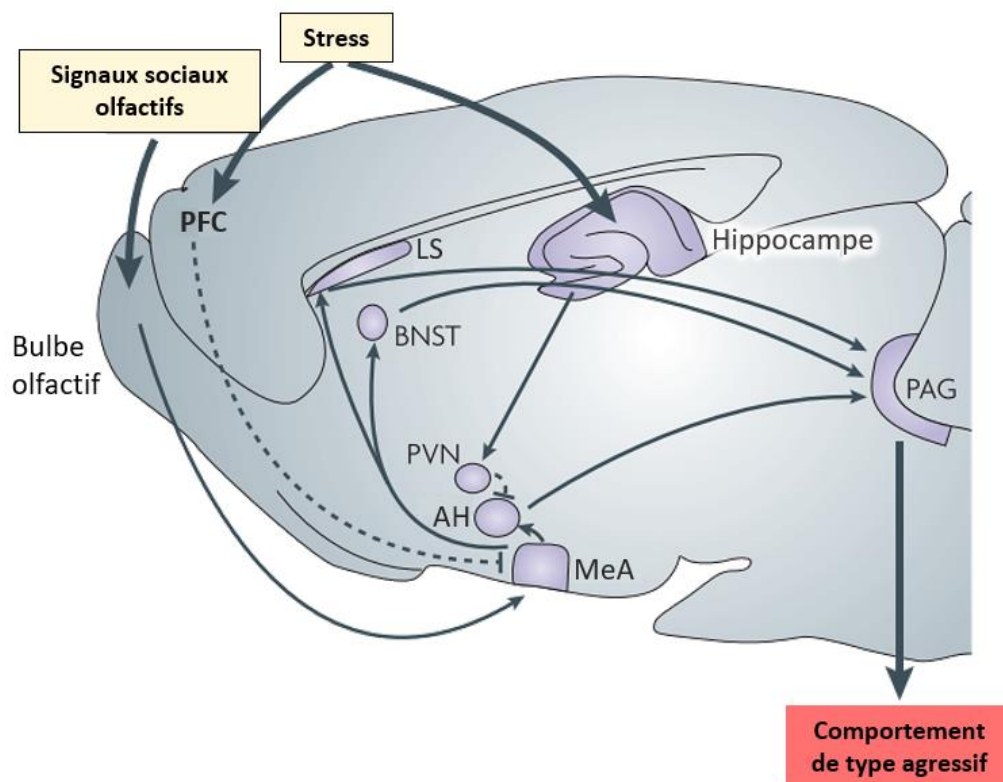
#### **b. Comportement agressif/anxieux : Connectome et régulation circadienne**

Le comportement agressif, suivant la définition de l'éthologiste Konrad Lorenz, désigne « un instinct de combat [...] dirigé contre les individus de la même espèce » de son livre « *On aggression* » de K. Lorenz, 1963. L'éthologue précise que cet instinct se rapporte surtout à la territorialité et à l'accouplement. Dans leur revue de 2007, les auteurs Nelson & Trainor précisent que « l'agression est un comportement social complexe qui a évolué dans le contexte de la défense ou de l'obtention de ressources » (Nelson and Trainor, 2007).

Chez l'Homme comme chez la souris, le connectome de l'agressivité comprend une grande diversité de structures parmi lesquelles on peut citer l'AH, le VMH, le PVN, la MeA, le septum latéral (LS), la BNST, la PAG et le cortex préfrontal (PFC) (Bartholow, 2018; Nelson and Trainor, 2007). Chez la souris, le stimulus aversif arrive à la MeA, qui va transmettre l'information vers l'AH, la BNST et le LS. Puis l'hypothalamus, la BNST et le LS véhiculent l'information vers la PAG qui permet la manifestation physique du comportement agressif. Le PFC joue un rôle de modulateur du comportement agressif, notamment en inhibant la MeA (Nelson and Trainor, 2007). Bien que le connectome qui régule le comportement agressif soit globalement bien délimité, les connaissances sur les implications précises de chaque voie/structure comportent encore de nombreuses zones d'ombres. En termes de neurotransmission, les monoamines semblent constituer une pièce centrale dans la régulation du comportement agressif et



notamment une de leurs enzymes de dégradation : la monoamine oxydase A (MAOA) (Godar et al., 2014). Il a notamment été montré que des variations génétiques dans le gène *maoa* peuvent être corrélées à un comportement agressif disproportionné chez l'Homme (Smeijers et al., 2017). En conséquence, la souche de souris KO pour la MAOA (MAOAKO) constitue un modèle de choix dans l'étude d'une prédisposition aux comportements de types agressifs et anxieux (Chen et al., 2004).



**Figure 18 : Représentation en coupe sagittale du connectome régulant le comportement de type agressif chez la souris.** L'activité du connectome peut être influencée par des facteurs externes tels que le stress ou les interactions sociales de type signaux olfactifs. Dans les deux cas, l'information est traitée par le complexe MeA-AH-BNST-LS et la sortie comportementale s'opère *via* la PAG. De son côté, le PFC joue un rôle d'inhibiteur sur ce complexe et prévient l'apparition du comportement de type agressif. Adapté de Nelson & Trainor, 2007.

Récemment, il a été prouvé que le comportement agressif présentait une variation circadienne, sous contrôle des SCN et d'un réseau intra-hypothalamique chez la souris (Todd et al., 2018). Les auteurs ont démontré que les SCN projettent au niveau de la SPZ qui elle-même projette au niveau du VMH, dont la stimulation provoque un comportement de type agressif. Les SCN libèrent du GABA sur les neurones de la SPZ, ce qui entraîne une inhibition de plus en plus forte de la structure au fur et à mesure de la journée. La SPZ (également GABAergique) est ainsi fortement inhibée en fin de journée (entre ZT10 et ZT12) ce qui induit une importante levée d'inhibition du VMH (à ZT13). En fin de journée, l'activité

électrophysiologique des SCN diminue progressivement, ce qui va permettre une levée d'inhibition progressive de la SPZ au fur et à mesure de la nuit, qui finira par inhiber fortement la VMH en fin de nuit (ZT23-ZT1). Par conséquent, la souris présente une variation circadienne du comportement de type agressif, avec un maximum à ZT13 et un minimum à ZT1. Ce mécanisme pourrait constituer une adaptation évolutive, permettant à l'animal d'être physiologiquement préparé à répondre une situation de stress, au moment où sa période d'activité commence (transition jour/nuit) (Todd et al., 2018; Todd and Machado, 2019).

Les patterns de projections des ipRGCs se superposent d'une façon remarquable au connectome de l'agressivité : des projections directes d'ipRGCs sont décrites dans les SCN, la MeA, l'AH, la SPZ, le VMH, le BNST et la PAG (cf. **partie III.6**). De plus, le rôle central des ipRGCs dans le photoentraînement des SCN suggère une voie indirecte de régulation du comportement de type agressif. En combinant l'ensemble des données précédemment présentées dans les **chapitres III** et **IV** : nous pouvons émettre l'hypothèse que les ipRGCs peuvent être impliquées, *via* la surexposition à la lumière bleue et leurs patterns de projections, dans les troubles comportementaux de type agressif/anxieux (Delwig et al., 2016; Kelishadi et al., 2015; Maras et al., 2015; Nelson and Trainor, 2007; Todd et al., 2018).



# OBJECTIFS

---

## Axe 1 : Rétine et photopériode

Alors que le rôle des photorécepteurs dans la régulation des rythmes circadiens est largement étudié, leur contribution dans l'intégration de l'information relative à la photopériode n'a pas encore été particulièrement abordée. Les ipRGCs occupent une place centrale dans le photoentraînement des rythmes circadiens et certaines fonctions qu'elles régulent, comme le PIPR, semblent présenter une variation saisonnière. **L'objectif 1 de ce travail de thèse a été d'étudier la contribution de la rétine et notamment des ipRGCs dans l'intégration de l'information relative à la photopériode.**

Pour cela, nous avons exposé des souris C3H *rd1* (dépourvues de bâtonnets et de cônes) à des protocoles de photopériode longue (LP) et courte (SP). Durant ces expositions, nous avons étudié l'intégration de la photopériode chez ces animaux en enregistrant leur activité locomotrice, en mesurant la sécrétion de mélatonine et en évaluant l'expression de la TSH par hybridation *in situ*. Par ailleurs, des analyses par immunohistochimie et RT-qPCR ont été menées sur les rétines afin de déterminer si les ipRGCs présentaient des différences entre les groupes SP et LP. Pour aller plus loin, nous avons cherché à développer en parallèle un modèle de souris OPN4 KO et produisant de la mélatonine, pour étudier les conséquences de l'absence de réponse mélanopsinergique dans la cinétique d'intégration de la photopériode.

Les ipRGCs étant également au centre de la régulation des comportements et de l'humeur par la lumière, Le deuxième axe de ce travail de thèse a été d'étudier l'impact de la lumière bleue sur le comportement *via* les ipRGCs.

## Axe 2 : Impact de la lumière bleue sur le comportement

Chez l'Homme, l'exposition croissante aux LEDs enrichies en lumière bleue à des heures inappropriées est corrélée avec des perturbations de l'humeur et du comportement. Alors que certains de ces effets peuvent être expliqués par un dérèglement des rythmes biologiques, l'impact direct de la lumière sur ces fonctions n'est pas exclu. Chez la souris, les projections des ipRGCs concordent avec plusieurs structures impliquées dans la régulation des comportements de type anxieux/agressif. **L'objectif 2 de ce travail de thèse a été de déterminer si une exposition à de la lumière enrichie en bleu pouvait entraîner des effets directs sur les comportements de type anxieux/agressif, indépendamment des effets dus à un dérèglement du cycle circadien.**

Dans une première partie, des souris MAOA KO prédisposées à des comportements de type anxieux/agressif ont été utilisées. Nous avons placé des souris WT et MAOA KO dans différents

protocoles d'expositions à la lumière bleue ou blanc chaud, en utilisant des éclairages néons. Le but de ces protocoles est de mimer une surexposition à la lumière bleue en évaluant les conséquences comportementales chez des animaux prédisposés aux comportements de type anxieux/agressif. Pendant les protocoles d'expositions, l'activité locomotrice des animaux a été mesurée et des tests comportementaux ont été réalisés. Enfin, des marquages de la protéine C-FOS ont permis de **visualiser l'activation des structures cérébrales à la suite d'une exposition aiguë à la lumière bleue** ou blanc chaud.

Dans une deuxième partie, nous avons utilisé des rubans de LEDs afin d'exposer des souris C3H *rd1* à des protocoles avec ou sans enrichissement en lumière bleue. Le but de cette partie est **d'étudier la contribution des ipRGCs dans la régulation des comportements de type anxieux/agressif en réponse à la lumière bleue**. Chez une partie de ces animaux, les ipRGCs ont été délétées par injection intraoculaire d'une immunotoxine. L'activité locomotrice a été mesurée et des tests comportementaux ont été réalisés à la fin des protocoles d'exposition. Des immunomarquages de la protéine C-FOS ont également été effectués en parallèle de l'analyse des rétines afin de **faire le lien entre ipRGCs et activation des structures cérébrales**. Enfin, ces protocoles d'expositions LEDs et les tests comportementaux ont été répétés chez des animaux MAOA KO et WT littermate.

# MATERIELS & METHODES

---

*L'ensemble des protocoles et expérimentations utilisant des animaux a été validé par la Structure du Bien Être Animal (SBEA), le Comité National de Réflexion Ethique sur l'Expérimentation Animale (CREMEAS) ainsi que le Ministère Français de l'enseignement supérieur et de la recherche dans le cadre des directives européennes en matière d'expérimentation animale.*

## **Le Chronobiotron : Plateforme CNRS d'exploration fonctionnelle**

L'ensemble des expérimentations animales présentées dans cette thèse a été réalisé au sein du Chronobiotron (UMS 3415) à Strasbourg. Co-dirigé par les Dr REIBEL Sophie et Dr CIOCCA Dominique, le Chronobiotron est une plate-forme d'hébergement et d'exploration fonctionnelle rongeurs qui dispose d'un équipement spécifiquement conçu pour l'étude des rythmes biologiques. Composé de plusieurs salles d'expérimentation, il est possible de piloter automatiquement et indépendamment dans chaque salle le cycle lumineux (LD/LL/DD) et la photopériode. De plus, il est également possible de contrôler la température (dans le cadre d'étude sur l'hibernation) et de reproduire l'aube et le crépuscule. Pour cette thèse, les pièces ont été spécialement équipées avec du matériel néons/LEDs permettant de contrôler l'intensité lumineuse et les longueurs d'onde d'exposition.

Le Chronobiotron est labellisé GIS-IBISA et adhère à la charte des plates-formes de recherche en sciences du vivant. Il est soumis à l'approbation du comité des utilisateurs et du conseil scientifique. Pour plus d'informations : [chronobiotron.u-strasbg.fr](http://chronobiotron.u-strasbg.fr)

## **I. Axe 1 : Rétine et photopériode**

### **1. Animaux et protocoles d'exposition**

20 souris mâles C3H/HeNcrI (Charles River, Italie) âgées de 6 semaines ont été placées en cages individuelles (nourriture et boisson *ad libitum*, 22°C avec 40% d'humidité) avec un éclairage en cycle LD 12:12. Ces animaux portent la mutation *retinal degeneration 1 (rd1)* qui entraîne la dégénérescence totale des bâtonnets puis des cônes à l'âge de 3 mois. Après avoir confirmé la cécité des animaux par électrorétinogramme (ERG) (**voir Axe 1.2**), les souris ont été séparées en deux groupes de 10 afin d'être exposées à 8 semaines de photopériode courte (SP 8:16) ou longue (LP 17:7) sous un éclairage néon (spectre sur la **figure 19**) à 150 lux au niveau de la cage (éclairage plafonnier du Chronobiotron).

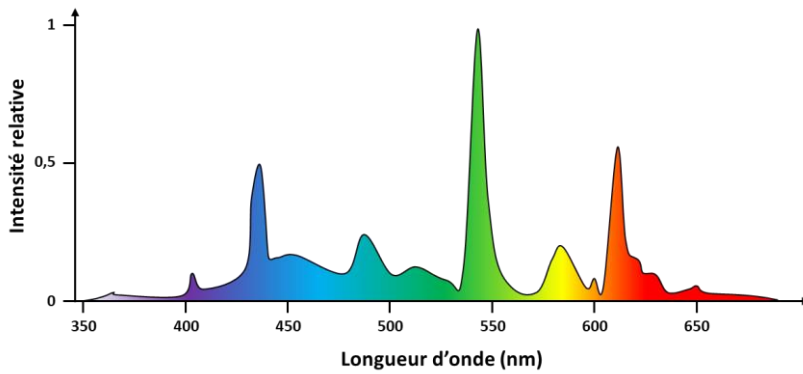


Figure 19 : Caractéristiques spectrales des néons utilisés au sein du Chronobiotron

## 2. Contrôle de la vision par électrorétinogramme (ERG)

Avant le début des protocoles d'exposition SP et LP, 5 souris C3H *rd1* ont été sélectionnées de manière aléatoire pour un examen ERG (voir figure 20). Les animaux ont été préalablement placés 24h en obscurité afin d'accroître la réponse des photorécepteurs (*dark-adapted*). Par la suite, les souris ont été légèrement sédattées à l'isoflurane 4% pour permettre une injection sous-cutanée d'un mélange de Xylazine (Rompun® 2%, 10mg/Kg) et de Kétamine (Imalgene® 1000, 100mg/Kg) dilué dans de l'eau physiologique à 30°C, au niveau de la nuque. Une goutte de tétracaïne est ajoutée à chaque œil comme anesthésiant local puis l'animal est placé sur un support adapté et chauffé à 37°C. Une électrode d'enregistrement par œil et 3 électrodes de références sous cutanées (1 derrière chaque oreille et 1 au-dessus de la queue) sont placées et l'animal est disposé dans le système RETI-port gamma de Roland Consult (Brandebourg, Germany). Un protocole de stimulation scotopique a été appliqué, consistant en des flashes lumineux de 5ms d'intensité croissante (de 0.001 à 3 candelas/m<sup>2</sup>). A la fin de l'enregistrement, de l'Ocrygel est appliqué sur les yeux pour éviter un dessèchement oculaire.

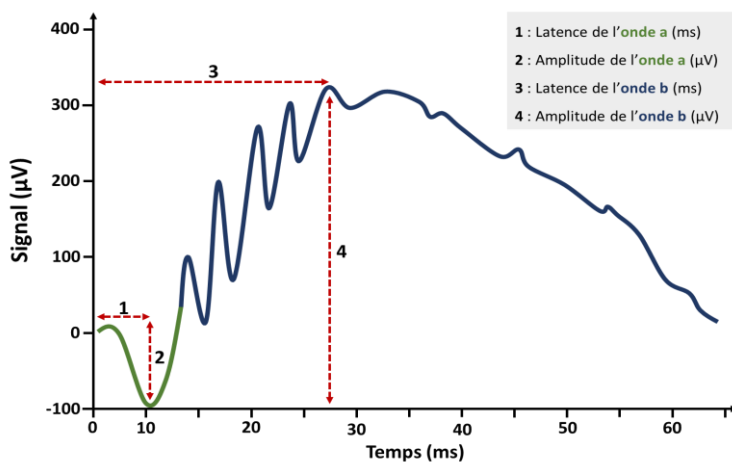


Figure 20 : Schéma d'une réponse ERG en protocole scotopique. Le flash lumineux survient à  $t=0$ ms. Dans une rétine saine, la réponse commence par une hyperpolarisation (en vert) appelée **onde a** provoquée par la sommation de la réponse des bâtonnets et des cônes. L'**onde a** est suivie par une forte dépolarisation appelée **onde b**, qui est due à l'activation des BCs et d'autres cellules de la rétine interne.

La réponse ERG se termine par une repolarisation progressive. Plusieurs paramètres comme la latence l'amplitude des ondes a et b peuvent être mesurés pour évaluer le fonctionnement de la rétine.

### **3. Suivi de l'activité locomotrice par actimétrie**

Le suivi de l'activité locomotrice a été réalisé grâce à des capteurs infrarouges placés au-dessus des cages et reliés à un CAMS « Circadian Activity Monitoring System » (INSERM, France). Les données brutes récupérées par le CAMS ont été par la suite analysées en utilisant le logiciel ClockLab (Actimetrics Product, Wilmette, United State). Ce système permet de déterminer le nombre de mouvements que l'animal a réalisés par intervalle de 5 minutes et d'en faire une représentation graphique qui est appelée actogramme. Il est également possible d'extraire les données brutes afin de réaliser des analyses approfondies du comportement locomoteur : La quantité totale d'activité locomotrice ainsi que l'activité diurne et nocturne, ont été analysées heure par heure mais également semaine après semaine entre les groupes SP et LP. Pour chaque animal et ce à chaque semaine d'exposition, le profil d'activité locomotrice relatif (% de la quantité de mouvement par heure sur la quantité totale de mouvement) a été déterminé. Ces profils individuels ont été combinés au sein de chaque groupe d'exposition afin d'obtenir un profil moyen d'activité locomotrice pour le groupe SP et un autre pour le groupe LP à chaque semaine d'exposition. A partir de ces profils moyens, la répartition de l'activité locomotrice a été comparée (notamment en début et en milieu de nuit) entre les groupes SP et LP mais également au sein des groupes, et ce au fur et à mesure des semaines d'exposition. Les analyses statistiques ont été réalisées *via* le logiciel SigmaPlot (Systat Software Inc.) et Prism (GraphPad Software Inc.). Des analyses ANOVA à deux facteurs (photopériode et ZT) à mesures répétées ont été réalisées pour comparer les deux groupes.

### **4. Mise à mort des animaux C3H *rd1***

Les animaux des groupes SP et LP ont été mis à mort à ZT3 (n=3), ZT16 (n=3) et ZT20 (n=5) par injection i.p d'EUTHASOL VET (182mg/Kg). Après décapitation, Le sang a été rapidement collecté dans des tubes contenant 5% d'héparine puis centrifugé pendant 15 minutes à 1000G (température maintenue à 4°C). Les plasmas obtenus ont ensuite été stockés à -80°C. Pendant ce temps, les têtes ont été disséquées afin de récupérer la glande pinéale (rapidement stockée à -80°) et les cerveaux, plongés dans du paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) pour 12 heures de fixation juste avant le protocole d'enrobage. Pour chaque animal, un œil a également été placé dans du PFA 4% pendant 3h pour fixation puis stocké dans du PBS1X + NaN<sub>3</sub> (0,02%) alors que la rétine de l'autre œil a été rapidement extraite puis congelée à l'azote liquide avant d'être stockée au -80°C.

### **5. Marquage par immunohistochimie de la mélanopsine sur rétine à plat**

Les yeux précédemment fixés sont disséqués sous loupe binoculaire dans une solution de PBS1X pour prélever la rétine. Les rétines sont d'abord incubées pendant 1h30 à température ambiante sous agitation légère dans une solution de préincubation (PBS1X + Sérum de chèvre (NGS) 10% + Albumine de sérum bovin (BSA) 1% + Triton X100 0.5%). Les rétines sont ensuite



incubées avec l'anticorps primaire AB-N38 de lapin anti-mélanopsine de souris (Melanopsin Rabbit Polyclonal AB-N38, Advanced Targeting Systems Inc., Carlsbad, CA 92011) dilué au 1/4000 dans la solution buffer A (PB1X + NGS 3% + BSA 1% + Triton X100 0.5% + NaN<sub>3</sub> 0.05%) durant 3 jours à 4°C sous agitation légère. A la fin des 3 jours, les rétines sont rincées 6 fois 30 minutes au PBS 1X avant incubation (2h30 à température ambiante sous agitation) avec l'anticorps secondaire de chèvre antiglobuline de lapin couplé Alexa Fluor® 488 dilué au 1/1000 dans la solution buffer A. Enfin, les rétines sont rincées 4 fois 30 minutes au PBS 1X. La mise à plat des rétines se fait sous lumière tamisée (afin éviter la « décoloration » ou « fading » du fluorochrome) à la loupe binoculaire à l'aide d'une pince et d'une lame de rasoir. Le montage est réalisé avec un milieu à base d'alcool polyvinylique (Mowiol®), une matrice de montage qui solidifie et permet le bon maintien des rétines et de la lamelle, sécurisant la manipulation automatisée des lames lors de l'acquisition au NanoZoomer.

## **6. Acquisition au NanoZoomer et analyse du marquage des ipRGCs**

### **a. Généralité sur le NanoZoomer**

Le NanoZoomer équipé au laboratoire est le modèle S60 de Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, 4500 Solothurn, Suisse). Cet appareil permet la numérisation de lame en microscopie optique ou à fluorescence avec une résolution de scan de 0.23 µm/pixel à l'objectif X40. L'acquisition des lames se fait de manière totalement automatisée. L'appareil permet une acquisition de la totalité de la lame sur les axes X et Y mais offre également une liberté de plusieurs dizaines de µm sur l'axe Z pour des acquisitions en profondeur selon l'épaisseur du tissu. Un des nombreux avantages étant que les temps d'exposition au moment de l'acquisition sont identiques, ce qui est idéal pour le comptage et la quantification relative par mesure de l'intensité de marquage.

### **b. Comptage des ipRGCs et analyse de l'intensité de marquage**

Afin de pouvoir visualiser à la fois l'arbre dendritique et le soma des ipRGCs, mais également les ipRGCs déplacées (M1d) vers la couche nucléaire interne, les acquisitions ont été faites au NanoZoomer sur 13 couches de profondeur (axe Z) allant de -24µm à +24µm par rapport au niveau de focus (0µm) avec un pas de 4µm. A partir de ces acquisitions, le comptage des ipRGCs a été réalisé sur 4 champs d'observation (au grossissement X100) par rétine avec les paramètres suivants sur le logiciel NDPview2 : Ratio Gamma (augmenté à 3 sur 1), luminosité (maintenue à 100%) et contraste (augmenté à 120%). Par la suite, l'analyse de l'intensité du marquage a été réalisée au niveau des dendrites sur 4 champs d'observation au grossissement X250. A l'aide du logiciel ImageJ, le bruit du fond correspondant aux différents champs observés a été soustrait et un seuil d'intensité a été appliqué pour extraire le marquage au niveau des dendrites. Par la suite, l'intensité relative du marquage dendritique (en niveau de gris) a été mesurée pour les 4 champs d'observation, puis ces 4 valeurs ont été moyennées pour obtenir une valeur globale par rétine. Le nombre moyen d'ipRGCs par champs d'observation (X100) a été comparé entre SP et LP *via* une analyse t-test non appariée (*p*

*valeur* = 0,1175) et l'intensité relative de marquage (niveau de gris) entre les rétines SP et LP a été comparée *via* un test de Mann-Whitney (*p valeur* = 0,0056).

### **7. Dosage de la mélatonine dans la glande pinéale par RadioImmunoAssay (RIA)**

Les glandes pinéales précédemment congelées ont été sorties du -80°C et 500µL de tampon tricine a été rapidement ajouté dans chaque tube. Les glandes pinéales ont ensuite été soniquées 3 fois 15s pour permettre une solubilisation complète. Elles ont ensuite été centrifugées 5 minutes pour obtenir 2X100µl (dupliqua) de surnageant pour le dosage. A chaque dupliqua a été ajouté 100µl d'anticorps primaire de lapin anti-mélatonine 1/40000 (antisérum AC19540, INRA, Nouzilly, France) ainsi que 300µl de traceur radiomarqué ([<sup>125</sup>I]-2-iodomelatonin à 10000 coups/min/100µL). Après une incubation à 4°C pendant 12h, la mélatonine liée a été précipitée à 0°C (sur glace) pendant 1h par l'ajout de 800µl d'anticorps de mouton antiglobuline de lapin. Au bout de 1h, le surnageant a été récupéré par 30 minutes de centrifugation à 4°C et le signal radioactif a été mesuré à l'aide d'un compteur de rayon gamma. Les concentrations de mélatonine ont alors été déterminées à l'aide des courbes étalons.

### **8. Enrobage des cerveaux au polyéthylène glycol (PEG) et coupes au microtome**

L'enrobage des cerveaux dans le PEG nécessite d'abord une déshydratation du tissu. Les cerveaux préalablement fixés ont été déshydratés par des bains d'alcool à concentration croissante : 2 fois 1 heure en éthanol 70%, 2 fois 1 heure en éthanol 95% puis 2 fois 1 heure en éthoxyéthanol. La déshydratation a été finalisée par un bain de n-butanol pendant au moins 12h. Par la suite, l'enrobage est initié avec une première incubation des cerveaux dans du PEG1000 maintenu à 48-50°C pendant 5 à 8 heures (jusqu'à pénétration complète du PEG, notable par le fait que les cerveaux « tombent » au fond du contenant de PEG par changement de densité). Les cerveaux sont ensuite transférés dans un mélange de PEG1000/PEG1500 (50%/50%) maintenu à 48-50°C pendant 12 heures. Ils sont coupés à la base du cervelet (sur le plan coronal) pour créer une surface plane qui est apposée au fond du moule de PEG pour orienter le tissu (verticalement, les bulbes olfactifs vers le haut). Les cerveaux sont alors plongés et correctement placés dans des moules cubiques remplis d'un mélange PEG1000/1500 (5% PEG1000 / 95% PEG1500) (qui a été préalablement préparé et équilibré dans ces mêmes moules cubiques à 50°C) puis le tout est maintenu à 50°C pendant encore 1 heure pour permettre une bonne homogénéisation et éviter les différences de gradient. Enfin, les moules sont placés à température ambiante pour permettre un durcissement progressif du PEG pendant 12 heures.

Par la suite, les cerveaux sont coupés en tranches de 12µm d'épaisseur au microtome à température ambiante et les rubans de coupes obtenus sont placés dans des boîtes sur un papier autoclavé. La récupération des coupes pour l'hybridation *in situ* est réalisée en découpant 1 coupe sur 5 par ruban (par intervalle de 60µm donc), ce qui permet d'obtenir au

moins une coupe de chaque structure anatomique d'intérêt. Le montage des coupes sur lame se fait par dépôt horizontal des coupes à la surface d'eau distillée, ce qui entraîne la dissolution quasi-instantanée du PEG et permet de faire glisser la coupe sur une lame à l'aide d'un pinceau. Les lames sont alors séchées rapidement au four 15min à 50°C avant d'être rapidement utilisées pour l'hybridation *in situ*.

## 9. Hybridation *in situ* (ISH) non-radioactive et analyse du marquage

L'hybridation *in situ* a été réalisée à l'aide de ribosondes (sondes à ARN) sens et antisens spécifiques de l'ARNm de la sous-unité  $\beta$  de la thyroïdostimuline (TSH $\beta$ ) de souris (NM\_009432.2) couplées à la digoxygénine (DIG RNA labelling kit, Boehringer) suivant le protocole de P. Klosen et collaborateurs (Klosen et al., 2013). Les lames sont ensuite couvertes avec du Crystal Mount™ (Sigma) et la lamelle est montée à l'aide d'Eukitt (Chem-Lab, Zedelgem, Belgique). Afin de comparer le signal entre les groupes SP et LP, des photos de 3 différentes zones sur l'axe rostro-caudal de la *pars tuberalis* ont été prises pour chaque animal et analysées en utilisant le logiciel ImageJ. Pour chaque zone, le bruit de fond a été soustrait et une image en négatif du marquage a été générée. A partir de cette image, l'intensité du marquage en niveau de gris a été mesurée au niveau des tanocytes et les valeurs des 3 zones ont été moyennées pour obtenir une valeur représentative par animal. Enfin, les valeurs ont été comparées entre les groupes SP et LP par un test de Student (t-test) (*p* valeur = 0,0006).

## 10. Etude de l'expression de la mélanopsine dans la rétine

### a. Extraction des ARNm

Tout le matériel a été précautionneusement nettoyé et maintenu dans un milieu nucléase-free, l'extraction a été faite exclusivement sous hôte. Les rétines ont été sorties du -80°C, placées sur de la carboglace, puis 500 $\mu$ L de TRI Reagent® a été ajouté dans chaque tube avant que la solution ne soit homogénéisée à l'aide d'un pilon d'homogénéisation jusqu'à dissolution complète de la rétine. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 100 $\mu$ l de chloroforme est ajouté et le tout à nouveau incubé pendant 10 minutes à température ambiante.

Pendant ce temps, des tubes « phase-lock gel » (Quantabio, Beverly, Etats-Unis) doivent être centrifugés 30 secondes à 8000g à température ambiante avant utilisation. A la fin des 10 minutes de préincubation, les 600 $\mu$ L de lysat sont ajoutés aux tubes « phase-lock gel » et le tout est centrifugé à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. À la fin de la centrifugation, le mélange est séparé en deux phases : une phase rouge qui contient le chloroforme et une phase aqueuse dans laquelle se trouve les ARN (Les ADN et les protéines se trouvant majoritairement dans la l'interphase et la phase organique). Ainsi, seule la phase aqueuse (environ 250 $\mu$ l) a été précautionneusement récupérée dans un tube Eppendorf et un volume équivalent d'éthanol 70% est ajouté avant que le tout ne soit bien mélangé. Par la suite, les ARN ont été purifiés et

récupérés à l'aide d'un microkit RNeasy (QIAGEN France, Courtaboeuf). Enfin, les ARN purifiés ont été élués dans 14µl d'eau nucléase-free avant d'être congelés.

La concentration d'ARN est contrôlée à l'aide d'un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) et la qualité des échantillons d'ARN a été mesurée en utilisant un Agilent 2100 Bioanalyzer (AGILENT, Santa Clara, CA 95051, Etats-Unis) afin d'obtenir un RIN (RNA integrity Number). Ce RIN est issu d'un algorithme permettant d'associer à un échantillon une valeur entre 1 (les ARN sont particulièrement dégradés) et 10 (les ARN sont intacts). A partir de ces données, 350ng d'ARN totaux pour chaque échantillon dont le RIN est supérieur à 6 ont été récupérés pour la RT-PCR et la qPCR.

### b. Protocole détaillé de la RT-qPCR

La RT-PCR a été réalisée à partir des 350ng d'ARN totaux pour chaque échantillon à l'aide d'un kit iScript™ Advanced cDNA Synthesis (N°1725037, BIO-RAD, 92430 Marnes-la-Coquette, France). Chaque mix de RT-PCR contenait 4µl de tampon de réaction (iScript™), 1µl de reverse transcriptase (iScript™) et 350ng d'ARN complété à 20µl d'eau nucléase-free. Le tout est placé 20 minutes à 46°C (reverse transcription) puis 1 minute à 95°C (inactivation de la reverse transcriptase). À la suite de la RT-PCR, 1µl de chaque cDNA a été prélevé puis mélangé aux autres de manière à obtenir un pool de cDNA représentatif de l'ensemble des échantillons, afin de tester l'efficacité des amorces de qPCR. Les amorces utilisées sont tirées de l'article de Hugues et collaborateurs de 2012 ([Hughes et al., 2012b](#)), nous avons ainsi étudié l'expression des gènes codant pour la mélanopsine totale (OPN4T) et de ses isoformes longue (OPN4L) et courte (OPN4S). Les gènes de ménages utilisés sont *Gapdh*, *Arbp* et *Psemb2*.

Amorce <i>Opn4</i> -F (long & short)	GCT ACC GCT CTA CCC ACC
Amorce <i>Opn4</i> -R long	CTA CAG ATG TCT GAG AGT CAC
Amorce <i>Opn4</i> -R short	CTA CAT CCC GAG ATC CAG ACT
Amorce <i>Opn4T</i> -F	TGC GAG TTC TAT GCC TTC TG
Amorce <i>Opn4T</i> -R	GGC ACG TAG GCA CTC CAA C
Amorce <i>Gapdh</i> -F	TGC ACC ACC AAC TGC TTA G
Amorce <i>Gapdh</i> -R	GAT GCA GGG ATG ATG TTC
Amorce <i>Arbp</i> -F	CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC
Amorce <i>Arbp</i> -R	ATC TGC TGC ATC TGC TTG
Amorce <i>Psemb2</i> -F	AAA TGC GGA ATG GAT ATG AAT
Amorce <i>Psemb2</i> -R	GAA GAC AGT CAG CCA GGT T

Pour les qPCR, les concentrations de cDNA ont été ajustées pour chaque gène afin d'assurer une meilleure lecture des courbes d'amplifications selon les résultats préliminaires obtenus sur le pool de l'ensemble des cDNA. Pour OPN4T et OPN4S les cDNA ont été dilués au 1:4, pour OPN4L 1:2 et enfin 1:50 pour les gènes de ménage. Le mix final pour la qPCR est composé

de 10µl de SyberGreen, 1.2µl de chaque amorce (pour une concentration de 300µM) et de 1µl de cDNA complété à 20µl avec de l'eau nucléase-free. Une analyse statistique COSINOR a été réalisée pour s'assurer que les gènes de ménages ne présentaient pas de variation rythmique de leur expression et pouvaient être utilisés afin de mesurer de manière fiable l'expression relative de la mélanopsine. Enfin, une analyse par ANOVA deux facteurs (photopériode et ZT) a été réalisée pour chaque isoforme de la mélanopsine.

## 11. Genèse des souris C57BL/6 productrices de mélatonine et *Opn4* KO

### a. Génotypage pour les gènes *Aanat* et *Hiomt*

Les animaux qui synthétisent de la mélatonine ont été générés pour la première fois par l'équipe de Christophe Ribelayga en réintroduisant les gènes non mutés des enzymes AANAT et HIOMT des souris de souche CBA sur un fond génétique C57BL/6 (Zhang et al., 2018). Un couple de souris hétérozygotes pour les allèles AANAT/HIOMT nous a été généreusement envoyé par Christophe Ribelayga (McGovern Medical School, Texas, United States) pour générer une lignée homozygote au laboratoire. La génération de cette lignée homozygote a été possible par plusieurs croisements avec des souris C57BL/6 provenant de la colonie du Chronobiotron. Après avoir obtenu un nombre suffisant de couples d'animaux hétérozygotes pour les allèles CBA des deux enzymes, ces animaux ont été croisés entre eux afin d'augmenter les chances d'obtention d'animaux homozygotes à chaque génération. Les génotypages ont été réalisés à chaque génération pour garantir un suivi optimal de la transmission des allèles CBA dans le fond génétique C57BL/6.

Amorce <i>Aanat</i> -F (CBA)	ATC ATT TTC ATT GCT ACT CCG
Amorce <i>Aanat</i> -R (CBA)	GCT ACA CCT GTT TCT CCA AAC C
Amorce <i>Hiomt</i> -F (CBA)	CAA GCC CTC AGG GTT CAG GAA
Amorce <i>Hiomt</i> -R (CBA)	GCG CCC ACC TGA CAG GAA ACG
Amorce <i>Aanat</i> -F (C57)	ATC ATT TTC ATT GCT ACT CCA
Amorce <i>Aanat</i> -R (C57)	GCT ACA CCT GTT TCT CCA AAC C
Amorce <i>Hiomt</i> -F (C57)	CAA GCC CTC AGG GTT CAG GAA
Amorce <i>Hiomt</i> -R (C57)	GCG CCC ACC TGA CAG GAA ACA

L'extraction d'ADN génomique pour le génotypage se fait par lyse d'un morceau de queue (<2mm) prélevé peu après la naissance. Les échantillons sont lysés pendant 50 minutes à 95°C dans 100µl de solution A (NaOH 25mM, EDTA 200mM) avant l'ajout de 100µl de solution B (Tris HCl 1M à pH 5). L'ADN génomique est ensuite conservé à 4°C avant génotypage.

Pour le génotypage de l'*Aanat* de CBA, le programme PCR est composé de 5 minutes à 94°C suivi de 30 cycles (30s à 94°C - 30s à 52°C - 30s à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. Après migration

des produits de PCR sur gel d'agarose (2% dans du TAE1X), la présence d'une bande à 284pb indique la présence de l'allèle génotypé. Le mélange de PCR par échantillon est le suivant :

- 1.5µL de PCR Buffer 10X
- 0.84µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0.5µL de dNTP (10mM)
- 0.25µL de chaque amorce (50mM)
- 0.25µL de Taq polymérase (5U/µl) (Euromedex)
- 1µl d'ADN à géotyper (2ng/µl)
- Le mélange est complété par de l'eau nucléase-free pour un total de 15µl

Pour le géotypage de l'*Aanat* de C57, Le programme PCR est composé de 5 minutes à 94°C suivi de 35 cycles (30s à 94°C - 30s à 54°C - 30s à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. Après migration des produits de PCR sur gel d'agarose, la présence d'une bande à 284pb indique la présence de l'allèle génotypé. Le mélange de PCR par échantillon est le suivant :

- 1.5µL de PCR Buffer 10X
- 1.5µL de MgCl<sub>2</sub> (15mM)
- 0.75µl de DMSO (99,7%) (Hybri-Max, Sigma D2650)
- 0.5µL de dNTP (10mM)
- 0.25µL de chaque amorce (50mM)
- 0.25µL de Taq polymérase (5U/µl) (Euromedex)
- 1µl d'ADN à géotyper (2ng/µl)
- Le mélange est complété par de l'eau nucléase-free pour un total de 15µl

Le protocole de géotypage de l'*Hiomt* pour les allèles CBA et C57 est identique, Le programme PCR est constitué de 5 minutes à 94°C suivi de 35 cycles (30s à 94°C - 30s à 56°C - 35s à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. Après migration des produits de PCR sur gel d'agarose (2% dans du TAE1X), la présence d'une bande à 311pb indique la présence de l'allèle génotypé. Le mélange de PCR par échantillon est le suivant :

- 1.5µL de PCR Buffer 10X
- 1µL de MgCl<sub>2</sub> (15mM)
- 0.75µl de DMSO (99,7%) (Hybri-Max, Sigma D2650)
- 0.5µL de dNTP (10mM)
- 0.25µL de chaque amorce (50mM)
- 0.25µL de Taq polymérase (5U/µl) (Euromedex)
- 1µl d'ADN à géotyper (1-2ng/µl)
- Le mélange est complété par de l'eau nucléase-free pour un total de 15µl

#### **b. Mesure de la sécrétion de mélatonine chez les hétérozygotes**

Plusieurs animaux hétérozygotes pour les allèles *Aanat* et *Hiomt* de CBA ont été générés pendant les croisements. Afin de savoir si l'hétérozygotie pouvait être suffisante pour rétablir une sécrétion circadienne de mélatonine, 6 souris C57 *Hiomt*<sup>C57/CBA</sup> *Aanat*<sup>C57/CBA</sup> ont été maintenues en cycle LD 12:12. Au bout d'une semaine, les animaux ont été mis à mort la nuit

à  $\pm$ ZT20 et les glandes pinéales ont immédiatement été congelées pour procéder à un dosage RIA. Le dosage a été réalisé selon un protocole identique à celui présenté dans la **partie I.7**.

### c. Génotypage pour le gène *Opn4* des souris C57BL/6 productrices de mélatonine

Des souris C57BL/6 homozygotes pour les allèles *Aanat* et *Hiomt* de CBA précédemment obtenues ont été croisées avec des souris C57BL/6 KO pour le gène de la mélanopsine (*Opn4* KO). L'objectif de ces croisements étant d'obtenir à terme des animaux qui synthétisent de la mélatonine et qui sont OPN4 KO. L'extraction d'ADN génomique pour le génotypage se fait par lyse d'un morceau de queue (<2mm) prélevé peu après la naissance. Les échantillons sont lysés pendant 50 minutes à 95°C dans 100µl de solution A (NaOH 25mM, EDTA 200mM) avant l'ajout de 100µl de solution B (Tris HCl 1M à pH 5).

Amorce <i>Opn4</i> 4 <sup>E3</sup>	TCA TCA ACC TCG CAG TCA GC
Amorce <i>Opn4</i> 2 <sup>E4</sup>	CAA AGA CAG CCC CGC AGA AG
Amorce <i>Opn4</i> -R (KO)	CAG AAG GCA TAG AAC TCG CAA C
Amorce <i>Opn4</i> -neo (KO)	CCG CTT TTC TGG ATT CAT CGA C

Pour le génotypage de l'allèle *Opn4* KO, le programme PCR est constitué de 5 minutes à 94°C suivi de 35 cycles (30s à 94°C - 30s à 56°C - 60s à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. Après migration des produits de PCR sur gel d'agarose (2% dans du TAE1X), la présence d'une bande à 900pb indique la présence de l'allèle génotypé. Le mélange de PCR par échantillon est le suivant :

- 1.5µL de PCR Buffer 10X
- 1.5µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0.75µl de DMSO (99,7%) (Hybri-Max, Sigma D2650)
- 0.5µL de dNTP (10mM)
- 0.25µL de chaque amorce (50mM)
- 0.25µL de Taq polymérase (5U/µl) (Euromedex)
- 1µl d'ADN à génotyper
- Le mélange est complété avec de l'eau nucléase-free pour un total de 15µl

Pour le génotypage de l'allèle *Opn4* WT, le programme PCR est constitué de 5 minutes à 94°C suivi de 35 cycles (30s à 94°C, 30s à 60°C, 60s à 72°C) puis 5 minutes à 72°C. Après migration des produits de PCR sur gel d'agarose (2% dans du TAE1X), la présence d'une bande à 289pb indique la présence de l'allèle génotypé. Le mélange de PCR par échantillon est le suivant :

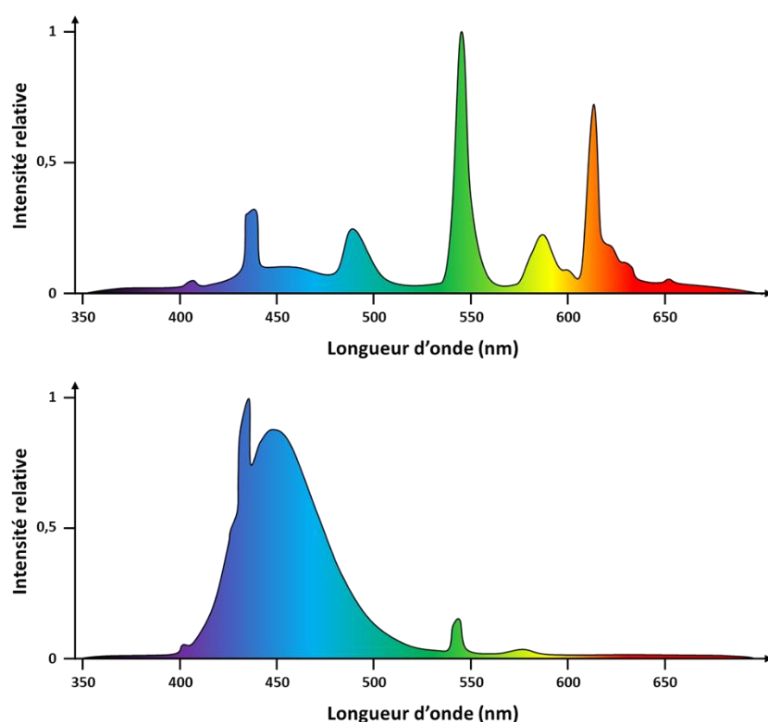
- 1µL de PCR Buffer 10X
- 1µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0.5µl de DMSO (99,7%) (Hybri-Max, Sigma D2650)
- 0.25µL de dNTP (10mM)
- 0.5µL de chaque amorce (10mM)
- 0.25µL de Taq polymérase (5U/µl) (Euromedex)
- 1µl d'ADN à génotyper
- Le mélange est complété avec de l'eau nucléase-free pour un total de 11µl

## II. Axe 2 : impact de la lumière bleue sur le comportement

### 1. Design expérimental et système d'éclairage

#### a. Protocole d'exposition avec néons (2017-2018)

L'objectif de ces premiers protocoles d'exposition était de tester différents créneaux d'exposition à la lumière bleue afin de modéliser au mieux l'exposition aux écrans et à la lumière bleue chez le modèle murin. Pour cela, des néons lumière bleue (Philips 727541 - TL-D 36W/18 BLUE Straight T8 Fluorescent Tube Light Bulb, Philips France) ainsi que des néons blanc chaud appauvris en lumière bleue (TL-D 36W/18 Warm White T8 Fluorescent Tube Light Bulb, Philips France) ont été utilisés (spectres en **figure 21**).



**Figure 21 : Caractéristiques spectrales des néons « blanc chaud » (en haut) et des néons lumière bleue (en bas).**

Deux protocoles d'exposition ont été appliqués pendant cette période (**figure 22**) :

**1<sup>er</sup> protocole effectué en 2017** : a consisté à exposer des animaux MAOA KO (n=20) et C57BL/6 WT (n=22) à 6h de lumière bleue à 100 lux soit en début de journée (ZT21 à ZT3) soit en fin de journée (ZT9 à ZT15) en plus d'un cycle LD 12:12 généré par les plafonniers de l'animalerie de ZT0 à ZT12. Ce protocole d'exposition a été appliqué pendant 8 semaines, puis les tests comportementaux (test résident/intrus et test boîte éclairée/sombre) (**cf. partie II.3**) ont été réalisés en fin de journée entre ZT9 et ZT11.

**2<sup>ème</sup> protocole effectué en 2018** : a consisté à exposer des animaux MAOA KO (n=19) et C57BL/6 WT (n=22) à 3 heures de lumière blanche de ZT0 à ZT3 (plafonnier d'animalerie) suivie



de 6 heures de lumière bleue (néons bleus à 100 lux) ou de lumière blanc chaud (néons blanc chaud 100 lux) de ZT3 à ZT9. Ce protocole d'exposition a été appliqué pendant 10 semaines, puis les tests comportementaux (test résident/intrus et test boîte éclairée/sombre) ont été réalisés sur les créneaux de lumière blanche entre ZT1 et ZT3 avant allumage des néons bleus ou blanc chaud (cf. tests comportementaux et analyses). Enfin, les animaux ont été placés 24h en obscurité avant de recevoir un pulse de 1 heure de lumière bleue ou blanc chaud (à 100 lux) ou pas de pulse (contrôle obscurité) avant d'être mis à mort l'heure suivante (cf. mise à mort).

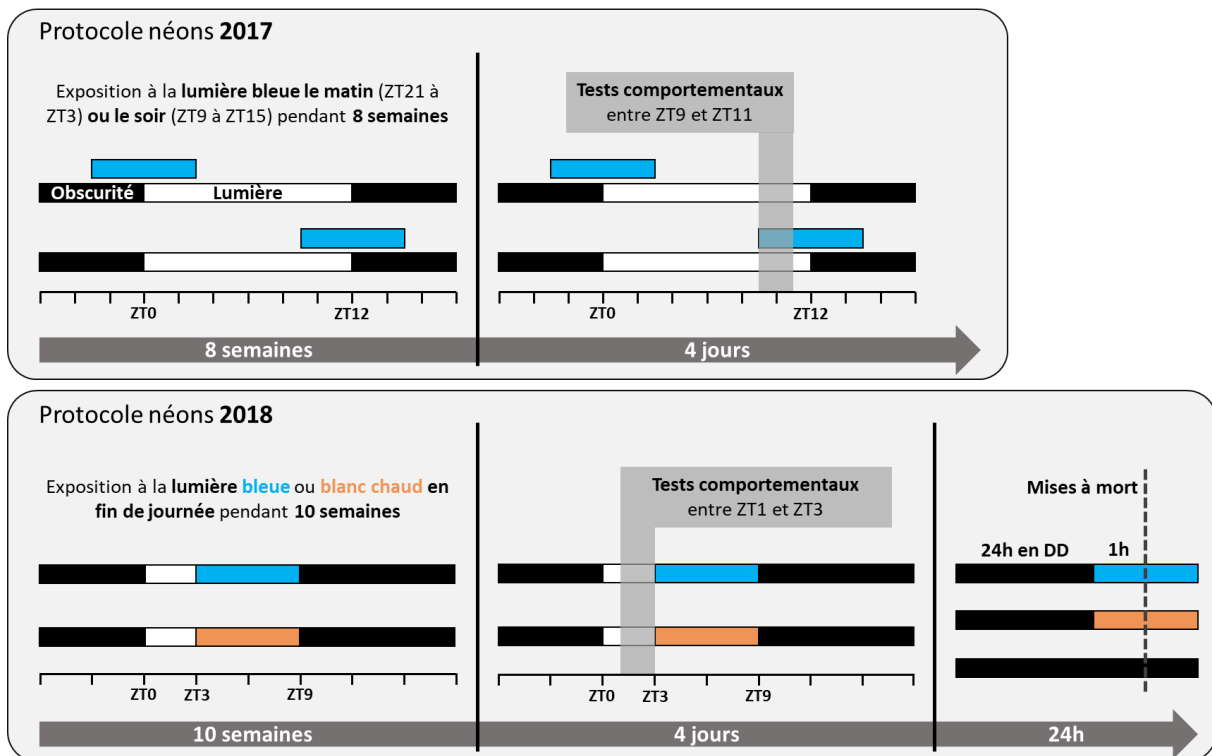


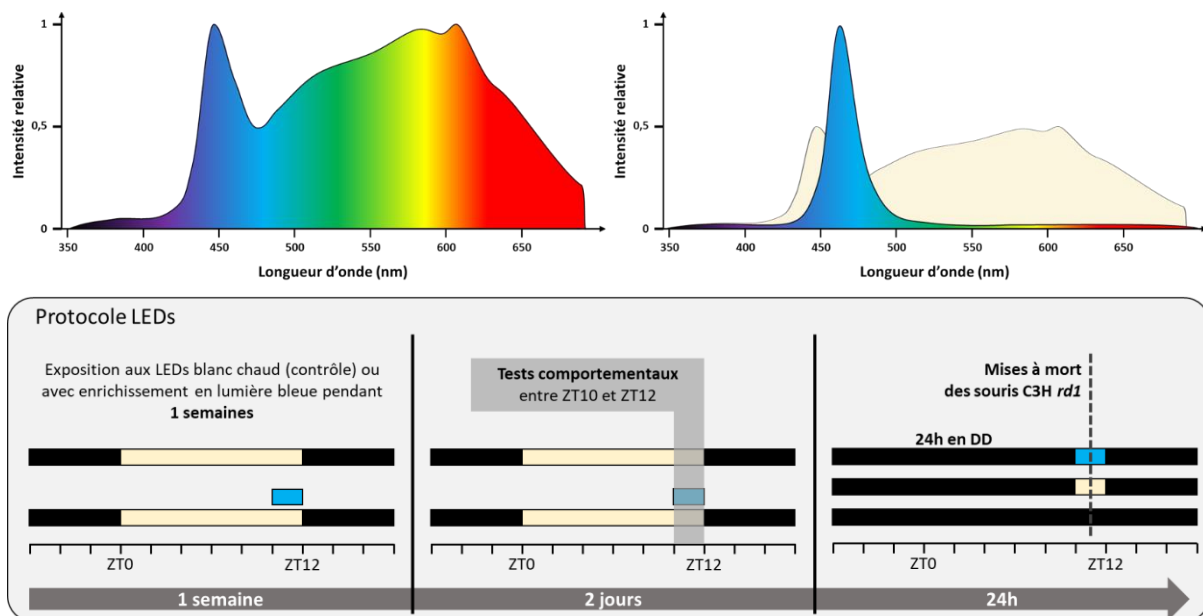
Figure 22 : Résumé des protocoles d'exposition aux néons effectués en 2017 et en 2018

### b. Protocole d'exposition avec rubans LEDs (2020)

Pour ce protocole d'exposition, deux bandes LEDs (Ruban LED RL IP67 17,3W RGB CW WW 24V, Référence 5543308, entreprise LCI, Strasbourg, France) ont été utilisées. La première bande LEDs a été programmée en blanc chaud à 50 lux d'intensité selon une exposition LD 12:12 et constitue le protocole d'exposition contrôle. Le protocole d'enrichissement en lumière bleue est identique au protocole contrôle, à la différence que la deuxième bande LEDs est programmée pour générer une lumière bleue (460nm) à 50 lux entre ZT10 et ZT12 (spectre et résumé des protocoles **figure 23**). Ce créneau d'exposition a été choisi à la suite de l'article de Todd et collaborateurs sur la régulation circadienne de l'agressivité ([Todd and Machado, 2019](#)). Le but étant d'exposer et de tester les animaux avant l'acrophase présumée du comportement de type agressif.

Pour les animaux C3H *rd1*, 30 animaux mâles de deux mois ont été divisés en deux groupes d'exposition (sans enrichissement en bleu et avec enrichissement en bleu). Pour chaque groupe, 7 animaux ont reçu des injections intraoculaires de CTB + IgG-Saporine et 8 animaux des injections de CTB + UF008 (anticorps anti-mélanopsine de souris) couplé à la toxine Saporine (**partie II.2** du matériels & méthodes). Après 2 semaines de récupération et pour s'assurer de la dégénérescence des ipRGCs (selon le protocole de Göz et collaborateur (Göz et al., 2008), les animaux sont placés pendant 1 semaine dans la salle d'expérimentation en cycle LD 12:12 avec la lumière habituelle de l'animalerie. Leur activité locomotrice est enregistrée à partir d'ici grâce à des capteurs infrarouges pour déterminer chez quels animaux l'injection d'immunotoxine a été efficace. Comme la destruction de la majeure partie des ipRGCs entraîne une activité locomotrice en libre cours, l'actimétrie est un indicateur fiable pour déterminer l'état du système mélanopsinergique (Zhang et al., 2017). Après une semaine, le plafonnier de l'animalerie a été désactivé et le protocole d'exposition avec les bandes LEDs a été lancé pendant 2 semaines. Lors de la deuxième semaine d'exposition, les tests comportementaux ont été réalisés entre ZT10 et ZT12.

Pour les animaux MAOA KO ou WT, deux groupes ont été constitués, chacun contenant 6 animaux MAOA KO et 6 animaux WT. Après 1 semaine d'habituation avec exposition aux néons plafonniers de l'animalerie (environ 150 lux, voir spectre partie 1.1), ces animaux ont été soumis aux mêmes protocoles d'exposition et tests comportementaux que les C3H *rd1*. L'activité locomotrice des animaux a été également suivie pendant l'ensemble du protocole.



**Figure 23 : Résumé des protocoles d'exposition aux LEDs chez les animaux C3H *rd1*, WT et MAOA KO.** Le spectre à gauche représente celui des LEDs blanc chaud tandis que le spectre de droite représente celui des LEDs lumière bleue (le spectre des LEDs blanc chaud a été représenté en fond pour mettre en évidence l'enrichissement spectral). En dessous, les animaux ont été exposés à 1 semaine de LEDs sans ou avec enrichissement en lumière bleue en fin de journée. Les tests comportementaux ont été réalisés entre ZT10 et ZT12.

## **2. Injections intraoculaires chez les animaux C3H *rd1***

### **a. Préparation des produits injectables**

Une injection de 2µl par œil est conseillée selon les directives du CREMEAS (Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg) et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Afin d'éviter une répétition de la procédure, la CTB et l'immunotoxine (UF008-Saporine) ont été administrées en 1 seule injection par œil. La CTB (C9903, Cholera Toxin B subunit, Sigma-Aldrich) sous forme lyophilisée et non conjuguée a été reconstituée avec de l'eau physiologique stérile pour atteindre une concentration de 2µg/µL. L'immunotoxine UF008-Saporine et l'IgG-Saporine (Melanopsin-SAP Kit (KIT-44), Advanced Targeting systems Inc., Carlsbad, CA 92011) ont été diluées à une concentration de 400ng/µL. Enfin, la solution finale d'injection a été préparée en mélangeant de manière équivalente les deux produits. Ainsi, l'injection de 2µL par œil contenait 2µg de CTB et 400ng d'immunotoxine ou contrôle IgG-SAP.

### **b. Protocole d'injection intravitréen**

Pour les injections intravitréennes, les animaux ont d'abord été anesthésiés à l'isoflurane 4% et maintenus ainsi grâce à une arrivée à 2% par masque chirurgical adapté aux rongeurs. L'œil est préalablement hydraté et anesthésié localement grâce à une goutte de tétracaïne. Par la suite, une injection de 2µl de CTB + IgG-SAP ou CTB + UF008-SAP est réalisée au niveau de l'*ora serrata* à l'aide d'une seringue Hamilton 10µl équipée d'une aiguille de 32 gauge (32G). Après injection, l'aiguille est maintenue en place une vingtaine de seconde afin d'éviter les reflux de liquide dus à la pression intraoculaire. Enfin, les yeux ont été réhydratés après injection par application locale d'Ocrygel® et l'animal a été replacé dans sa cage. Le suivi post-opératoire des animaux a été assuré pendant 2 semaines : les éventuels signes de déshydratation de la cornée ont été traités à l'Ocrygel® et les signes inflammatoires par administration de Metacam® (Méloxicam et Benzoate de sodium).

## **3. Tests comportementaux et analyses**

Les tests résident/intrus et boîte éclairée/sombre ont été réalisés selon la même méthodologie entre les différents protocoles, seuls la durée et le moment du test (en ZT) sont modifiés entre les protocoles d'exposition avec néons (2017-2019) et le protocole d'exposition avec LEDs (2020) :

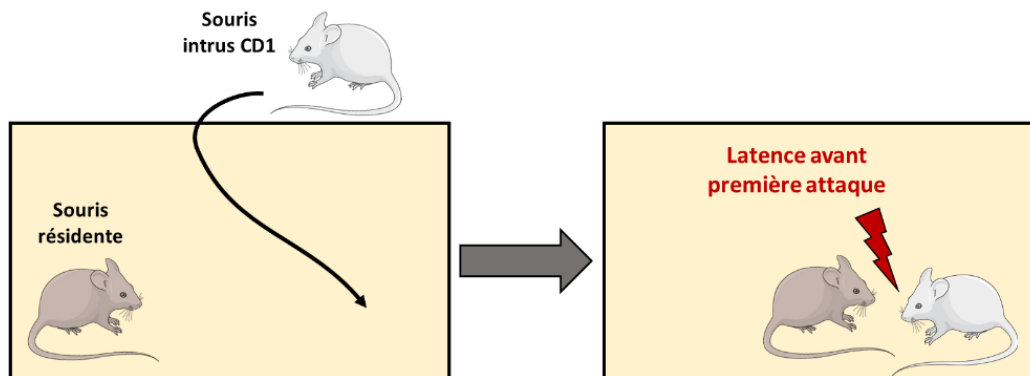
- Les tests résident/intrus ont duré 10 minutes par animal pour les protocoles d'exposition avec néons (2017-2019) et ont été réalisés entre ZT9 et ZT11 pour le protocole d'exposition de 2017 et entre ZT1 et ZT3 (afin d'évaluer l'effet chronique en dehors du créneau d'exposition aux néons) pour le protocole de 2018. Seul le test de la boîte éclairée/sombre a été réalisé dans le protocole néons de 2018 et également entre ZT1 et ZT3.

- Les tests résident/intrus ont duré 5 minutes par animal et ont été réalisés entre ZT10 et ZT12 pour les protocoles d'exposition LEDs (2020). La réduction de la durée des tests permet de tester l'ensemble des animaux entre ZT10 et ZT12, qui constitue le créneau d'intérêt dans l'activation des structures liées à l'agressivité (Todd et al., 2018). Une augmentation de la durée des tests aurait entraîné leur répartition sur plusieurs jours, rallongeant les périodes d'exposition aux LEDs, ce qui peut modifier la sortie comportementale et physiologique.

Les résultats des tests comportementaux ont été traités *via* des analyses ANOVA un facteur (type d'exposition) ou deux facteurs (interaction type d'exposition et génotype) pour les différents paramètres des tests (latences, nombre de transitions, ...).

#### a. Principe du test résident/intrus

Dans ce test, des animaux de souche CD1 (albinos) sont utilisés comme intrus et placés dans la cage des animaux résidents (MAOA KO, C57BL/6 ou encore C3H *rd1*) (**figure 24**). A partir de là, la latence avant le premier contact ainsi que la latence avant la première attaque sont mesurées et permettent d'évaluer l'agressivité de type social. Le test est immédiatement arrêté après la première attaque pour éviter toute blessure. Le test a été arrêté au bout de 5 minutes (protocole LEDs) ou 10 minutes (protocole néons) quand aucune attaque n'avait eu lieu. Une augmentation de la latence avant premier contact est interprétée comme un comportement de type-anxieux et une diminution de la latence avant la première attaque est interprétée comme un comportement de type-agressif.

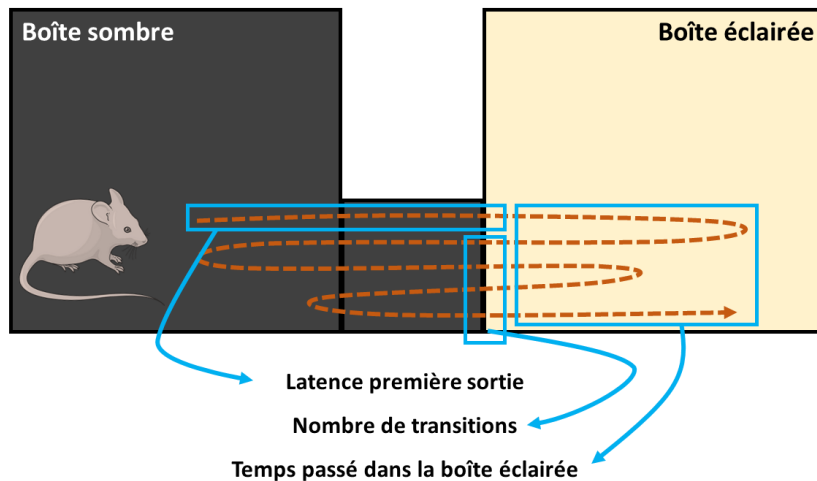


**Figure 24 : Schéma du test résident/intrus.** La souris intruse (blanche) est placée dans la cage de la souris résidente (souris testée). A partir de ce moment, la latence avant le premier contact et la latence avant la première attaque sont mesurées pour évaluer le comportement de type agressif. Le test est arrêté au bout de 5 à 10 minutes.

#### b. Principe du test de la boîte éclairée/sombre

Pour ce test, deux boîtes cubiques de 20X20X20cm ont été utilisées (**figure 25**) : une boîte est complètement opaque (boîte sombre) et une boîte est transparente (boîte éclairée). Une lampe est ajoutée au-dessus de la boîte transparente pour augmenter l'intensité et donc l'effet photophobique procuré par la boîte éclairée. Les deux boîtes sont reliées par un tunnel

opaque de 5cm qui est considéré comme une continuité de la boîte sombre. L'animal a été précautionneusement placé au centre de la boîte sombre et pendant 5 minutes plusieurs variables sont mesurées : la latence avant la première sortie dans la boîte éclairée, le nombre de transition entre la boîte sombre et la boîte éclairée et le temps total passé dans la boîte éclairée. Entre chaque test, la boîte est rigoureusement nettoyée avec de l'alcool à 70%. Une augmentation de la latence de première sortie de la boîte sombre, une diminution du nombre de transitions et une diminution du temps passé dans la boîte éclairée sont considérées comme un comportement de type-anxieux.



**Figure 25 : Schéma du test de la boîte éclairée/sombre.** La souris testée est placée au centre de la boîte sombre. A partir de ce moment, la latence avant la première sortie vers la boîte éclairée, le nombre de transitions vers la boîte éclairée ainsi que le temps passé dans la boîte éclairée sont mesurés. Le test est arrêté au bout de 5 à 10 minutes.

#### 4. Traitement des données d'actimétrie pour les protocoles néons et LEDs

L'acquisition des données d'actimétrie s'est déroulée sur l'ensemble des protocoles d'exposition en utilisant le système CAMS, qui est détaillé dans l'**Axe 1.1** du Matériels et Méthodes. Dans le cadre des protocoles d'exposition néons (2017-2018), les profils individuels d'activité locomotrice des souris MAOAKO ou WT ont été combinés pour obtenir un profil locomoteur moyen représentatif des différents groupes des génotypes/expositions. Par ailleurs, la quantité d'activité locomotrice totale, la quantité d'activité locomotrice diurne et nocturne ainsi que la quantité d'activité des souris sur les créneaux d'exposition ont été mesurées pour déterminer l'effet du génotype et l'effet du type d'exposition sur l'activité des souris.

Dans le cadre des protocoles d'exposition LEDs (2020), les profils d'activité des animaux avant et pendant l'exposition aux LEDs ont été extraits et analysés (répartition de l'activité locomotrice en fonction des différents ZT) afin de déterminer les effets des génotypes, les effets des LEDs et d'un enrichissement en lumière bleue. Les mesures de l'activité locomotrice chez les animaux C3H *rd1* ont également permis de déterminer quels animaux étaient en

activité libre cours parmi ceux ayant reçu l'injection intraoculaire d'immunotoxine (UF008-SAP), pour la constitution des groupes de mise à mort.

## 5. Protocoles d'expositions aiguës aux néons/LEDs et mise à mort

### a. Protocoles d'expositions aiguës

L'objectif à la fin des protocoles d'expositions chroniques est d'évaluer l'effet de la lumière bleue (ou lumière enrichie en bleu), de la lumière blanc chaud (ou lumière appauvrie en bleu) ou de l'absence de lumière sur l'activation des structures cérébrales d'intérêts. Pour cela, à la fin des protocoles d'exposition avec néons ou avec LEDs, les animaux ont été divisés en 3 groupes et placés 24 heures en obscurité constante (DD), avant de recevoir selon le groupe :

- Un pulse de 1h de lumière bleue (néons à 100 lux – LEDs à 50 lux)
- Un pulse de 1h de lumière blanc chaud (néons à 100 lux – LEDs à 50 lux)
- Pas de pulse (contrôle obscurité)

Dans l'ensemble des protocoles, les animaux ont été mis à mort 1 heure après l'allumage de la lumière (**figure 22 et 23**). Pour les animaux C3H *rd1* du protocole d'exposition LEDs, les animaux ont été mis à mort à ZT11 après 1 heure de pulse entre ZT10 et ZT11, de manière à ce que les tissus soient fixés au PFA à des CT/ZT identiques à ceux des tests comportementaux.

### b. Récupération des tissus

La mise à mort des animaux a été réalisée par injection intrapéritonéale d'une solution d'EUTHASOL-VET (182 mg/kg). Une fois l'arrêt respiratoire confirmé, la cage thoracique de l'animal est rapidement ouverte et une incision est réalisée au niveau de l'oreillette droite du cœur (pour permettre la sortie du sang et du fixateur) pendant qu'une aiguille est placée dans le ventricule gauche (pour permettre l'injection du fixateur). Un volume de 5mL de PBS1X est injecté dans le ventricule gauche afin de vider le sang encore présent dans le système vasculaire suivi de l'injection d'environ 20mL de paraformaldéhyde 4% (PFA4%). A la fin de la perfusion, les yeux sont récupérés (par incision du nerf optique et des tissus conjonctifs) et placés 3h en post fixation dans du PFA 2%. La tête est coupée et le cerveau est extrait avant d'être placé pendant 12 heures en post fixation dans du PFA4%. A la fin de la fixation, les yeux et les cerveaux sont placés à 4°C dans du PBS1X + Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) 0,02%.

## 6. Immunohistochimie

### a. Coupes de cerveau et marquages de la protéine C-FOS

#### i. Cerveaux de souris fixés et congelés

Les cerveaux sont préalablement cryoprotégés par des bains de PBS1X + sucrose à concentration croissante (6h à 10%, 6h à 20% puis 12h à 30%). A la fin de l'étape de

cryoprotection, les cerveaux sont placés pendant 30 minutes sur une feuille d'aluminium posée sur de la carboglace pour congélation et conservés à -80°C. Les cerveaux ont été par la suite coupés en tranches coronales de 30µm au cryostat et les différentes régions d'intérêt ont été récupérées et triées à l'aide d'un atlas (Atlas de Keith B.J. Franklin & George Paxinos, 2007). Les tranches sont stockées au -20°C dans une solution Watson (PB 0,1M, 30% sucrose, 1% de polyvinylpyrrolidone, 30% d'éthylène glycol, 0,9% de NaCl).

L'immunohistochimie C-FOS se fait sur coupe flottante pour permettre une meilleure pénétration de l'anticorps dans le tissu. Les coupes sont préalablement rincées 6 fois 10 minutes dans du PBS1X + tween20 0,05% avant une étape de préincubation dans une solution de PBS1X + Sodium Azide 0.3% + sérum de chèvre (NGS) 5% pendant 1h30 sous agitation à température ambiante. Les coupes sont ensuite incubées pendant la nuit avec l'anticorps primaire de lapin anti-C-FOS (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, 69115 Heidelberg, Germany) au 1/2000 dans la solution de préincubation sous agitation à 4°C. Les coupes sont alors rincées 3 fois 10 minutes avec du PBS1X + tween20 0.05% puis incubées pendant 2 heures avec un anticorps secondaire de chèvre biotinylé anti-anticorps de lapin (VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010, United States) dilué au 1/500 dans une solution de PBS1X + 0.3% tween20 à température ambiante sous agitation. Les coupes sont rincées à nouveau 3 fois 10 minutes au PBS1X + tween20 0.05%. La solution d'avidine-peroxydase est préparée extemporanément en mélangeant les solutions A et B du kit précédent (VECTASTAIN® ABC-HRP Kit) au 1/500 dans du PBS1X + tween20 0.05% (le mélange A-B doit reposer au moins 30 minutes avant utilisation). Les coupes sont alors incubées dans cette solution pendant 2 heures supplémentaires sous agitation à température ambiante. Après 3 fois 10 minutes de rinçage au PBS1X, la révélation se fait par incubation pendant ±15 minutes dans une solution de PBS1X + 0.5mg/ml de 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) dans laquelle a été rapidement ajoutée 0.015% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les coupes sont finalement rincées 3 fois 10 minutes au PBS1X.

Après le rinçage final, les coupes sont plongées dans une coupelle de PBS1X et sont montées sur des lames en les faisant soigneusement glisser à l'aide d'un pinceau. Une fois les coupes correctement placées sur des lames, celles-ci sont séchées à température ambiante pendant au moins 24h. Le montage final des lames nécessite des étapes de déshydratation qui consistent en des bains d'alcool de concentrations croissantes : 10 minutes en alcool 70% puis 95%, deux fois 10 minutes dans de l'alcool à 100% puis 2 fois 10 minutes dans du toluène. Enfin, les lames sont maintenues dans le toluène (pour éviter une dégradation physique des tissus à l'air libre) puis sorties et montées entre lame et lamelle en utilisant de l'Eukitt® (Chem-Lab, Zedelgem, Belgique). Après un séchage sous hotte pendant deux à trois jours, les lames sont observées au microscope optique.

## ii. Cerveaux de souris fixés et enrobés au polyéthylène glycol (PEG)

Les cerveaux des souris C3H *rd1* des protocoles d'exposition LEDs sont préalablement déshydratés et enrobés au PEG suivant le protocole décrit dans la partie 1.8. La récupération des coupes pour l'immunohistochimie est réalisée en découpant 1 coupe sur 10 par ruban (par intervalle de 120µm donc), ce qui permet d'obtenir au moins une coupe de chaque structure anatomique d'intérêt. Les lames montées sont rapidement séchées au four à 50°C pendant 15 minutes avant d'être stockées dans du TBS1X à 4°C. Le marquage immunohistochimique sur cerveau enrobé au PEG nécessite préalablement une réactivation antigénique, car les étapes de déshydratation préalables entraînent souvent un masquage des sites antigéniques. Les lames stockées en TBS1X sont rincées 2 fois 10 secondes dans de l'eau distillée avant d'être incubées dans du tampon citrate (40mM d'acide citrique/sodium citrate à pH 6,5) à 95°C pendant 1 heure. Les lames sont ensuite refroidies pendant au moins 30 minutes à température ambiante avant 2 fois 2 minutes de rinçage au TBS1X. L'étape de préincubation/blocage est réalisée par incubation pendant au moins une 1 heure dans une solution de lait écrémé en poudre (qui correspond au surnageant obtenu après centrifugation (10 minutes à 1500G) d'une solution de 3% de Lait en poudre dissous dans du TBS1X + 0.05% Tween20 + 0.02% de NaN<sub>3</sub>). Les lames sont ensuite incubées pendant au moins 12 heures à température ambiante avec l'anticorps primaire de lapin anti-C-FOS (sc-52, Santa Cruz Biotechnology, 69115 Heidelberg, Germany) au 1/2000 dans une solution de TBS1X + 0.05% Tween20 + Sérum de veau foetal (BSA) à 1%. Après 3 fois 10 minutes de lavage au TBS1X + 0.05% Tween20, les lames sont incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire d'âne anti-anticorps de lapin biotinylé dilué au 1/2000 dans une solution de TBS1X + 0.05% Tween 20 + 1% BSA. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois 10 minutes au TBS1X + 0.05% Tween20 et incubées avec de la Streptavidin-Peroxidase (Streptavidin-POD conjugate, Roche®) diluée à 1/2000 dans une solution de TBS1X + 0.05% Tween20 + 0.5% de « Cold Water Fish Skin Gelatin » (CWFG). Les lames sont lavées une nouvelle fois 3 fois 10 minutes au TBS1X + 0.05% Tween20 avant révélation. Pour la révélation, les lames sont préincubées pendant 10 minutes dans du TBI (50mM Tris + 10mM imidazole à 7,6 pH) avant d'être incubées pendant 20 minutes dans une solution de TBI + 0.5mg/ml DAB à laquelle est rapidement ajouté 0.015% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La révélation est arrêtée par un bain de TBS1X (1 minute) suivie de 2 fois 5 minutes de rinçage supplémentaire en TBS1X. Le montage des lames est par la suite identique au protocole pour les coupes flottantes.

### b. Marquage sur coupes transversales de rétine

A l'aide d'une loupe binoculaire, les yeux fixés sont disséqués afin de retirer la cornée (en la découpant de manière circulaire) et le cristallin, de façon à ce que la rétine reste liée à l'épithélium pigmentaire (RPE) et que la sclère maintienne la structure. Les tissus sont ensuite cryoprotégés suivant le même protocole que les cerveaux (cf. 5.a.i). A la fin de la cryoprotection, les yeux sont placés dans des moules cubiques en aluminium remplis d'OCT (Optimal Cutting Temperature compound, Tissue-Tek®) et orientés de façon à ce que la rétine soit sur le plan vertical. Enfin, les moules sont placés sur de la carboglace pour permettre une



congélation progressive avant d'être stockés à -80°C. Les coupes transversales des rétines sont réalisées au cryostat avec une épaisseur de 12µm. La pigmentation de la sclère et celle du RPE permettent d'orienter l'angle de la coupe, la rétine étant difficilement discernable de l'OCT congelé. Les coupes sont immédiatement montées sur lame en venant mettre une lame à 0°C (maintenue sur glace) au contact de la coupe au cryostat : la force électrostatique vient plaquer la coupe sur la lame et la différence de température provoque la fonte de l'OCT et l'adhérence de la coupe sur la lame. Les coupes transversales de rétines sont ainsi montées les unes après les autres sur les lames, avant que celles-ci soient stockées à -20°C.

Au début de l'immunohistochimie (IHC), les lames ont été rincées 3 fois 10 minutes au PBS1X à la suite de leur décongélation avant d'être perméabilisées 5 minutes dans une solution de PBS1X + 0.1% Triton X100. Cette étape est suivie par une préincubation de 30 minutes dans une solution de PBS1X + BSA 0.1% + Tween20 0.1% + NaN<sub>3</sub> 0.1% à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées pendant 12h à température ambiante avec les anticorps primaires de lapin anti-M-opsine 1/1000 (ab5045, Sigma-Aldrich), anticorps monoclonal de souris anti-rhodopsine 1/40000 (Rho 4D2, originaire du laboratoire) ou anticorps de lapin anti-mélanopsine de souris 1/4000 (Melanopsin rabbit polyclonal AB-N38, Advanced Targeting systems Inc.) dilués dans une solution buffer A (PB 0.1M ; 3% NDS, 1% BSA, 0.5% triton X100 et 0.05% NaN<sub>3</sub>). Après 3 fois 10 minutes de rinçage au PBS1X, les lames ont été incubées 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires correspondants : anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin couplés Alexa Fluor® 488/594 ou anticorps de chèvre anti-anticorps de souris couplés Alexa Fluor® 488/594 dilués au 1/1000 dans la solution Buffer A. L'excès d'anticorps secondaire a été retiré par 3 fois 10 minutes de rinçage au PBS1X. Les lames ont ensuite été incubées 10 minutes dans une solution de PBS1X + DAPI 1/500 avant d'être rincées 2 fois 5 minutes au PBS1X. Enfin, les lames ont été montées au Mowiol® pour observation au microscope à fluorescence ou au NanoZoomer.

### **c. Acquisition et analyse des marquages immunohistochimiques C-FOS et OPN4**

#### **i. Marquages C-FOS**

Pour les marquages C-FOS obtenus lors des protocoles d'exposition néons (2017-2018), les lames ont été observées au microscope optique et quelques photos au grossissement X100 et X200 ont été prises au niveau des structures d'intérêts (SCN, LS, BNST, VMH, MeA) à titre comparatif. La grande variabilité dans la qualité des marquages et la difficulté à obtenir des images comparables nous ont amenés à l'utilisation d'outils d'acquisition plus efficaces (comme le NanoZoomer) pour la lecture de ce type de marquage. Lors des protocoles d'exposition avec bandes LEDs chez les C3H *rd1* pour les marquages C-FOS, 40 lames ont été numérisées en utilisant le NanoZoomer avec une acquisition de l'ensemble de la lame. Bien que l'épaisseur des coupes soit de seulement 12µm, l'acquisition a été réglée de façon à avoir 3 couches différentes sur l'axe Z : 0µm (niveau où le focus a été fait) puis 4µm et 8µm de profondeur. Pour l'interprétation du marquage, l'ensemble des observations et des photos a

été fait après ajustement de ces paramètres sur le logiciel du NanoZoomer NDPview2 : Ratio Gamma (augmenté à 1,8 sur 1), luminosité (diminuée à 65%) et contraste (augmenté à 150%).

Pour cette étude, les cartes anatomiques de l'atlas du cerveau de souris (Keith B.J. Franklin & George Paxinos, 2007) ont été complétées avec les zones ciblées par les ipRGCs (en bleues) à partir de l'article de Delwig et collaborateur (Delwig et al., 2016) ainsi que par les zones décrites comme étant impliquées dans le comportement agressif (en rouge) à partir de l'article de Nelson & Trainor (Nelson and Trainor, 2007) (**figure 26 – 3 pages**). Ainsi, les patterns de marquage C-FOS ont été comparés structure par structure entre les différents groupes d'exposition et des captures d'images de la lame numérisée ont été faites afin d'illustrer les éventuelles différences d'activation.

#### **i. Marquages OPN4**

L'acquisition des marquage OPN4 sur rétine à plat a été réalisée au NanoZoomer suivant les mêmes paramètres que dans la partie **1.6.b**. Pour les animaux MAOA KO et C57 des protocoles d'expositions avec néons bleu ou blanc chaud, le comptage des ipRGCs a été fait sur rétine entière et la densité d'ipRGCs (en nombre de cellules par mm<sup>2</sup> de rétine) a été calculée à partir du logiciel NDPview2.

Pour les animaux C3H *rd1* des protocoles d'exposition avec LEDs, le comptage des ipRGCs a été réalisé chez des animaux qui ont reçu l'injection d'IgG-SAP (contrôles) et des animaux qui ont reçu l'injection d'immunotoxine (n=16), dont 6 qui présentaient un profil d'activité locomotrice en libre cours. Ces comptages ont été réalisés sur les deux rétines (droite et gauche) sur 4 champs d'observation au X200 entre la périphérie et le centre de la rétine. Une valeur représentative du nombre d'ipRGCs par animal a été obtenue par moyennage des 8 valeurs individuelles. Les comparaisons des groupes ont été faites par analyse ANOVA à deux facteurs (type d'injection reçue et activité locomotrice en libre cours ou non).

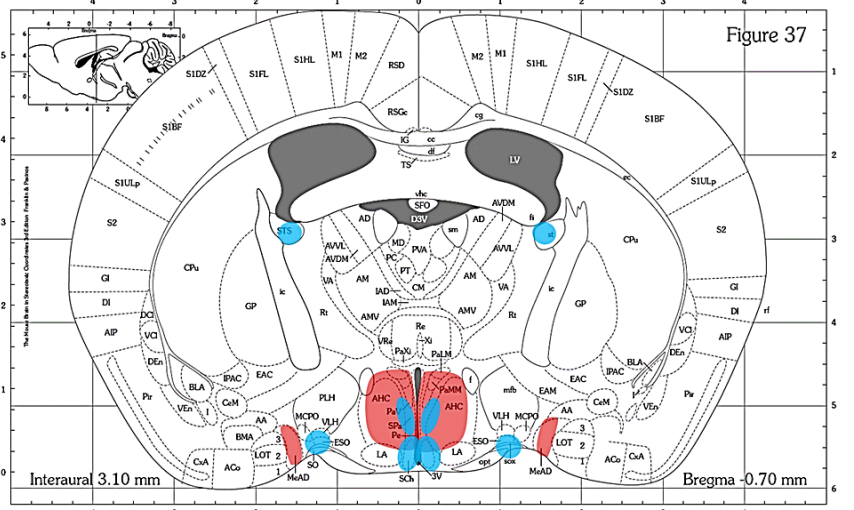
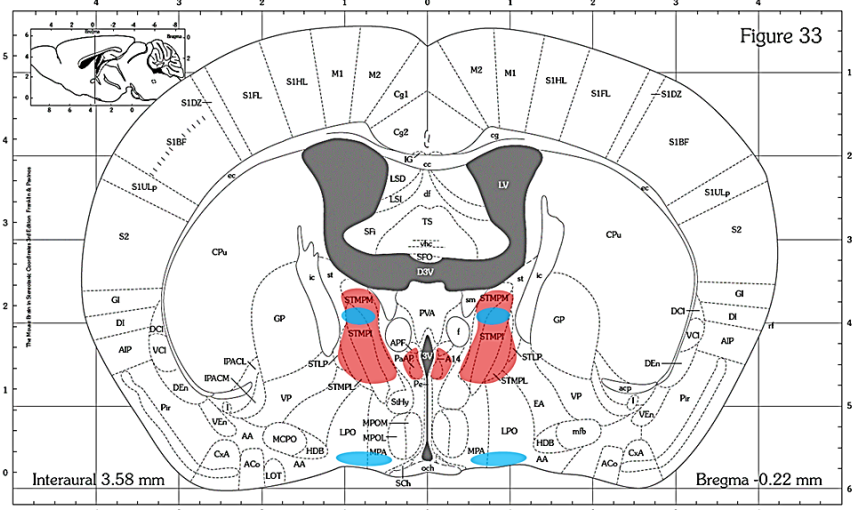
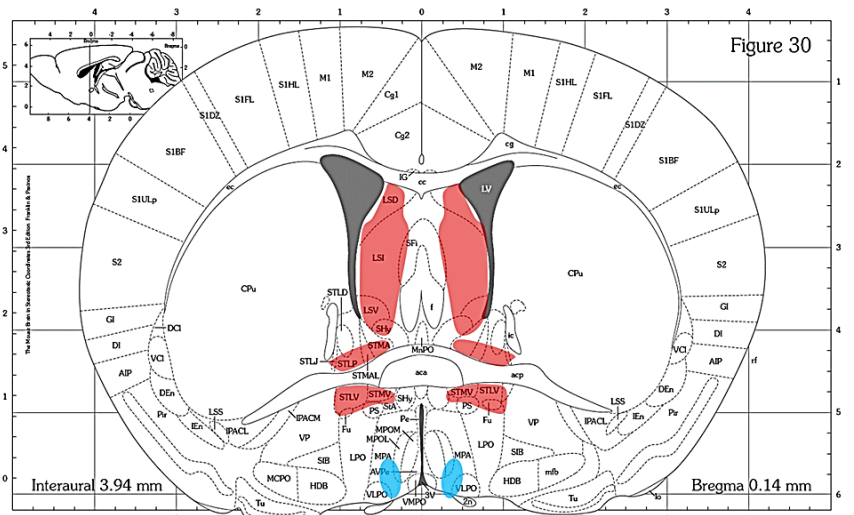
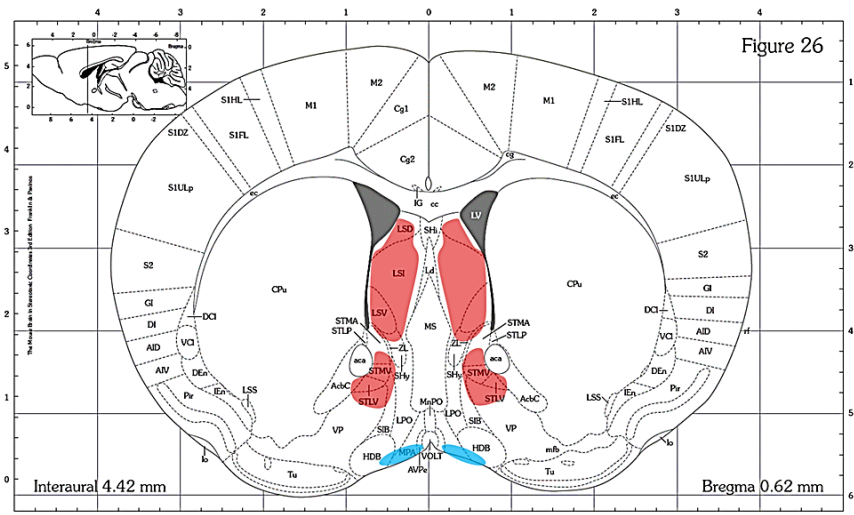


Figure 26 (partie 1)

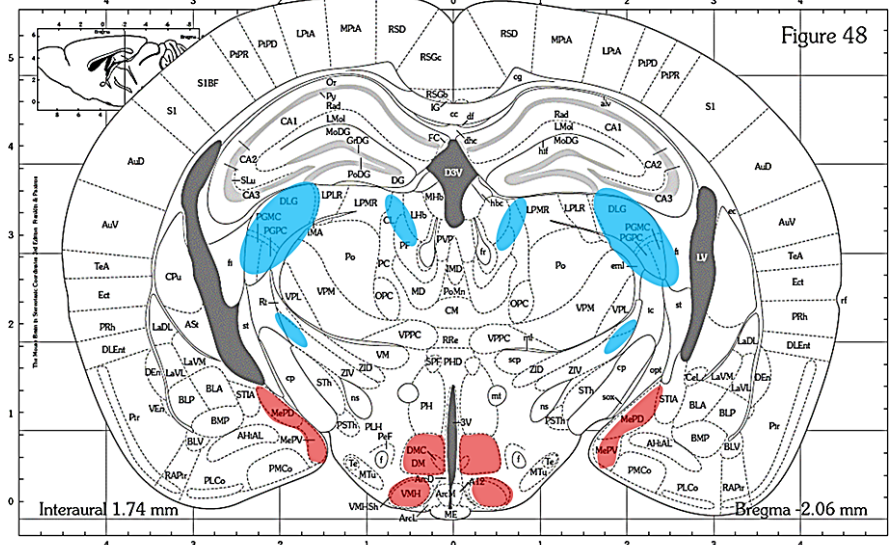
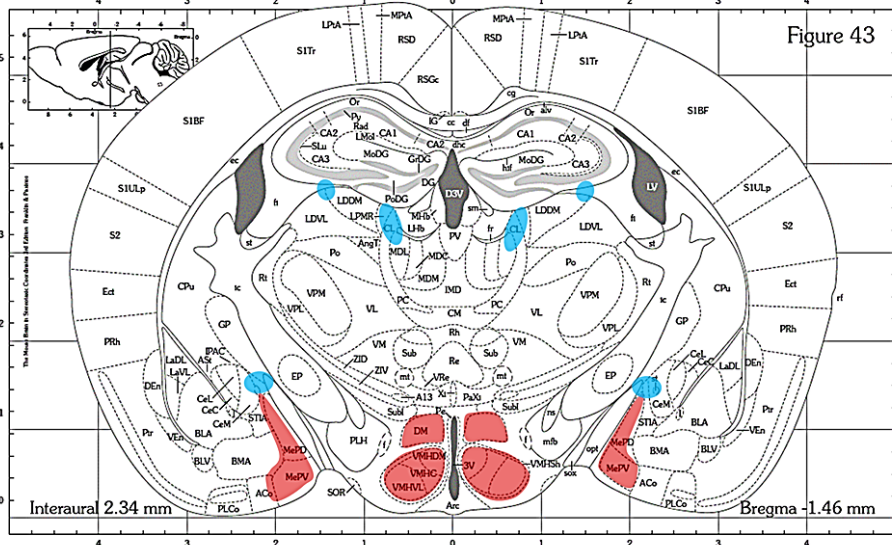
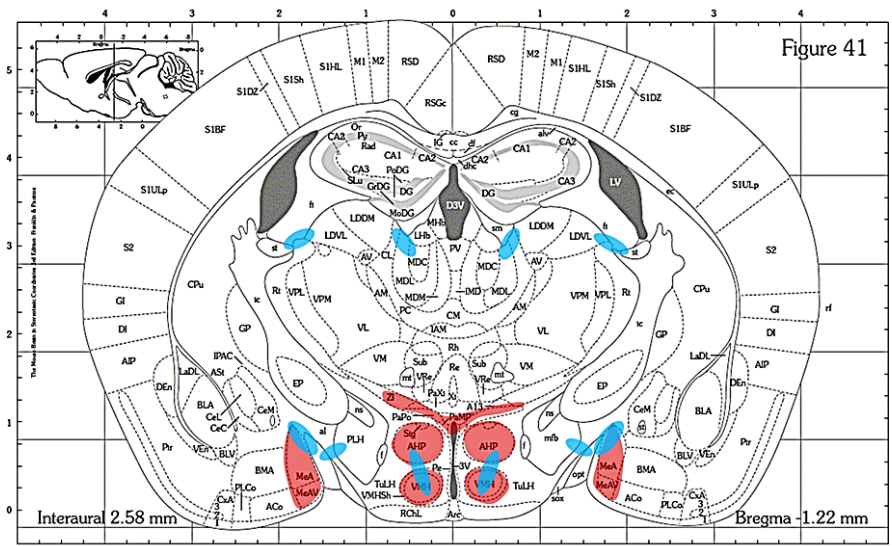
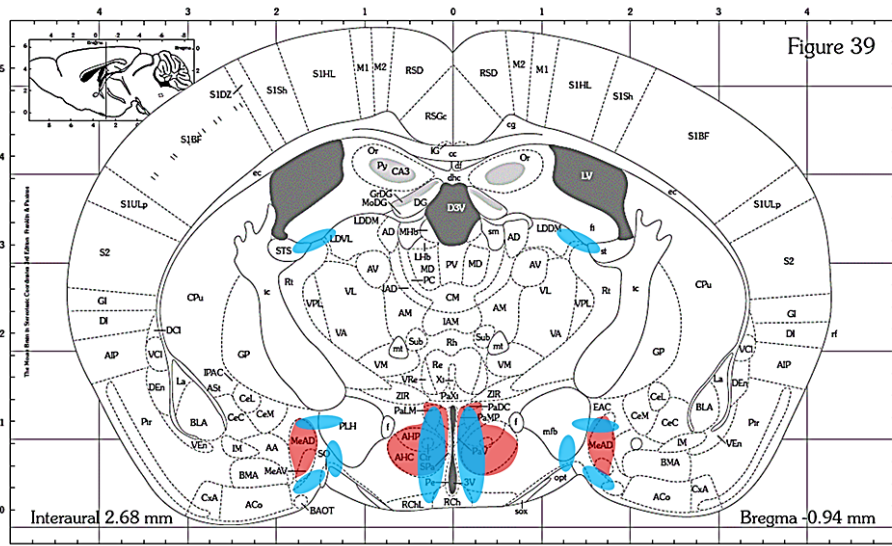
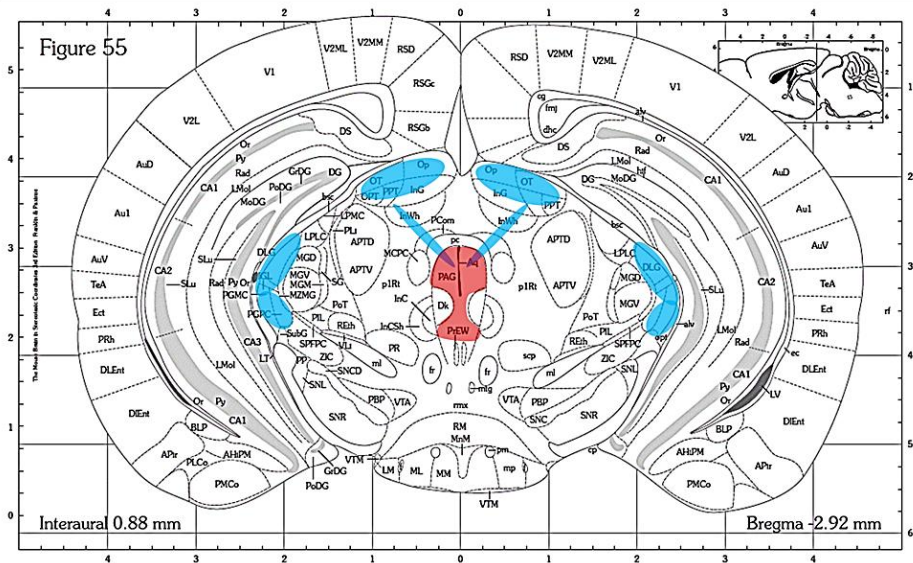
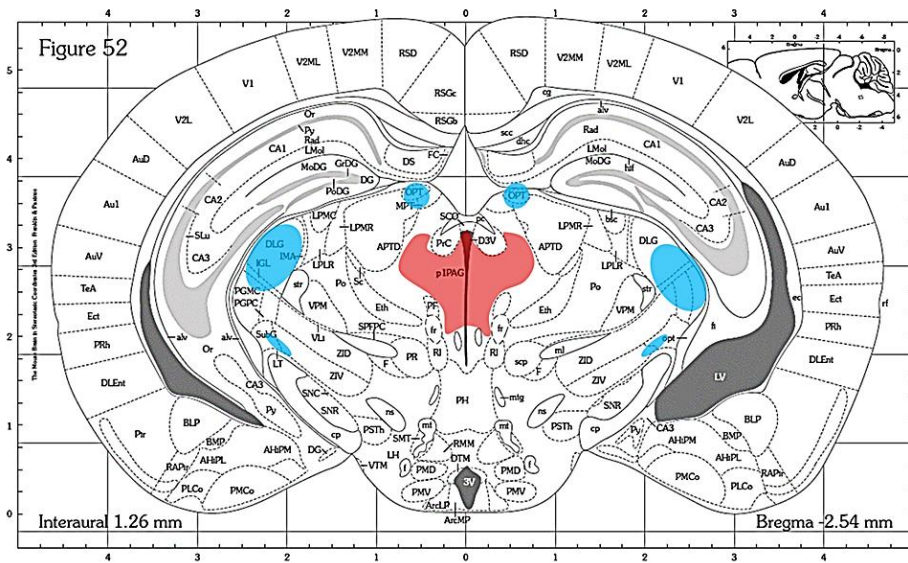


Figure 26 (partie 2)



**Figure 26 (partie 3) : Cartes anatomiques de l’atlas de cerveau de souris complétées avec les zones où se trouvent les fibres des ipRGCs (en bleues) et celles impliquées dans le connectome du comportement de type anxieux/agressif (en rouges).** Atlas illustré depuis les zones les plus antérieures du cerveau (**partie 1**) aux plus postérieures (**partie 3**). Ces cartes ont servi de références dans l’analyse des marquages C-FOS. LS : septum latéral dorsale (LSd), intermédiaire (LSi) et ventral (LSv) ; STL : noyau du lit de la strie terminale ; PaAP : noyau paraventriculaire thalamique ; SO : noyau supraoptique ; AHC/AHP/AHA : hypothalamus antérieur ; Spa/SPZ : zone subparaventriculaire ; PLH/LH : hypothalamus latéral. D’après l’atlas de [Keith B.J. Franklin & George Paxinos, 2007](#). Adapté de [Delwig et Al., 2016](#) ; [Nelson & Trainor 2007](#).

## 7. Génotypage des souris MAOA KO

Le protocole de génotypage a été modifié selon le protocole du Dr. Jean Shih (USC School of Pharmacy, California, United States), qui nous a généreusement envoyé des animaux MAOA KO pour nos protocoles et pour la génération d'une lignée au laboratoire.

Amorce <i>Maoa</i> -F	TTG CTT CAC AGT GGA TTG AT
Amorce <i>Maoa</i> -R	CAC AAA TAC GAG CAA CCT AC

Le gène codant pour la monoamine oxidase A (MAOA) se trouve sur le chromosome X, les mâles sont donc forcément homozygotes. Le génotypage pour la mutation de la MAOA nécessite une étape de digestion enzymatique par Dra I pour différencier les animaux WT des KO. En effet, le site de restriction est muté chez les animaux KO (remplacement d'une Adénine par une Thymine) (Chen et al., 2004).

L'extraction d'ADN génomique pour le génotypage se fait par lyse d'un morceau de queue (<2mm) prélevé peu après la naissance. Les échantillons sont lysés pendant 50 minutes à 95°C dans 100µl de solution A (NaOH 25mM, EDTA 200mM) avant l'ajout de 100µl de solution B (Tris HCl 1M à pH 5). L'ADN génomique est placé à 4°C avant génotypage.

Le mélange de PCR par échantillon se constitue de :

- 2µL de PCR Buffer 10X
- 2µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM)
- 0.5µL de dNTP (10mM)
- 0.1µL de chaque amorce (100mM)
- 0.2µL de Taq polymérase (5U/µl) (Euromedex)
- 2µl d'ADN à génotyper
- 13µL d'H<sub>2</sub>O nucléase-free pour un total de 20µl

Le programme PCR a été réajusté avec un cycle supplémentaire : 4 minutes à 94°C, 36 cycles (30s à 94°C, 30s à 58°C, 30s à 72°C) puis 10 minutes à 72°C. 8µL de produit de PCR sont utilisés pour une migration par électrophorèse sur gel d'agarose (2% dans du TAE1X) afin de vérifier la présence d'une bande à 320pb (identique chez les WT et les KO).

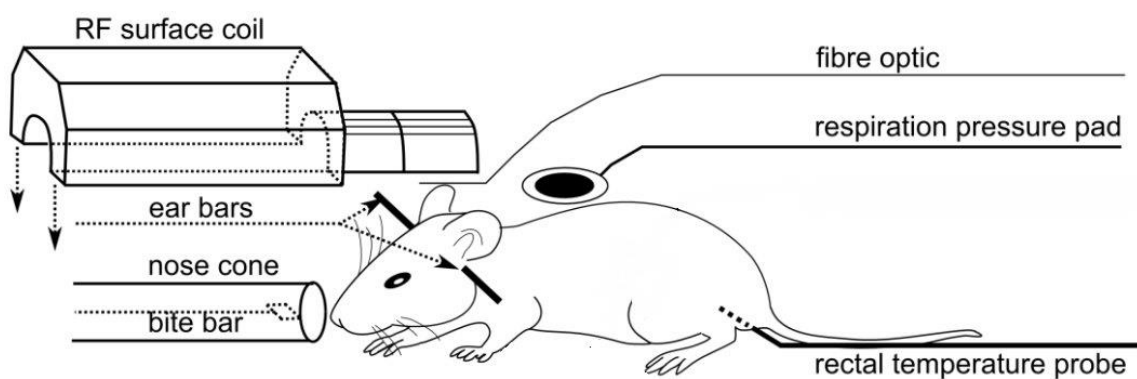
Une étape de digestion enzymatique supplémentaire est nécessaire pour pouvoir différencier les animaux WT et KO. Les MAOA KO présentent une mutation sur le site clivage reconnu par Dra I, ce qui prévient le clivage par l'enzyme. **Ainsi, les animaux WT présentent deux bandes après la digestion (200bp et 120bp) alors que les animaux MAOA KO maintiennent une bande à 320bp).** La digestion enzymatique par Dra I se fait à l'aide d'un kit (ER0221, ThermoFisher Scientific) : 10µl de produit de PCR sont ajoutés à 18µl d'H<sub>2</sub>O nucléase-free, 2µL de Buffer Tango 10X, 1µL de Dra I et le tout est incubé pendant 2 heures à 37°C. Enfin, 30µl du mélange de digestion est utilisé pour une migration par électrophorèse sur gel d'agarose (1.5%) avant lecture du gel.

## 8. IRMf chez le petit animal

Les protocoles d'essai d'IRMf chez le petit animal ont été réalisés à partir de 2019 en collaboration avec le Dr Chrystelle Po, responsable scientifique de la plateforme d'imagerie petit animal du laboratoire ICube (UMR7357, Strasbourg, France). Des travaux au sein de la plateforme d'imagerie ajoutés à la crise sanitaire de l'année 2020 m'ont empêché de me former de manière approfondie sur le fonctionnement du Logiciel de l'IRMf et des pipelines d'analyse. Ma contribution à cette partie du projet s'axe sur la mise en place d'un système d'éclairage par fibre optique pour la stimulation visuelle, l'élaboration du paradigme d'exposition ainsi que sur la mise en place des protocoles pré-IRMf. Les différents paramètres relatifs à l'acquisition et au traitement des données IRMf ont été ajustés et réalisés par le Dr. Chrystelle Po.

### a. Préparation et anesthésie

Les animaux ont été placés dans le noir pendant au moins 12 heures avant les enregistrements et l'ensemble des préparatifs a été réalisé à faible intensité lumineuse (<10 lux), pour permettre une réponse rétinienne maximale. Les souris ont été anesthésiées par isoflurane à 3% puis maintenues à 1,5% pour permettre l'installation dans le berceau (**figure 27**). Les animaux ont alors reçu une injection sous cutanée d'un bolus de médétomidine (0.3 mg/kg, Domitor, Bayer) puis le berceau a été installé dans l'IRM et l'isoflurane a été arrêté progressivement. Juste avant l'acquisition, les animaux ont reçu dans les yeux une goutte d'atropine (pour permettre la mydriase) et de l'Ocrygel (pour éviter le dessèchement oculaire). Durant les essais, les souris ont été monitorées (fréquence respiratoire et température) et maintenues à 37° dans le berceau (système d'air chaud).



**Figure 27 : Schéma d'une souris dans l'IRM.** L'animal est monitoré à l'aide d'un capteur (« respiration pressure pad ») pour vérifier la respiration ainsi qu'une sonde rectale pour la prise de température. Des barres d'oreilles et une barre pour les dents permettent le maintien de la tête de la souris pendant l'acquisition. La fibre optique est placée au-dessus de la tête de l'animal entre les deux yeux.

## **b. Matériel et paramètres d'acquisition**

Les essais IRM sur des souris C57BL/6 ont été effectués sur une IRM 7T Bruker Biospec à l'aide d'une bobine volumique de 86 mm (Bruker) pour l'émission et d'une bobine de surface 2x2 éléments optimisée pour la tête de souris (Bruker) pour la réception du signal radiofréquence (RF). Une source de lumière blanche et une source à 460 nm (lumière bleue) ont été utilisées pour les essais de stimulation optique. La fibre optique a été placée sur la tête de la souris sous la bobine pour éviter une arrivée directe sur la rétine et assurer une certaine homogénéité d'éclairage. Une image anatomique de référence est acquise avant l'IRM fonctionnelle (IRMf) à l'aide d'une séquence RARE avec les paramètres suivants :

- TR/TE : 5000/24 ms
- RARE factor : 11
- 2 moyennages
- Temps d'acquisition : 1 minute 20 secondes

Une séquence EPI one-shot a été optimisée pour l'IRMf en faisant varier les paramètres suivants avec un TE minimum selon la thèse de Laetitia Degiorgis (2019) et l'article de Niranjan et collaborateurs ([Niranjan et al., 2016](#)) :

- TR : 2000 ou 2500ms /19 ms
- Spectral width : 178.6 kHz, 300 kHz ou 400 kHz ; 336 répétitions.
- FOV : 35 x 35 ou 20 x 20 mm
- Matrice : 96 x 96 ou 100 x 100

## **c. Paradigmes**

Les acquisitions IRM ont été effectuées pendant des phases de 2 minutes de stimulation précédées et suivies par des phases de repos de 3 minutes minimum. Une source de lumière blanche (>100 lux) en continue (commande manuelle) et une source à 460 nm (>50 lux) (lumière bleue synchronisée avec l'acquisition IRM, stimulation avec une fréquence de 10 Hz) (Doric system, Quebec, Quebec,) ont été utilisées pour les essais de stimulation optique. La fibre optique a été placée sur la tête de la souris sous la bobine (**figure 27**).

## **d. Traitements des images**

Les étapes de préparation des images IRMf ont été effectuées sous FSL (FMRIB, Oxford, R-U) :

1. Correction de mouvement inter-volume
2. Correction « slice timer »
3. Filtrage basse fréquence (>0.125Hz)
4. Filtre gaussien

Les zones de stimulations sont ensuite extraites par le modèle général linéaire (GLM) avec FSL (FMRIB, Oxford, R-U) superposées sur l'image anatomique.





# RÉSULTATS

---

## I. Axe 1 : Rétine & photopériode

### 1. Article 1 : Étude de l'intégration de la photopériode chez les souris C3H *rd1*

Dans cette étude, nous avons utilisé des souris C3H/HeNcrl homozygotes pour la mutation *retinal degeneration 1 (rd1)*, qui entraîne la dégénérescence totale des bâtonnets et des cônes, ne laissant plus que les ipRGCs comme cellules photosensibles. Les animaux ont été séparés en deux groupes égaux pour être exposés à 8 semaines de photopériode longue (LP) ou courte (SP) et leur activité locomotrice a été enregistrée. Enfin, les animaux ont été mis à mort à 3 points horaires différents et les tissus ont été prélevés.

Nos résultats montrent que les animaux C3H sont capables de détecter et d'intégrer la photopériode au niveau central. En effet, le dosage de la mélatonine dans les glandes pinéales montre que le pic de sécrétion est plus long dans le groupe SP que dans le groupe LP. Cette observation est cohérente avec les résultats de l'étude de l'expression de la sous-unité  $\beta$  de la Thyroestimuline (TSH $\beta$ ) dans la *pars tuberalis*, qui est impliquée dans le contrôle saisonnier de la reproduction. En effet, en photopériode courte, la sécrétion abondante de mélatonine inhibe l'expression de la TSH. En photopériode longue, le raccourcissement du pic de sécrétion de la mélatonine provoque une levée d'inhibition et donc l'expression de la TSH. Nos résultats montrent que l'ARNm codant pour la TSH $\beta$  est significativement plus exprimé dans la *pars tuberalis* des animaux du groupe LP que ceux du groupe SP.

En plus de l'étude de l'intégration de la photopériode *via* l'analyse de la sécrétion de mélatonine et l'expression de la TSH, nous avons enregistré l'activité locomotrice des animaux pendant les semaines d'exposition afin d'analyser des modifications comportementales en fonction de la photopériode. Nos données d'activité locomotrice ont révélé qu'il n'y pas de différence significative dans la quantité d'activité entre les deux groupes d'exposition, mais que la répartition de cette activité était modifiée selon la photopériode. En effet, les animaux du groupe SP présentent une modification progressive de leur profil locomoteur, avec une tendance à devenir biphasique : on retrouve un pic d'activité en début de nuit et un second pic d'activité en milieu de nuit. A l'inverse, les animaux du groupe LP ne présentent qu'un seul pic d'activité concentré au début de la nuit, et ce profil d'activité demeure stable sur l'ensemble des semaines d'exposition.

Enfin, les rétines des animaux ont été analysées afin de confirmer que l'ensemble de ces modifications physiologiques et comportementales en réponse aux variations de la photopériode sont possibles grâce à la seule présence des ipRGCs. Alors que ces cellules demeurent effectivement les seules cellules photoréceptrices dans les rétines *rd1*, nos résultats démontrent que les ipRGCs semblent être sensibles aux variations de la

photopériode : on dénombre moins de cellules immunoréactives pour la mélanopsine (tendance) chez le groupe LP comparé au groupe SP, avec une diminution significative de l'intensité du marquage au niveau des dendrites chez le groupe LP. Néanmoins, les études d'expression de la mélanopsine par qPCR ne montrent aucune différence entre les deux groupes, suggérant que la régulation s'opère au niveau de la protéine elle-même.

---

## Photoperiod integration in C3H *rd1* mice

Bastien LECLERCQ<sup>1</sup>, David HICKS<sup>1</sup>, Virginie LAURENT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives CNRS UPR3212, Université de Strasbourg, France

### Abstract

In mammals, the suprachiasmatic nuclei (SCN) constitute the main circadian clock, receiving input from the retina which allows synchronization of endogenous biological rhythms with the daily light/dark cycle. Over the year, the SCN encodes photoperiodic variations through duration of melatonin secretion, with abundant nocturnal levels in winter and lower levels in summer. Thus, light information is critical to regulate seasonal reproduction in many species and is part of the central photoperiodic integration. Since intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) are vital for circadian photoentrainment and other non-visual functions, we studied the contribution of ipRGCs in photoperiod integration in C3H *retinal degeneration 1 (rd1)* mice. We assessed locomotor activity and melatonin secretion in mice exposed to short or long photoperiods. Our results showed that *rd1* mice are still responsive to photoperiod variations in term of locomotor activity, melatonin secretion and regulation of the reproductive axis. In addition, retinas of animals exposed to short photoperiod exhibit higher melanopsin labelling intensity compared to the long photoperiod condition, suggesting seasonal-dependent changes within this photoreceptive system. These results show that ipRGCs in *rd1* mice can still measure photoperiod and suggest a key role of melanopsin cells in photoperiod integration and the regulation of seasonal physiology.

**Keywords:** Melanopsin, ipRGCs, Retina, Photoperiod, Rodents, Melatonin, Photoreception

## Introduction

Earth rotates daily on its tilted axis and revolves around the sun once a year. Thus, in high latitude zones, photoperiodic variation is related directly to seasonal changes and constitutes a crucial environmental cue for many species. Consequently, the capacity to detect and integrate variations in photoperiod is an essential mechanism that allows animals to anticipate and adapt, by regulating a wide range of physiological functions such as reproduction, metabolism and behaviour. In mammals, photoperiodic integration occurs through a complex network within the hypothalamus, through respectively the suprachiasmatic nuclei (SCN) containing the main circadian clock, the *pars tuberalis* and the mediobasal hypothalamus (Dardente et al., 2019). The SCN receive strong inputs from the retina, and in response control secretion of the neurohormone melatonin through a sympathetic pathway, inhibiting its secretion during the day. During the course of the year, variation of day length information is transmitted to the SCN by the retina. Consequently, the nocturnal melatonin secretion profile encodes photoperiod variation, with abundant secretion in long winter nights and reduced amounts in summer (Simonneaux and Ribelayga, 2003). The photoperiod encoded by melatonin secretion is a crucial process to regulate seasonal reproduction in many groups of mammals (Arendt, 1998; Duncan et al., 1990). This melatonin signal is decoded by thyroid-stimulating hormone (TSH) producing cells in the *pars tuberalis* (PT), which express melatonin receptors (Dubocovich and Markowska, 2005). In turn, the TSH acts on the tanycytes in the hypothalamus to regulate the production of triiodothyronine (T3) depending on melatonin secretion (Goto and Ebihara, 1990; Unfried et al., 2009). Finally, the T3 indirectly acts on the activity of the Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) expressing neurons, which regulate reproductive physiology, via Kisspeptin and RFRP expressing neurons (Klosen et al., 2013). Thereby in winter, the high melatonin levels inhibit TSH expression in the PT, leading to a decrease in the production of T3 while in summer, lower melatonin secretion allows TSH expression and T3 production.

Although the photoperiod integration network within the hypothalamus has been thoroughly studied, the role of the retina as an active player in photoperiodic integration has been much less investigated. Since the discovery of the melanopsin-expressing intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) (Provencio et al., 1998), many studies have been conducted to understand how these cells, together with cones and rods, interact to regulate photoentrainment of the clock. While ipRGCs are essential to ensure the transmission of photic information to the clock (Göz et al., 2008), studies on melanopsin (OPN4) knock-out mice have demonstrated that cones and rods contribute significantly to the response of the central clock to different wavelengths and light intensities (van Diepen et al., 2015). Thus, it is now well accepted that these 3 different photoreceptor types work together in the light regulation of circadian rhythms (Lucas et al., 2012). Here, we raise the question as to whether the retina, especially ipRGCs, contribute to photoperiodic integration in relation with the SCN and other seasonal-responsive structures. Various studies have shown that retinal physiology could be affected by photoperiod changes in rodents and human (Rohleder et al., 2006). The

melanopsin system is notably clock ([Hannibal et al., 2013](#)) and light regulated, thus responsive to local melatonin and dopamine secretion in the retina ([Pack et al., 2015](#); [Van Hook et al., 2012](#)). In addition, recent data suggest that photoperiodic changes are responsible for neuroplasticity within the circadian network such as changes in neurotransmission and neuronal networks, for instance in the SCN GABAergic system ([Porcu et al., 2018](#)). This neuroplasticity seems to occur most likely through clock-dependent and direct light-regulated pathways.

Taken together, these data support the hypothesis that retinal physiology is particularly responsive to photoperiod changes and could potentially already generate some degree of integration upstream of the central network, for instance by modulating the transmission of photic information toward the SCN and other brain structures. The aim of this study was to determine whether ipRGCs contribute to photoperiod integration and thereby if the melanopsin network plasticity is involved. To that aim, we undertook behavioural (locomotor activity recordings), physiological (detection of melatonin secretion) and molecular (qPCR, *in situ* hybridization) approaches under different photoperiodic conditions in C3H *rd1* mice.

## Materials and methods

All the protocols and experiments were validated by the “Structure du Bien Être Animal” (SBEA), “Comité National de Réflexion Ethique sur l’Expérimentation Animale” (CREMEAS) and French Ministry for Research as part of French and European legal guidelines in animal experimentation. APAFIS N° 7461-2016110415449535.

### Animals

Six-week-old C3H/HeNcrI male mice (Charles River, Italy) were individually housed in a 12:12 light/dark cycle at 22°C (40% humidity) with food and drink ad libitum for 6 weeks before the beginning of the different photoperiod exposures. The C3H/HeNcrI strain bears the retinal degeneration 1 (*rd1*) mutation. This mutation induces a deficiency in rod cGMP-phosphodiesterase, leading to cGMP accumulation and photoreceptor death ([Han et al., 2013](#)). Complete rod death occurs in an early massive wave, while cone death occurs as a second slower wave, but by 12 weeks of age >98% of cones are also dead ([Carter-Dawson et al., 1978](#)). Then, animals were randomly separated in two groups and either exposed to 8 weeks of short photoperiod (SP 8:16) or 8 weeks of long photoperiod (LP 17:7) under simulated daylight neon lighting (with peaks at 440nm, 480nm, 545nm, 580nm and 615nm), 150 lux at the level of the cage floor. We recorded electroretinograms (ERGs) of 12-week-old mice retinas in order to assess the developing blindness of these animals due the *rd1* mutation.

### Locomotor activity measurements and analysis

Individual locomotor activities were measured from the second week until the end of the different photoperiod exposures using infrared motion captors placed over the cages, connected to a Circadian Activity Monitoring System (CAMS, INSERM, France). Raw data were

then analysed using ClockLab (Actimetrics product, Wilmette, United States). Total locomotor activity, diurnal and nocturnal locomotor activity were analysed hour by hour and from week to week within the same group and between the two photoperiods. For each animal and for each week of exposure, a locomotor activity profile (hour per hour) was measured, and the relative activity (percentage of the total activity per ZT) was individually calculated. These data allowed generating averaged SP and LP profiles after 3 and 8 weeks of short/long photoperiod exposure in both groups (**Figure 2C-D**). The relative early night activities (percentage of the total locomotor activity performed during the first 3 hours of dark) were compared within the week of photoperiod exposure for both photoperiod group (**Figure 2B-C-D**) (two-way RM ANOVA with Tukey post-hoc analysis). To better visualize the changes in the distribution of the relative locomotor activity in the SP group, the relative locomotor activity values were compared from ZT17 to ZT19 (early night) and from ZT14 to ZT17 (middle night) between the 3rd and the 8th weeks of exposure (**Figure 2C**). Statistical analysis and graphics were performed using SigmaPlot (Systat Software Inc.) and Prism (GraphPad Software Inc.).

### **Electroretinograms**

The visual function of the C3H *rd1* mice (n=5) was tested by ERGs using a RETI-port gamma device from Roland Consult (Brandebourg, Germany) which was adapted for small rodents. First, animals were dark-adapted during 24 hours before being anesthetized using a mixture of Xylazine (10mg/Kg) and Ketamine (100mg/Kg) injected subcutaneously above the neck. One drop of atropine and Ocrygel was added to each eye, ensuring pupil dilation and hydration, respectively. ERGs were assessed following a scotopic single flash protocol on the corresponding software, consisting of repeated 5ms white light flashes with increasing intensity from 0.001 to 3 candelas/m<sup>2</sup>. At the end of the ERGs, mice received an additional Ocrygel drop in each eye to ensure hydration. Then, they were monitored daily for one week to preclude any eye damage. C57BL/6 mice (n=3) wildtype for the *rd1* mutation were used as sighted controls.

### **Tissue sampling**

Animals of SP and LP groups were euthanized at ZT3 (n=3), ZT16 (n=3) and ZT20 (n=4) by receiving i.p injection of EUTHASOL VET (182mg/Kg). After decapitation, blood was rapidly collected within tubes containing 5% heparin, immediately centrifuged during 15 min at 1000 G (kept at 4°C). Then plasma aliquots were frozen at -80°C. Meanwhile, mouse heads were dissected, and pineal glands were quickly frozen using liquid nitrogen before being stocked at -80°C. Brains were fixed for 12 hours in paraformaldehyde 4% (PFA 4%), then dehydrated and stored in n-butanol (see Non-radioactive *in situ* hybridization). For each animal, one eye was fixed in PFA 4% for 3 hours and kept in 4°C PBS-Azide (0,02%) while the retina of the other eye was rapidly extracted, collected in 1.5ml Eppendorf© (Eppendorf, Montesson, France) tubes and frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C.

## **Immunohistochemistry**

Whole retinas were obtained by dissection of fixed eyes and were put for 1h30 in a pre-incubation solution [phosphate-buffered saline (PBS) 0.1M, 10% Normal goat serum (NGS), 1% Bovine serum albumin (BSA), 0.5% triton X100]] at room temperature under gentle agitation. Then, retinas were incubated with the rabbit polyclonal anti-melanopsin primary antibody 1/4000 (AB38, Advanced Targeting Systems, Carlsbad, United States) in a buffer solution (PB 0.1M, 3% Normal donkey serum (NDS) 1% BSA, 0.5% triton X100, 0.05% NaN<sub>3</sub>) during 3 days at 4°C under gentle agitation. After 6X 30min consecutive washings with 0.1M PBS, retinas were incubated for 2h30 at room T° with the secondary goat anti-rabbit antibody, Alexa 488 conjugated diluted at 1/1000. After 4X30min successive washings, retinas were flat mounted, outer nuclear layer against the slide, in a Polyvinyl alcohol mounting medium (Mowiol® 4-88) with n-propyl gallate. Slides were finally scanned using a digital slide scanner NanoZoomer S60 (Hamamatsu, Solothurn, Switzerland).

## **Melanopsin-positive cells (ipRGCs) acquisition, counting and intensity analysis**

Flat-mounted retinas were scanned using a NanoZoomer S60 (Hamamatsu, Solothurn, Switzerland) and the provided software NDP-Scan. For each retina, the counting and grey scale quantification were analysed each time from the same image generated from the same NDP files. LP/SP samples were scrambled and sample names were encoded to ensure blind analysis. Quantification of grey scale levels was achieved following the same method to provide unbiased results. Focus was done on the retinal ganglion cell (RGC) layer in bright field and the FITC filter was set on 80ms of exposure duration. Entire retinas were scanned by 40X lens both on X/Y axis and Z-axis on 13 layers of 4µm of thickness from focus point towards the INL. Resulting NDP files were set on a constant gamma ratio (3.0) and contrast (120%). Then, melanopsin-positive cells were manually counted using the software NDP.View2 on 4 different fields per retina (magnificent X100) between the peripheral and central retina. For intensity analysis, 4 other fields (one per branch) (magnification X250) were selected at the level of the outer plexiform layer in order to measure the average intensity of dendritic trees. The corresponding background staining of each field was subtracted using ImageJ software, and an intensity threshold was set to extract the signal of the dendrites. Finally, average intensities of each field were measured (greyscale) and a total average of 4 values were calculated to obtain a global labelling intensity value per retina. Average ipRGCs number per field between SP and LP were compared using an unpaired t-test analysis (*p value* = 0,1175) and the average grey level between SP and LP retinas were compared via a Mann-Whitney analysis (*p value* = 0,0056).

## **qPCR analysis of OPN4 mRNA expression in retina**

One retina of each animal was quickly frozen using liquid nitrogen before being stored at -80°C during the tissue sampling. Extraction of mRNA was performed using a RNeasy Micro Kits (QUIAGEN, France) and RNA integrity numbers (RIN) for each sample were measured using a 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, United States) in order to select the best quality

samples and normalize the mRNA concentration for RT-PCR. Then, cDNAs were diluted at working concentration for the qPCR of both housekeeping genes (GAPDH, ARPB, PSMB2) and total OPN4 and isoforms (OPN4T, OPN4S, OPN4L). Primers were generated according to the articles of Hughes et al. (Hughes et al., 2012). Total OPN4, OPN4S and OPN4L mRNA relative expressions were calculated using the housekeeping genes values and compared by two-ways ANOVA analysis (photoperiod exposures / ZT of the sampling).

### **Non-radioactive *in situ* hybridization**

Fixed brains were dehydrated with successive incubations in ethanol 70% (2h), ethanol 95% (2h), ethoxyethanol (2h), n-butanol overnight. Then, tissues were embedded using Polyethylene glycol (PEG) and the resulting blocks cut to obtain 12µm coronal brain sections at the level of the median eminence. Then, sections were mounted on RNase-free slides. *In situ* hybridization was performed with sense or antisense riboprobes selective for mouse TSHβ (NM\_009432.2) labelled with digoxigenin (DIG RNA labelling kit, Boehringer) following the protocol of P. Klosen et al., The FASEB Journal, 2013. Slides were covered with Crystal Mount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma) and coverslips sealed with Eukitt (Chem-Lab, Zedelgem, Belgique). To compare SP and LP groups, pictures of 3 different rostro-caudal zones of the pars tuberalis were taken for each animal and analysed using ImageJ software. For each zone, the background staining was subtracted and a negative of the labelling was obtained. Then, the labelling intensity (greyscale) was measured along the *pars tuberalis* and an averaged intensity was obtained by combining the values of the three different zones for each animal (n=18). Average grey levels were finally compared between SP and LP using Student T-test analysis (*p* value = 0,0006).

### **Radioimmunoassay for melatonin detection**

First, 500µL of tricine buffer solution were added to each pineal gland, which were sonicated during 3X15 seconds until total solubilization. Then, lysates were centrifuged during 5min and 2X100µl (duplicates) of supernatant were collected for the assay. 100µL of rabbit primary antibody anti-melatonin 1/40000 (AC19540, INRA, Nouzilly, France) (Ribelayga et al., 1999) were added to each duplicate as well as 300µl of tracer (labeled [125I]-2-iodomelatonin at 10000 counts/min/100µL). The mix was incubated at 4°C overnight. Linked melatonin was precipitated on ice for 1 hour using 800 µl of sheep anti-rabbit γ-globulin. Supernatant was obtained by 30 min centrifugation at 4°C. Finally, radioactive signals were measured using a γ-ray counter and melatonin concentrations were determined via standard curves.

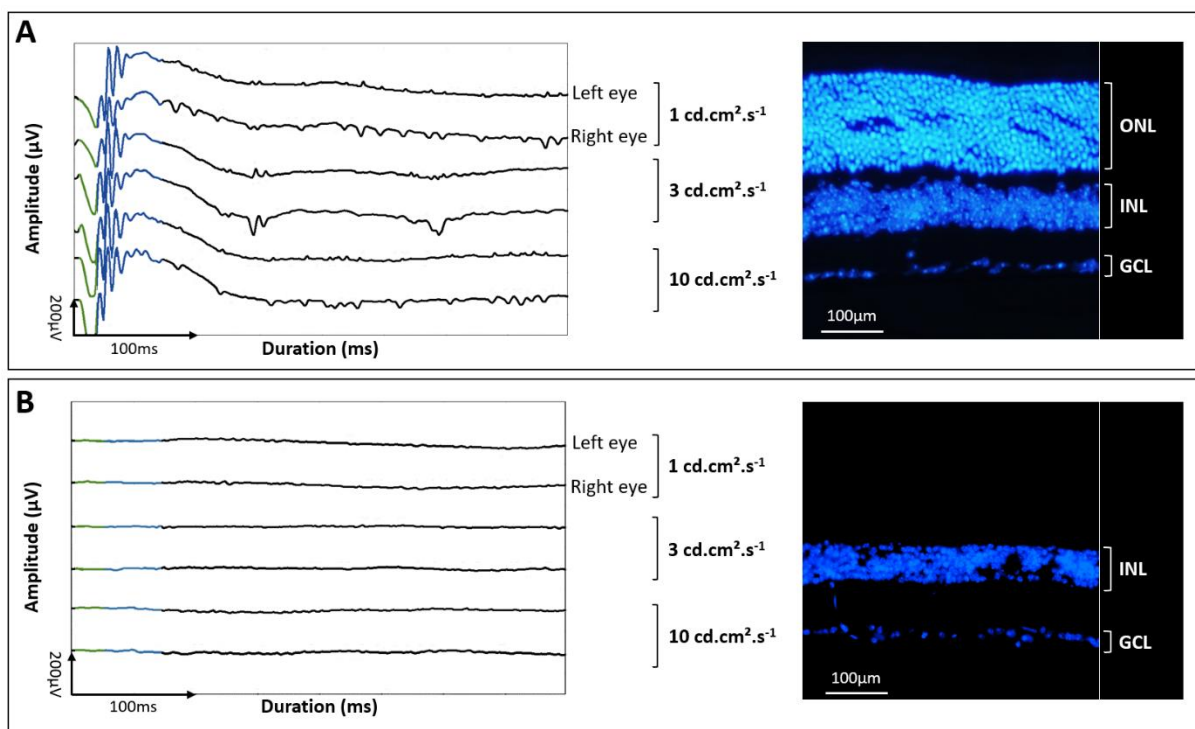


## Results

### C3H mice display no functional rods and cones

To assess the retina visual function of our model mouse, we measured the electrophysiological response of its retina before SP and LP photoperiod exposures. ERGs were performed following a scotopic protocol. This protocol is particularly adapted to assess visual function in the mouse rod-enriched retina, by increasing light pulses stimulation from very low to moderate intensities. This procedure evaluates more specifically the progressive response of rods, even if cone contribution is present at higher intensities. The ERG traces can be divided into two main components: 1) The a wave, a rapid hyperpolarization corresponding to pure photoreceptor responses. 2) The b wave, a large depolarization mostly due to the activation of ON bipolar cells (Green and Kapousta-Bruneau, 1999) by rod and cone inputs to the inner nuclear layer. The end of the trace is characterized by a progressive repolarization. In control sighted C57BL/6 mice, these two components (respectively in green and blue) are clearly present and attest the normal retinal function (Figure 1A).

In C3H/HeNcrI mice, a flat ERG missing both a and b waves traces was observed, indicating that massive loss of photoreceptors occurred within the first 12 postnatal weeks. This observation is consistent with histological analyses of C3H/HeNcrI mouse retina. DAPI labelling of transversal retina slices shows a total loss of the outer nuclear layer compared to the sighted mouse (Figure 1B).

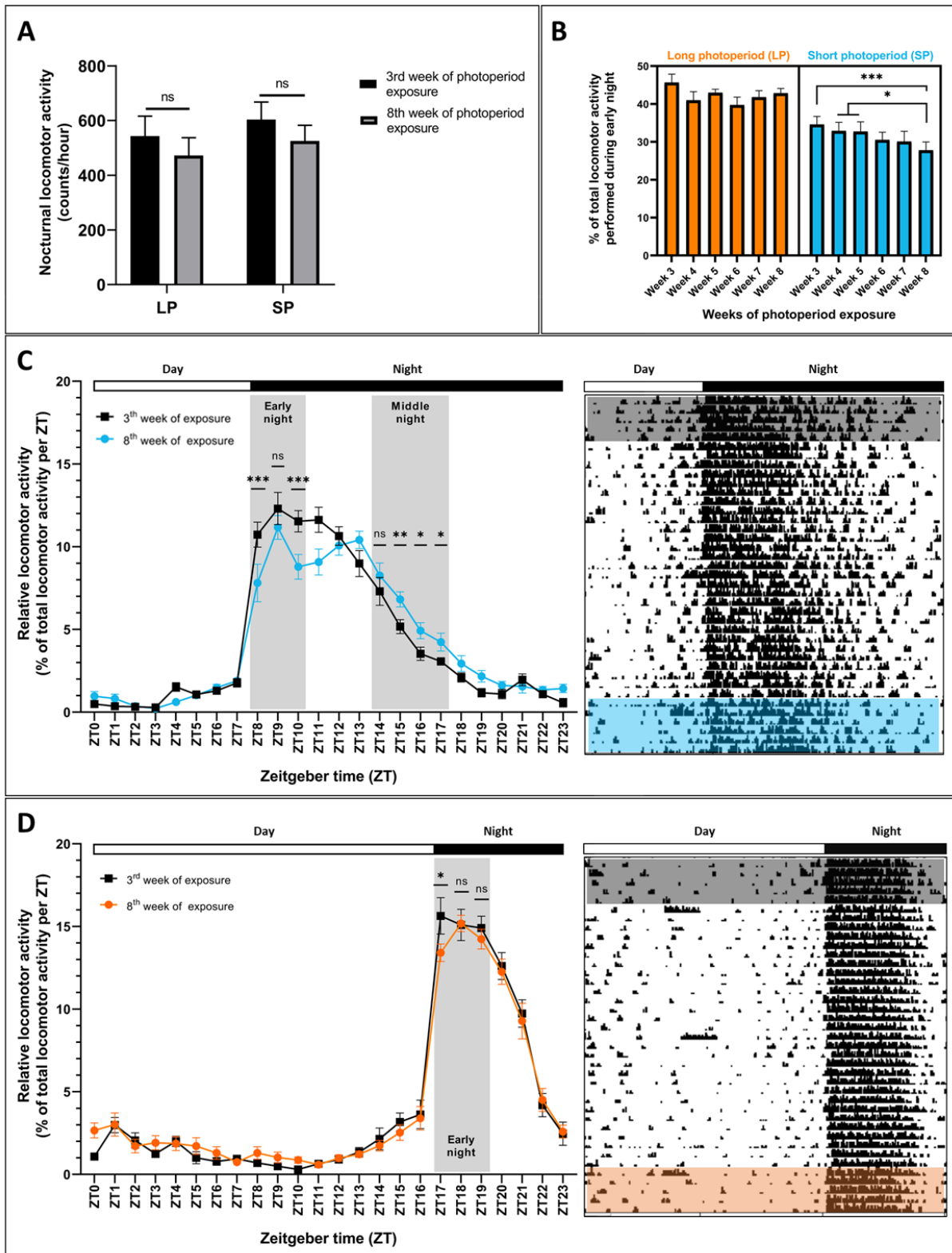


**Figure 1: Electrophoretograms and nuclear densities in sighted C57BL/6 and blind C3H mice.** The panel (A) represents the ERG responses in sighted C57BL/6 mouse for the highest light stimulations (1, 3 and 10 cd.cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). On the right, DAPI labelling of cell nuclei reveals the different nuclear layers across the

retinal transversal slice. The C57BL/6 mouse retina displays normal ERG responses with an a wave (in green) generated by cone and rod activation in the ONL followed by the b wave (in blue) generated by the ON bipolar cells in the INL. The panel **(B)** represents the ERG responses in C3H *rd1* mouse. The C3H mouse retina displays a flat ERG, demonstrating the lack of response coming from cones and rods. This result is confirmed by the total degeneration of the ONL observed in DAPI staining.

### **Locomotor activity changes according photoperiod variation**

Locomotor activities were recorded from the second week until the end of SP/LP photoperiod exposure (6 weeks) to characterize potential photoperiod-dependent changes between SP and LP groups. Parameters such as relative locomotor activity, nocturnal and diurnal activity as well as the early subjective night activity were extracted and compared throughout photoperiod exposures. In accordance with the literature, C3H/HeNCRl *rd1* mice are still entrained by the light/dark cycle because of maintained ipRGC-SCN connections. The comparison between SP and LP groups showed no difference in total amount of nocturnal activity, whether at the beginning or the end of the photoperiod exposures (**Figure 2A**). However, distribution of relative nocturnal activity was clearly different depending on the photoperiod. When measuring locomotor activities during the first 3 hours after light offset, the SP group showed significantly lower relative activity (12-19% less) compared to the LP group at the beginning and at the end of the photoperiod exposure (**Figure 2B**). This difference was already noticeable in the first week of analysis. Whereas the total amount of nocturnal activity did not change significantly between the two groups, the shape of the nocturnal locomotor profile in the SP group changed progressively during photoperiod exposure, leading to two distinct locomotor activity patterns between SP and LP groups after 8 weeks of exposure (**Figure 2C -2D**). The SP group displayed 34% then 27% of total nocturnal locomotor activity during the early night at the 3rd week and 8th week of photoperiod exposure respectively (**Figure 2C**) (statistically significant). Meanwhile the LP group displayed 45% then 42% (not statistically significant) of its total activity respectively (**Figure 2D**). Overall, the SP group displayed progressive reshaping of locomotor activity (**Figure 2C**), significantly decreasing the relative amount of activity during the early night (ZT8-ZT9) and increasing significantly in middle night (ZT15-ZT7). Conversely the LP group tended to show a stable locomotor activity profile, with almost half the total locomotor activity during the first 3 hours of the subjective night over the course of photoperiod exposure (**Figure 2D**). Interestingly, we also observed that the SP group locomotor activity peak tends to become bimodal at the end of photoperiod exposure, with a first peak at ZT9 then another increase at ZT13, whereas the LP group profile remains unimodal with a maximum activity at ZT19 (**Figure 2C**).

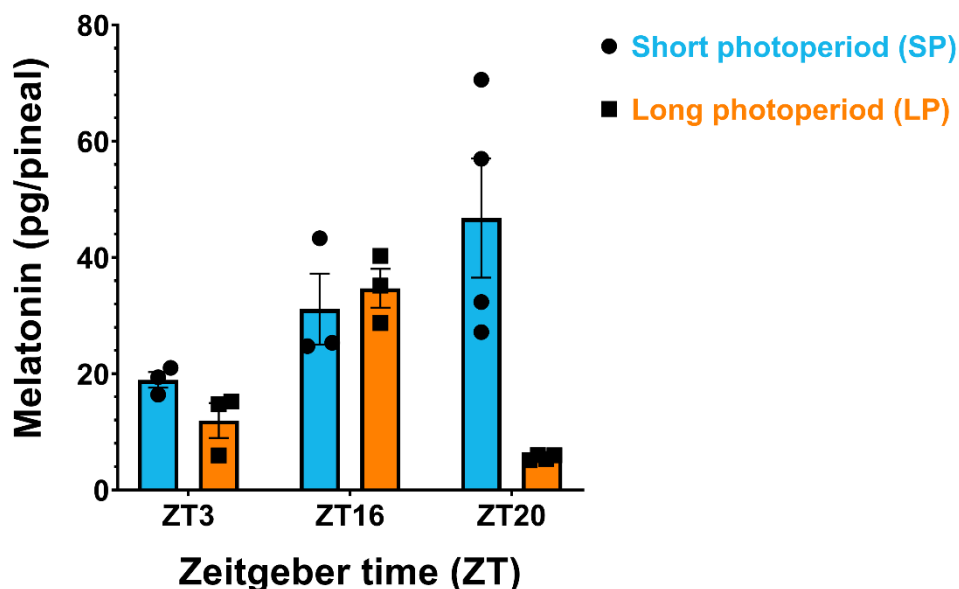


**Figure 2: Locomotor analysis of C3H *rd1* mice during exposure to short and long photoperiod. (A)** Comparison of the nocturnal locomotor activity after 3 and 8 weeks of short or long photoperiod exposure. The total nocturnal locomotor activity remains similar for both SP (n=10) and LP (n=10) groups after 3 and 8 weeks of exposure. **(B)** Relative locomotor activity during early night (first 3 hours of the night) for LP and SP groups along weeks of exposure. While LP group (n=10) displays no significant changes, SP group (n=10) exhibits a progressive decrease of the relative locomotor activity

during early night, suggesting changes in the distribution of the nocturnal locomotor activity. **(C)** Relative locomotor activity profile of SP group (n=10) after 3 (black traced) or 8 weeks (blue traced) of photoperiod exposure. The white and black bars above represent the daytime and the night-time. Raw actogram of a representative SP mouse is shown on the right panel. **(D)** Same parameters as those of SP group are presented for the LP group (n=10). While SP group displays significant changes in the distribution of the relative locomotor activity between 3 and 8 weeks of photoperiod exposure (lower in early night and higher in the middle night), the LP group displays no significant change.

### Pineal melatonin secretion is photoperiod-dependent

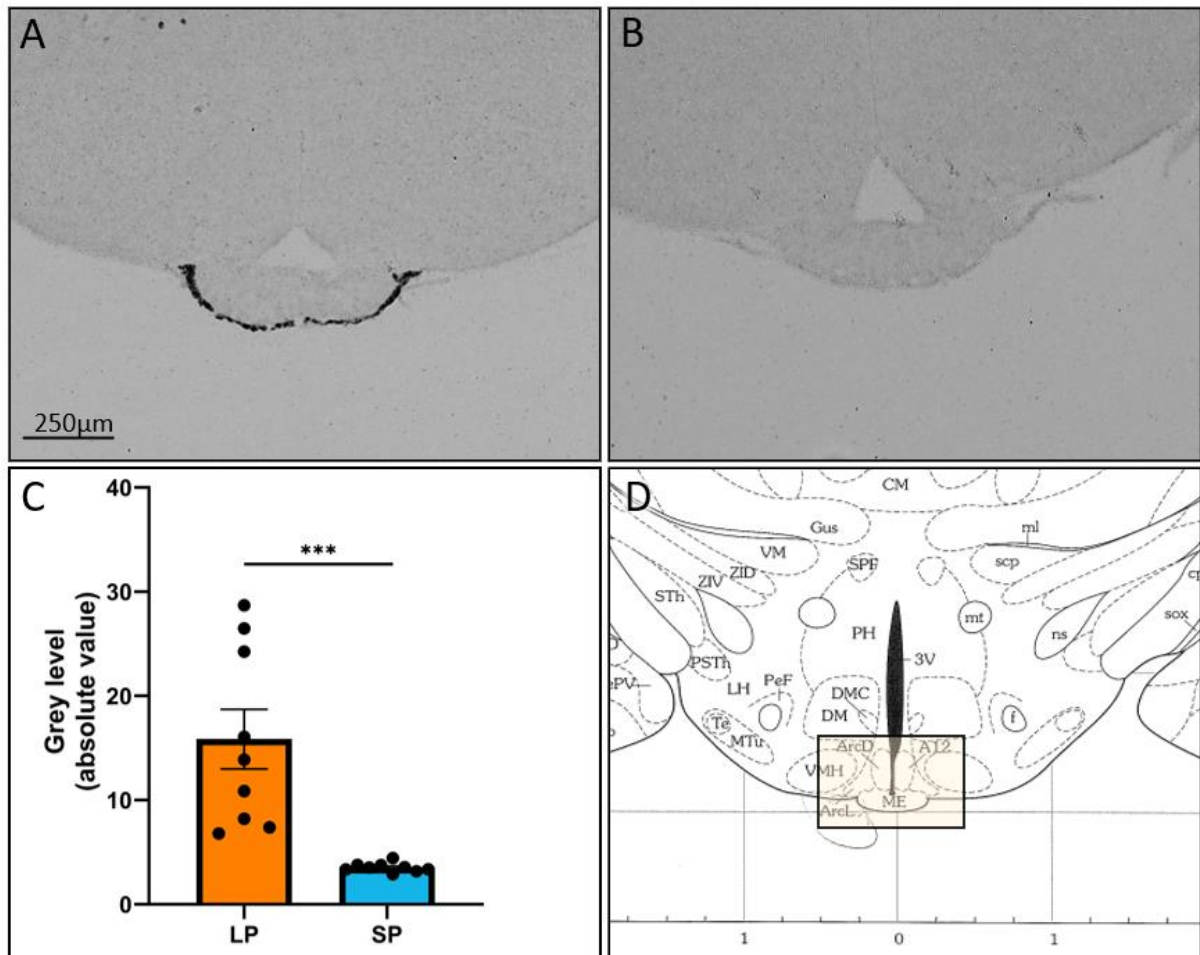
Pineal melatonin measurements showed low levels of pineal melatonin during the day (ZT3) for both photoperiod protocols (between 20 and 30 pg/pineal) (**Figure 3**). Then, the values (around 50-60 pg/pineal) at ZT16 were higher and similar in SP and LP pineal tissues, indicating melatonin production in both groups (**Figure 3**). Finally, pineal melatonin reached its highest concentration at ZT20 in SP (80 pg/pineal) compared to LP group (10 pg/pineal). Consequently, we observed two different melatonin production profiles depending on the photoperiod exposure protocol. In SP, the pineal melatonin content progressively increased during the night until a maximum value before light onset. In LP, the melatonin production appeared to shift in the early night, with a maximum value around ZT16 before a drastic decrease at ZT20.



**Figure 3: Pineal melatonin detection in SP and LP exposed mice.** Pineal melatonin (pg/pineal) was measured at ZT3 (n=3), ZT16 (n=3) and ZT20 (n=4) for each photoperiod groups. While SP group (in blue) displays a large melatonin secretion peak with increasing concentration between ZT16 and ZT20, pineal melatonin secretion in LP group (in orange) has almost come back to a minimum at the end of the night (ZT20). These results suggest a shift in the melatonin secretion toward the beginning of the night in SP exposed animals.

## Melatonin signal is decoded in the pars tuberalis

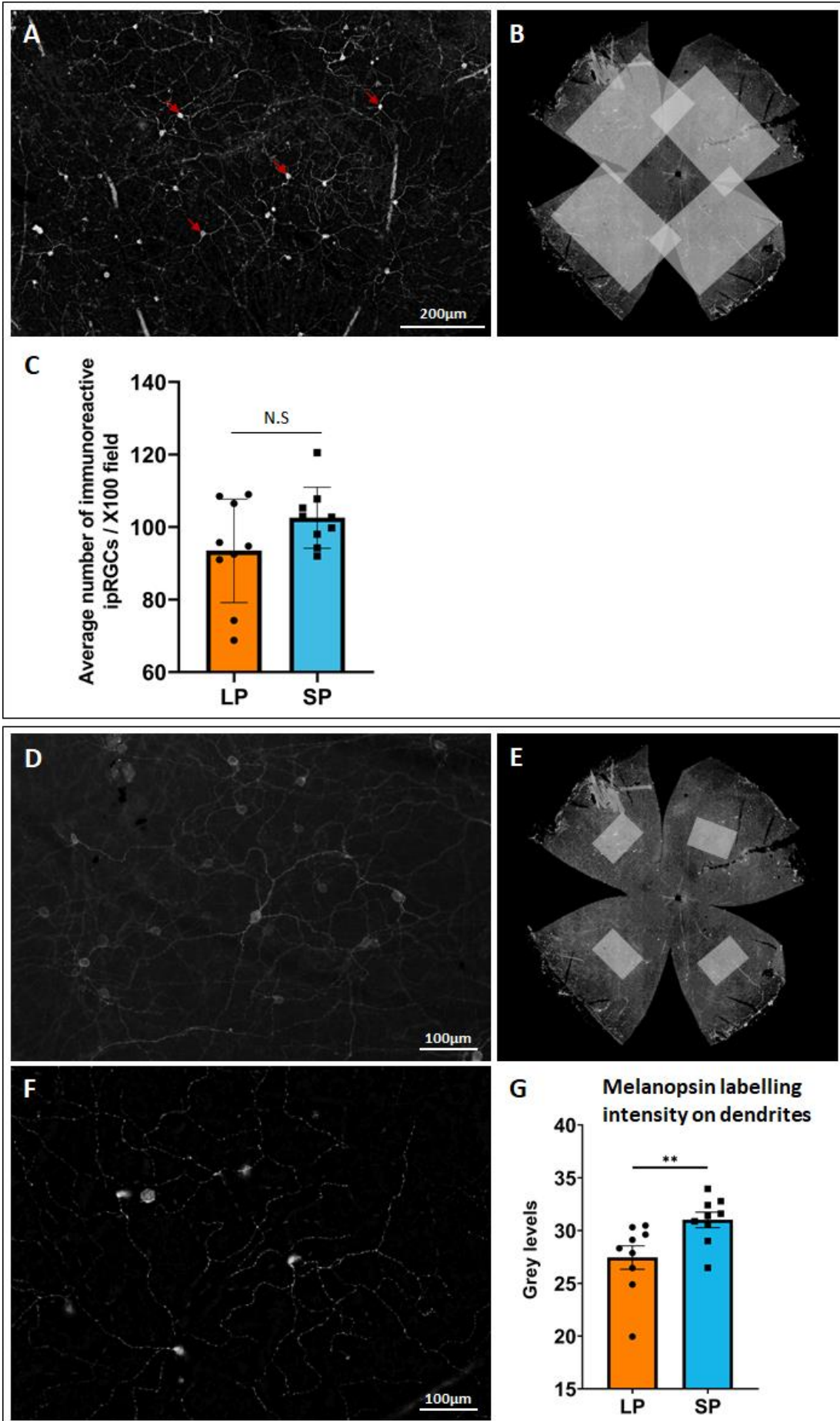
To complete the photoperiod integration study through melatonin detection, we analysed TSH $\beta$  expression, as it constitutes a reliable downstream marker of photoperiod integration. Non-radioactive *in situ* hybridization on coronal brain slices, revealed TSH $\beta$  RNA expression at the level of the median eminence. Subsequently, the labelling was compared between both photoperiod groups. The results demonstrate a significant variation in the TSH $\beta$  RNA expression between both photoperiod groups, independently of the intra-group circadian variations, with a grey scale value 5 times higher in SP compared to LP (**Figure 4**). TSH $\beta$  RNA expression is known to be highly sensitive to the duration of melatonin secretion and is inhibited by a large melatonin peak (short photoperiod). Thus, the TSH $\beta$  RNA expression was consistent with the melatonin secretion profiles and indicate that the photoperiod had been encoded in both LP and SP groups.



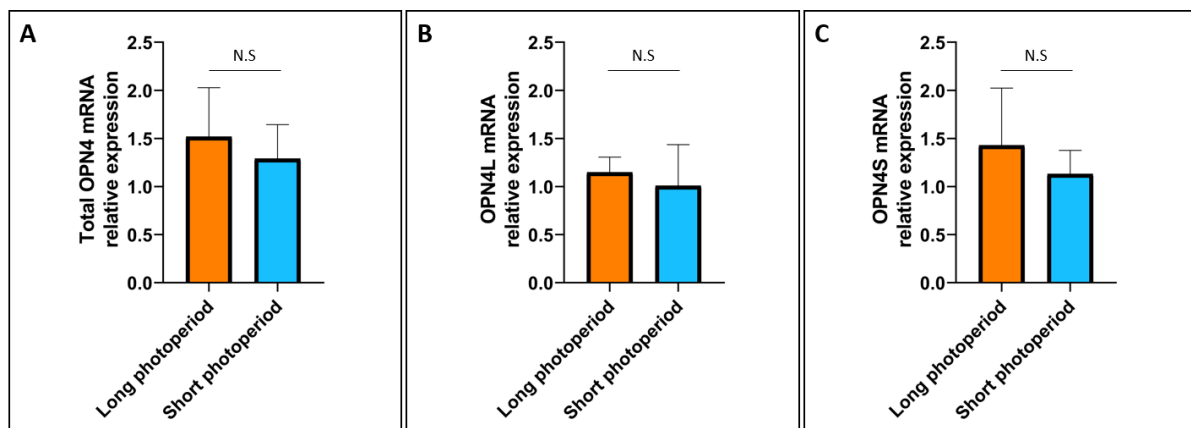
**Figure 4: ISH for TSH $\beta$  expression in the *pars tuberalis* (PT) of SP and LP exposed mice. (A) TSH $\beta$  ISH labelling was observed in the PT of a LP exposed animal. (B) PT of a SP exposed animal displayed low levels of TSH $\beta$  ISH labelling. (C) Comparison of TSH $\beta$  grey level values between LP (n=9) (orange) and SP (n=9) (blue) groups. While SP group displayed very low grey level, LP mouse showed significant higher grey level value demonstrating an important increase in TSH $\beta$  expression in LP. (D) Picture from Allen Brain Atlas shows location of the PT as seen on (A) and (B) panels.**

### **Melanopsin network displays photoperiod-dependent changes**

Melanopsin immunohistochemistry on whole flat retina was performed (**Figure 5A-5D**) and ipRGCs were counted on 4 different fields (magnification X100) in both photoperiod groups (**Figure 5B-C**). No significant difference was found in the average number of immunoreactive ipRGCs per field between SP and LP groups (**Figure 5C**). However, we observed a tendency showing some retinas of the LP group display less intense immunoreactive ipRGCs than the SP group, where the number of cells per field is more homogenous. LP ipRGCs cells may not express enough melanopsin to be seen and counted in immunohistochemistry. Thus, variation in melanopsin protein expression could reflect ipRGCs photoperiod-dependent changes. Grey-scale measurements of melanopsin labelling at the level of dendritic trees showed a significant variation between SP and LP (**Figure 5E-G**). LP retinas displayed a significantly lower absolute intensity value compared to SP retina (**Figure 5G**), indicating that melanopsin labelling is diminished in the LP group. This difference could reflect a change in melanopsin expression or in the translocation of the protein toward the cell membrane. qPCR analysis of OPN4 mRNA expression was performed to check whether variation of melanopsin labelling-intensity was linked to changed expression. mRNA OPN4 expression was assessed for total OPN4 and both isoforms (OPN4S and OPN4L) by qPCR (**Figure 6**). No significant differences were found, either between photoperiod (**Figure 6A**) exposure conditions or between both melanopsin isoforms (**Figure 6B and 6C**).



**Figure 5: Melanopsin immunohistochemistry for ipRGCs counting and labelling intensity analysis in 4 different fields (magnification X100 and X200) of LP and SP exposed mice retinas.** (A) Photo of a 100X magnification field of a C3H mouse flat retina after melanopsin IHC (photos acquired with the NanoZoomer system). Red arrows indicate ipRGCs. (B) Photo of a whole flat retina, the 4 shaded areas represent 100X magnification fields where ipRGCs counting was performed. (C) Comparison of the average number of immunoreactive ipRGCs (per 100X magnification field) in retina of animals previously exposed to LP (n=9) or SP (n=9). While no statistical difference was measured for this parameter, a tendency can be observed, suggesting that there is less OPN4 labelled cells in LP group than in SP group. (D) Photo of a 200X magnification field of a C3H mouse flat retina after melanopsin IHC (photos acquired with the NanoZoomer system). (E) A general view of a C3H flat retina. The four shaded areas represent the 4 fields where grey scale analysis was performed on dendrites for melanopsin immunostaining comparison between SP (n=9) and LP (n=9) exposed mice. (F) Picture after extraction of the melanopsin immunostaining using ImageJ for grey scale analysis. The histograms (G) represent the absolute average levels of melanopsin labelling in the LP (n=9) (orange) and SP (n=9) (blue) mouse retinas. LP group displays a significant lower average grey level on the dendritic immunostaining compared to SP group.



**Figure 6: qPCR analysis of mRNA OPN4 expression for total OPN4 (OPN4T) and both melanopsin isoforms (OPN4S and OPN4L) in LP and SP conditions.** OPN4 relative expression was measured and averaged in both photoperiod group for total OPN4 (A), short melanopsin isoform OPN4S (B) and long melanopsin isoform OPN4L (C). No differences in OPN4 relative expression were found, neither between photoperiod exposure groups nor between the different melanopsin S/L isoforms.



## Discussion

The aim of this study was to investigate the role of the retina, specifically ipRGCs, in the detection and integration of photoperiod. The involvement of the different photoreceptor types in the regulation of circadian rhythms such as SCN photoentrainment, has been well described. However, the contribution of the retina to rhythmic seasonal regulation has only been minimally studied. Whereas most inbred laboratory mouse strains have a deficient melatonin pathway, due to mutations in the synthetic enzyme AA-NAT (Kennaway, 2019), use of the melatonin-proficient photoreceptor-degeneration C3H *rd1* mouse allowed us to investigate the specific role of ipRGCs in photoperiodic detection and integration. C3H *rd1* display functional ipRGCs comparable to those of non-degenerated mice strains (Morin and Studholme, 2011). They constitute the only photoreceptive system remaining in this strain (Zhang et al., 2017).

In the present study, we raised the question of whether the retina more specifically the ipRGCs, display photoperiod-dependent changes. The analysis of whole flat-mounted retinas (cell counting and grey scale measurements) showed no significant variations in the number of melanopsin-positive cells but displayed a significant variation in the intensity of immunolabelling. The retina of SP animals showed a 15% increase in melanopsin intensity at the level of dendritic trees, suggesting that the quantity of melanopsin changes according to photoperiod variation. Moreover, previous studies showed that melanopsin expression is affected by light, notably through cones/rods and INL dopamine secretion (Sakamoto et al., 2005, 2004). Here, despite degeneration of both rods and cones, the melanopsin system seems to be responsive to photoperiod variations in C3H *rd1* mice. A possible hypothesis could be that light exposure history acts either directly on melanopsin protein expression (Wong et al., 2005), or indirectly by shifting the retinal circadian clock and impacting its expression (Bobu et al., 2013). However, the level at which photoperiodic changes influence melanopsin expression are not known. The effects of light exposure upon melanopsin expression are complex, since exposure of adult rats to constant light (LL) down-regulated, and constant dark (DD) upregulated, both *Opn4* mRNA and protein (Hannibal et al., 2005). On the contrary, rearing of rat pups under DD resulted in decreased levels of *Opn4* mRNA and protein (Guo et al., 2016), while rearing in LL increased *Opn4* expression (Hong et al., 2013). Our results showed no significant differences in *Opn4* mRNA expression between the SP and LP groups, whereas melanopsin protein immunostaining was more intense in SP. This seeming discrepancy is consistent with previous reports in which LL downregulated *Opn4* protein without affecting its expression at the mRNA level (Hannibal et al., 2013).

Since melatonin is also known to regulate ipRGC photosensitivity (Pack et al., 2015), changes in retinal melatonin secretion in response to light variation (Tosini and Fukuhara, 2003) could also contribute to photoperiod-dependent responses in the retina. Tosini, Menaker and collaborators have demonstrated that melatonin is synthesized at night in rodent photoreceptors (Gianesini et al., 2015; Hamm and Menaker, 1980; Tosini and Menaker, 1996;

Yu, 1981), similar to the pineal gland. Moreover, melatonin receptors are expressed in the outer nuclear and ganglion cell layers of the retina (Dubocovich and Markowska, 2005; Laurent et al., 2017; Klosen et al., 2019), and melatonin is known to play a role in survival of both photoreceptors and ganglion cells during aging (Baba et al., 2012). However, the lack of photoreceptors in the C3H *rd1* line precludes such effects happening in the present study. Circadian clock proteins are still rhythmically expressed in the inner nuclear layer (INL) and the ganglion cells layer (GCL) in the C3H strain, while this rhythmicity is lost for some genes in melatonin deficient C57BL/6 mouse (Dinet et al., 2007). As retinal AA-NAT expression is sensitive to photoperiodic variation in rats (Engel et al., 2004), this suggests a possible role for melatonin in the control of melanopsin expression through the retinal clock (Hannibal et al., 2013) in intact retinas.

In parallel to changes in melanopsin expression, we demonstrated that ipRGCs are necessary and sufficient to ensure normal photoperiod detection that leads to distinct LP and SP melatonin secretion profiles (consistent with mouse melatonin secretion profiles described in the literature (Kennaway, 2019), as well as TSH $\beta$  expression patterns. In this model, we consider both initial photoperiod encoding by retina, and then downstream coding of photoperiod information by the central clock, melatonin plasticity and the reproductive axis (De Miera et al., 2020). In our study, C3H mice exposed to LP do not display significant changes within the timeframe of photoperiod exposure, whereas mice exposed to SP display progressive changes in the distribution of their locomotor profiles. Differences that are already observable at the start of the recording show that the groups had probably already begun to integrate photoperiodic information during the first 2 non-recorded weeks, since the SCN begins to respond to photoperiod changes within days (Tournier et al., 2009). Complete analysis of the C3H locomotor activity throughout photoperiodic exposure revealed significant changes in the distribution of nocturnal locomotor activity. While the LP group displays a stable and monophasic locomotor profile during the experimental period, the SP group displays progressive spreading of the locomotor profile that tends to become biphasic. Interestingly, these results are consistent with a very recent study which compared the locomotor activity of C57BL/6 mice (melatonin-deficient) and C3H mice in semi-natural conditions (Metzger et al., 2019). This study highlighted the key role of circulating melatonin in seasonal variation in activity but did not explore ocular input. The lack of significant changes in the locomotor activity of LP-exposed mice can be explained by the fact that the previous “neutral” LD 12:12 photoperiod is already encoded as LP (Metzger et al., 2019). This reshaping of locomotor activity is consistent with changes in SCN intra-connectivity in response to photoperiodic changes, as was suggested in previous studies (Coomans et al., 2015; Tackenberg and McMahon, 2018). Thus, the progressive changes in locomotor activity could reflect ongoing photoperiodic integration by the SCN network (Rohling et al., 2006). Nonetheless, the central role of the melatonin in shaping the locomotor activity profile cannot be understated, notably through the retroactive signalling toward the SCN which has been previously discussed (Dubocovich and Markowska, 2005; Nagy et al., 2015; Stehle et al., 2002). This hypothesis is consistent with previous studies in rats where melatonin secretion levels

were correlated with locomotor activity amplitude (Klante et al., 1999). Thus, our results suggest that photoperiodic changes in the locomotor activity profile could result both from retina-SCN connectivity and melatonin-SCN feedback circuits.

In the brain, pineal gland-derived melatonin has been extensively described as an essential component of photoperiodic integration and seasonal physiology. The major production of melatonin occurs at night, when the absence of light removes an inhibitory signal from a multi-synaptic neuronal pathway connecting the retinal-hypothalamic tractus to the pineal gland (Malpoux et al., 1999). Studies on C3H MT1/MT2 KO mice demonstrated an important role for melatonin in SCN electrical activity regulation and modulation of the retinal PACAPergic input to the central clock (Jin et al., 2003; Stehle et al., 2002; Von Gall et al., 2000). Moreover, comparative studies between C57BL/6 melatonin deficient mouse and the present melatonin proficient C3H mouse demonstrated that this hormone is involved in clockwork modulation. Pfeffer & Al., have notably shown that melatonin facilitates the re-entrainment of the circadian system via the MT2 receptor and stabilizes the diurnal locomotor activity (Pfeffer et al., 2017, 2012). On another level, melatonin has been showed to play a role in the photoperiod-dependent regulation of serotonin neurotransmission by the dorsal raphe nucleus, which could impact locomotor activity and mood in response to seasonal variations (Giannoni-Guzmán et al., 2020; Green et al., 2015). Taken together, these studies suggest that both melatonin and ipRGCs changes could take part in the modulation of the SCN activity/locomotor activity to photoperiod variation. Besides, the idea that ipRGCs could take part in seasonal adaptation has also been mentioned in a recent review (Porcu et al., 2018). Moreover, the length and amplitude of melatonin secretion are negatively correlated to night duration, leading to its key role as an internal messenger for seasonal changes. Indeed, it has been shown the pars tuberalis is a key structure for the regulation of seasonal reproduction (Korf, 2018). This structure notably expresses clock proteins whose rhythmic expression is dependent on melatonin-signalling via MT1 receptor (Jilg et al., 2005). Thus, melatonin plays a central role by regulating clockwork and AMPc-sensitive gene expression in the *pars tuberalis* (Kell and Stehle, 2005; Von Gall et al., 2005). The encoding of the photoperiod through melatonin secretion acts directly on these circadian components to regulate an EYA3/TSH pathway, responsible for seasonal biology (Dardente et al., 2003; Unfried et al., 2009; Wood et al., 2020). To sum up, melatonin is upstream of the molecular cascade that leads to the inhibition or activation of TSH expression and the regulation of seasonal reproduction (Dardente et al., 2010; Korf, 2018).

Here, the changes in melanopsin levels (as visualized by immunostaining intensity) could directly impact the excitability of ipRGCs and consequently modify the strength of their input to central structures such as the SCN (Wong et al., 2005). Seasonal changes in photoreceptor responses have been reported, such as decreased light sensitivity in rods in seasonal affective disorder (Hebert et al., 2004) or seasonal variation of the human post-illumination pupil response (Kawasaki, 2017). Our study suggests that physiological changes in ipRGCs in response to photoperiod could constitute an adaptive mechanism, allowing the retina to

encode seasonal photoperiodic variations and regulate, together with melatonin, non-visual functions. Thus, ipRGCs could actively participate in photoperiodic integration by modulating light information input to the central clock, and consequently influence the encoding of daylength. To further investigate this hypothesis, experiments should compare the photoperiod integration kinetics between OPN4 KO and WT animals. More importantly, since most studies have been performed on commonly used mouse models such as the melatonin deficient C57BL/6 mice, future research should focus on using melatonin-proficient animals with intact retinas, as melatonin takes part both in the regulation of seasonal functions and in local retinal physiology.

### **Acknowledgements**

We wish to acknowledge Dr. Béatrice Bothorel for the RIA experiments as well as Dr. Cristina Sandu for her expertise on qPCR experiments.

### **Conflict of interest:**

The authors declare no conflicts of interest

## References

- Arendt, J., 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod.* 3, 13–22. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030013>
- Baba, K., Mazzoni, F., Owino, S., Contreras-Alcantara, S., Strettoi, E., Tosini, G., 2012. Age-related changes in the daily rhythm of photoreceptor functioning and circuitry in a melatonin-proficient mouse strain. *PLoS One* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037799>
- Bobu, C., Sandu, C., Laurent, V., Felder-Schmittbuhl, M.-P., Hicks, D., 2013. Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the *Arvicanthis ansorgei* retina. *Mol. Vis.* 19, 1060–73.
- Carter-Dawson, L.D., LaVail, M.M., Sidman, R.L., 1978. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 489–498.
- Coomans, C.P., Ramkisoensing, A., Meijer, J.H., 2015. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front. Neuroendocrinol.* 37, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.002>
- Dardente, H., Klosien, P., Pévet, P., Masson-Pévet, M., 2003. MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: Effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* 15, 778–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01060.x>
- Dardente, H., Wood, S., Ebling, F., Sáenz de Miera, C., 2019. An integrative view of mammalian seasonal neuroendocrinology. *J. Neuroendocrinol.* 31, 1–17. <https://doi.org/10.1111/jne.12729>
- Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupré, S.M., Loudon, A.S.I., Lincoln, G.A., Hazlerigg, D.G., 2010. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr. Biol.* 20, 2193–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.048>
- De Miera, C.S., Beymer, M., Routledge, K., Król, E., Selman, C., Hazlerigg, D.G., Simonneaux, V., 2020. Photoperiodic regulation in a wild-derived mouse strain. *J. Exp. Biol.* 223, 1–9. <https://doi.org/10.1242/jeb.217687>
- Dinet, V., Ansari, N., Torres-Farfan, C., Korf, H.W., 2007. Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.* 42, 83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00387.x>
- Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27, 101–110. <https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:101>
- Duncan, M.J., Fang, J. -M, Dubocovich, M.L., 1990. Effects of Melatonin Agonists and Antagonists on Reproduction and Body Weight in the Siberian Hamster. *J. Pineal Res.* 9, 231–242. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1990.tb00898.x>
- Engel, L., Vollrath, L., Spessert, R., 2004. -acetyltransferase gene expression in retina and pineal gland of rats under various photoperiods 318, 983–986. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.133>

Gianesini, C., Clesse, D., Tosini, G., Hicks, D., Laurent, V., 2015. Unique regulation of the melatonin synthetic pathway in the retina of diurnal female *Arvicanthis ansorgei* (Rodentia). *Endocrinology* 156, 3292–3308. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1267>

Giannoni-Guzmán, M.A., Kamitakahara, A., Magalong, V., Levitt, P., McMahon, D.G., 2020. Circadian Photoperiod alters TREK-1 channel function and expression in dorsal raphe serotonergic neurons via Melatonin Receptor 1 signaling. *J. Pineal Res.* e12705. <https://doi.org/10.1111/jpi.12705>

Goto, M., Ebihara, S., 1990. The influence of different light intensities on pineal melatonin content in the retinal degenerate C3H mouse and the normal CBA mouse. *Neurosci. Lett.* 108, 267–272. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90652-P](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90652-P)

Green, D.G., Kapousta-Bruneau, N. V., 1999. A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrodes and drugs. *Vis. Neurosci.* 16, 727–741. <https://doi.org/10.1017/S0952523899164125>

Green, N.H., Jackson, C.R., Iwamoto, H., Tackenberg, M.C., McMahon, D.G., 2015. Photoperiod Programs Dorsal Raphe Serotonergic Neurons and Affective Behaviors. *Curr. Biol.* 25, 1389–1394. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.050>

Guo, F., Zhou, A., Zhang, N., Chen, H., Zhu, L., 2016. Effects of light on the development of melanopsin containing retinal ganglion cells in rats 2999–3004.

Hamm, H.E., Menaker, M., 1980. Retinal rhythms in chicks: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 4998–5002. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.8.4998>

Han, J., Dinculescu, A., Dai, X., Du, W., Clay Smith, W., Pang, J., 2013. Review: The history and role of naturally occurring mouse models with *Pde6b* mutations. *Mol. Vis.* 19, 2579–2589.

Hannibal, J., Georg, B., Fahrenkrug, J., 2013. Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp. Eye Res.* 106, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.11.006>

Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P., Fahrenkrug, J., 2005. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J. Mol. Neurosci.* 27, 147–55. <https://doi.org/10.1385/JMN:27:2:147>

Hebert, M., Beattie, C.W., Tam, E.M., Yatham, L.N., Lam, R.W., 2004. Electroretinography in patients with winter seasonal affective disorder 127, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.03.006>

Hong, J., Zeng, Q., Wang, H., Kuo, D.S., Baldrige, W.H., Wang, N., 2013. Controlling the number of melanopsin-containing retinal ganglion cells by early light exposure. *Exp. Eye Res.* 111, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.03.011>

Hughes, S., Welsh, L., Katti, C., González-Menéndez, I., Turton, M., Halford, S., Sekaran, S., Peirson, S.N., Hankins, M.W., Foster, R.G., 2012. Differential expression of melanopsin

isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034531>

Jilg, A., Moek, J., Weaver, D.R., Korf, H.W., Stehle, J.H., Von Gall, C., 2005. Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2845–2854. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04485.x>

Jin, X., von Gall, C., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., Stehle, J.H., Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2003. Targeted Disruption of the Mouse Mel1b Melatonin Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1054–1060. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.3.1054-1060.2003>

Kawasaki, A., 2017. Melanopsin-Mediated Acute Light Responses Measured in Winter and in Summer: Seasonal Variations in Adults with and without Cataracts 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00464>

Kell, C.A., Stehle, J.H., 2005. Just the two of us: Melatonin and adenosine in rodent pituitary function. *Ann. Med.* 37, 105–120. <https://doi.org/10.1080/07853890510007296>

Kennaway, D.J., 2019. Melatonin research in mice: a review. *Chronobiol. Int.* 36, 1167–1183. <https://doi.org/10.1080/07420528.2019.1624373>

Klante, G., Secci, K., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Vivien-Roels, B., Steinlechner, S., Wollnik, F., 1999. Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.4.r1078>

Klosen, P., Sébert, M.E., Rasri, K., Laran-Chich, M.P., Simonneaux, V., 2013. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* 27, 2677–2686. <https://doi.org/10.1096/fj.13-229559>

Korf, H.W., 2018. Signaling pathways to and from the hypophysial pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 258, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.011>

Laurent, V., Sengupta, A., Sánchez-Bretaña, A., Hicks, D., Tosini, G., 2017. Melatonin signaling affects the timing in the daily rhythm of phagocytic activity by the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 165, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.09.007>

Lucas, R.J., Lall, G.S., Allen, A.E., Brown, T.M., 2012. How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock, 1st ed, *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00001-0>

Malpoux, B., Thiéry, J.C., Chemineau, P., 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 355–66. <https://doi.org/10.1051/rnd:19990308>

Metzger, J., Wicht, H., Korf, H.W., Pfeiffer, M., 2019. Seasonal Variations of Locomotor Activity Rhythms in Melatonin-Proficient and -Deficient Mice under Seminatural Outdoor Conditions. *J. Biol. Rhythms* 1–14. <https://doi.org/10.1177/0748730419881922>

- Morin, L.P., Studholme, K.M., 2011. Separation of function for classical and ganglion cell photoreceptors with respect to circadian rhythm entrainment and induction of photosomnolence. *Neuroscience* 199, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.057>
- Nagy, A.D., Iwamoto, A., Kawai, M., Goda, R., Matsuo, H., Otsuka, T., Nagasawa, M., Furuse, M., Yasuo, S., 2015. Melatonin adjusts the expression pattern of clock genes in the suprachiasmatic nucleus and induces antidepressant-like effect in a mouse model of seasonal affective disorder. *Chronobiol. Int.* 32, 447–457. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.992525>
- Pack, W., Hill, D.D., Wong, K.Y., 2015. Melatonin modulates M4-type ganglion-cell photoreceptors. *Neuroscience* 303, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.046>
- Pfeffer, M., Korf, H.W., Wicht, H., 2017. The role of the melatonergic system in light-entrained behavior of mice. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030530>
- Pfeffer, M., Rauch, A., Korf, H.W., Von Gall, C., 2012. The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiol. Int.* 29, 415–429. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.667859>
- Porcu, A., Riddle, M., Dulcis, D., Welsh, D.K., 2018. Photoperiod-induced neuroplasticity in the circadian system. *Neural Plast.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5147585>
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., Rollag, M.D., 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 340–5.
- Ribelayga, C., Gauer, F., Calgari, C., Pevet, P., Simonneaux, V., 1999. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: An analysis of its complex relationship with HIOMT activity. *Endocrinology* 140, 1375–1384. <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6552>
- Rohleder, N., Langer, C., Maus, C., Spiwoks-becker, I., Emser, A., Engel, L., Spessert, R., 2006. Influence of photoperiodic history on clock genes and the circadian pacemaker in the rat retina 23, 105–111. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04528.x>
- Rohling, J., Meijer, J.H., VanderLeest, H.T., Admiraal, J., 2006. Phase differences between SCN neurons and their role in photoperiodic encoding; a simulation of ensemble patterns using recorded single unit electrical activity patterns. *J. Physiol. Paris* 100, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.005>
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Pozdeyev, N. V., Iuvone, P.M., Tosini, G., 2005. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3129–3136. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04512.x>



- Sakamoto, K., Liu, C., Tosini, G., 2004. Classical photoreceptors regulate Melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J. Neurosci.* 24, 9693–9697. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2556-04.2004>
- Simonneaux, V., Ribelayga, C., 2003. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters 55, 325–395. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2.325>
- Stehle, J.H., Von Gall, C., Korf, H.W., 2002. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: A comparative investigation. *Cell Tissue Res.* 309, 173–182. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0583-2>
- Tackenberg, M.C., McMahon, D.G., 2018. Photoperiodic Programming of the SCN and Its Role in Photoperiodic Output. *Neural Plast.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8217345>
- Tosini, G., Fukuhara, C., 2003. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J. Neuroendocrinol.* 15, 364–369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00973.x>
- Tosini, G., Menaker, M., 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* (80-.). 272, 419–421. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.419>
- Tournier, B.B., Birkenstock, J., Pévet, P., Vuillez, P., 2009. Gene expression in the suprachiasmatic nuclei and the photoperiodic time integration. *Neuroscience* 160, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.002>
- Unfried, C., Ansari, N., Yasuo, S., Korf, H.W., Von Gall, C., 2009. Impact of melatonin and molecular clockwork components on the expression of thyrotropin  $\beta$ -chain (Tshb) and the Tsh receptor in the mouse pars tuberalis. *Endocrinology* 150, 4653–4662. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0609>
- van Diepen, H.C., Foster, R.G., Meijer, J.H., 2015. A colourful clock. *PLoS Biol* 13, e1002160. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002160>
- Van Hook, M.J., Wong, K.Y., Berson, D.M., 2012. Dopaminergic modulation of ganglion-cell photoreceptors in rat. *Eur. J. Neurosci.* 35, 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07975.x>
- Von Gall, C., Weaver, D.R., Kock, M., Korf, H.W., Stehle, J.H., 2000. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel(1a) receptor. *Neuroreport* 11, 1803–1807. <https://doi.org/10.1097/00001756-200006260-00002>
- Von Gall, C., Weaver, D.R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J.H., Korf, H.W., 2005. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 508–511. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.105>
- Wong, K.Y., Dunn, F.A., Berson, D.M., 2005. Photoreceptor adaptation in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Neuron* 48, 1001–1010. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.11.016>

Wood, S.H., Hindle, M.M., Mizoro, Y., Cheng, Y., Saer, B.R.C., Miedzinska, K., Christian, H.C., Begley, N., McNeilly, J., McNeilly, A.S., Meddle, S.L., Burt, D.W., Loudon, A.S.I., 2020. Circadian clock mechanism driving mammalian photoperiodism. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18061-z>

Yu, H.S., 1981. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *J. Endocrinol.*

Zhang, J., Wang, H., Wu, S., Liu, Q., Wang, N., 2017. Regulation of reentrainment function is dependent on a certain minimal number of intact functional ipRGCs in rd mice. *J. Ophthalmol.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6804853>



## 2. Données préliminaires sur les souris C57BL/6 productrices de mélatonine

Nous avons cherché à générer un modèle de souris avec une rétine intacte et produisant de la mélatonine. Ce modèle devrait permettre d'évaluer la réponse de la rétine aux variations de la photopériode en présence des bâtonnets et des cônes, en comparant avec les données obtenues chez la souche C3H *rd1* (article 1).

### a. Production de mélatonine et homozygotie pour l'AANAT et l'HIOMT

Afin de savoir si l'hétérozygotie pouvait être suffisante pour rétablir une sécrétion circadienne de mélatonine, la quantité de mélatonine à ZT20 dans les glandes pinéales de souris C57 *Hiomt*<sup>C57/CBA</sup> *Aanat*<sup>C57/CBA</sup> maintenues en cycle LD 12:12 a été mesurée par dosage RIA (figure 28). Chez ces animaux, la quantité de mélatonine mesurée est inférieure à 10pg/glande, ce qui est proche du seuil minimal de détection. En comparaison, les dosages RIA chez les souris C3H *rd1* qui synthétisent de la mélatonine révèlent des quantités proches de 50pg/glandes, ce qui est cohérent avec une sécrétion normale de mélatonine.

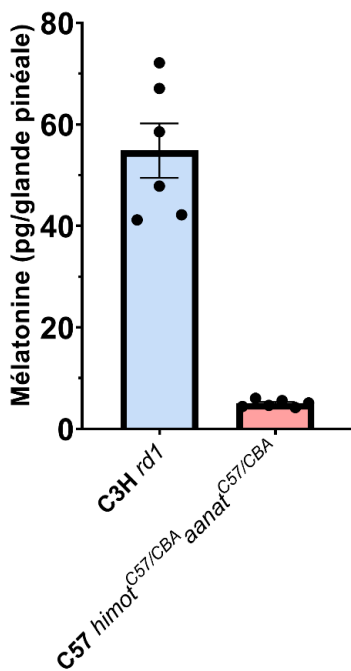


Figure 28 : Dosage de la mélatonine dans la glande pinéale la nuit chez les souris C3H *rd1* et C57 hétérozygotes *hiomt*<sup>C57/CBA</sup> *aanat*<sup>C57/CBA</sup>.

Ces données indiquent que l'hétérozygotie des allèles CBA n'est pas suffisante pour un rétablissement de la sécrétion de mélatonine dans le modèle C57. Il est donc nécessaire chez ces souris de garantir une homozygotie pour les deux allèles, ce qui a considérablement augmenté le temps de génération de ce modèle. Cette homozygotie a été vérifiée *via* des génotypages systématiques à chaque génération (figure 29). La souris CBA X C57 provient des croisements pour le rétablissement de la sécrétion de mélatonine tandis la souris C57 est une souris de la souche C57BL/6 classique déficiente en mélatonine. La souris CBA X C57 présente une bande à 284bp pour le génotypage de l'*aanat* seulement avec les amorces CBA, alors que la souris C57 présente une bande seulement avec les amorces C57. Ces données indiquent

que ces souris sont respectivement homozygotes pour les allèles *aanat* de la CBA et de la C57. La même démarche est applicable pour l'*hiomt* à droite avec des bandes à 311pb seulement pour les amorces CBA (chez souris CBA X C57) ou C57 (chez la souris C57BL/6). Ainsi, la souris CBA X C57 présente un génotype *hiomt*<sup>CBA/CBA</sup> *aanat*<sup>CBA/CBA</sup>. Ces premières souris homozygotes pour les deux allèles CBA ont été générées en début d'année 2020. Des expériences sont actuellement en cours pour confirmer le rétablissement de la sécrétion de mélatonine chez ces animaux tout en étudiant l'intégration photopériodique.

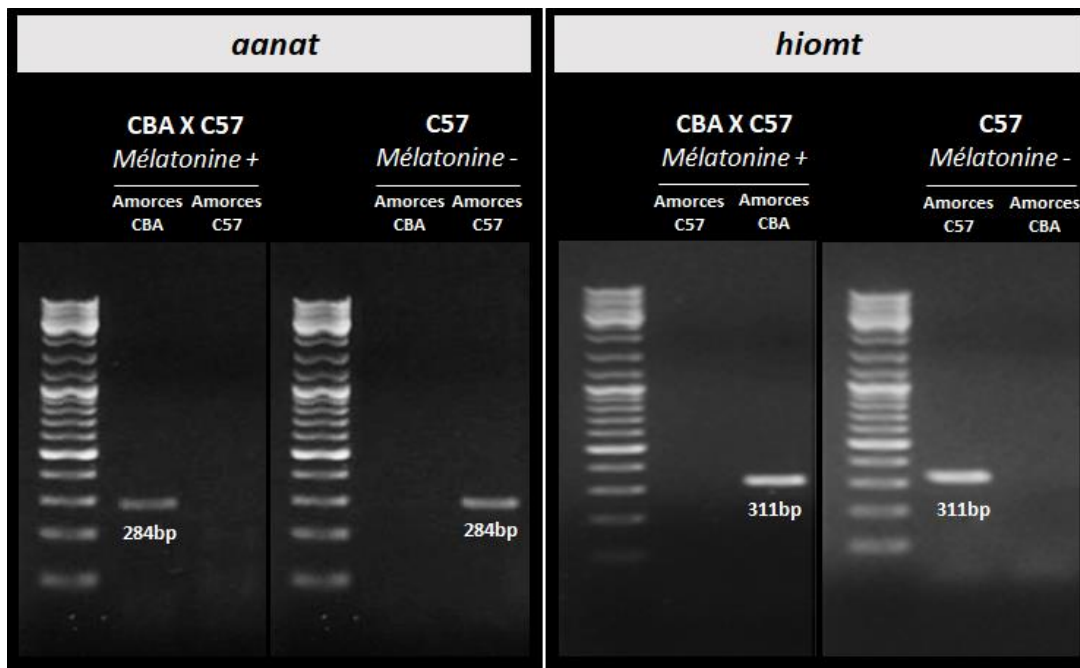
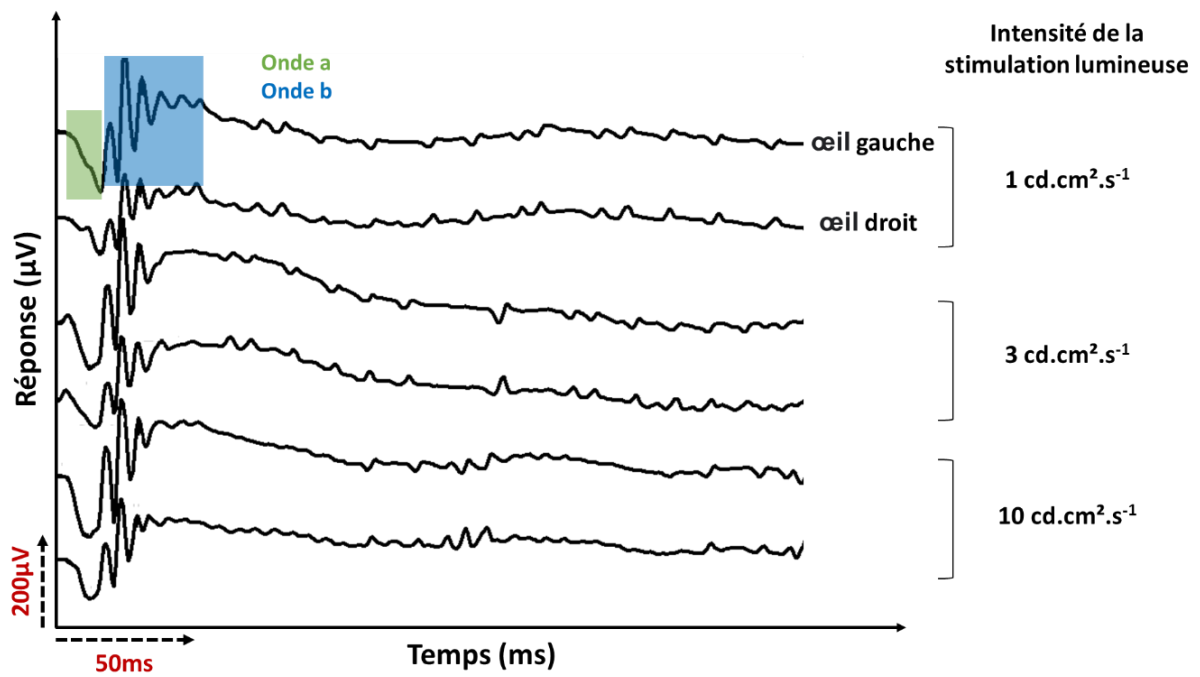


Figure 29 : Génotypage des allèles CBA et C57 codant pour l'AANAT et l'HIOMT pour la génération de souris C57 qui produisent de la mélatonine.

#### b. Les animaux C57 croisés CBA présentent un ERG normal

Alors que la sécrétion de mélatonine est cruciale pour étudier l'intégration de la photopériode au niveau central, il est également essentiel de contrôler les caractéristiques de la rétine. Les souris productrices de mélatonine sont générées par croisement de souris C57 avec des souris CBA. Or, il a été montré récemment que de nombreux modèles de souris sur fond génétique CBA/C3H étaient également porteurs de la mutation *nob8* dans la rétine (Chang, 2015; Pardue and Peachey, 2014; Peachey et al., 2017). Cette mutation affecte la transmission glutamatergique entre les bâtonnets et les BCs. Afin de s'assurer de l'absence de cette mutation chez nos modèles, des analyses par ERG ont été effectuées (figure 30). En effet, La mutation *nob8* peut être facilement diagnostiquée car elle n'affecte pas l'onde A, mais réduit significativement l'amplitude de l'onde B, qui n'est alors presque plus dépolarisante. Chez les animaux C57 croisés avec les souris CBA, On observe une onde A d'une amplitude de 100µV et une onde B d'une amplitude supérieure à 150µV. En somme, le tracé ERG est normal et exclut la présence de la mutation *nob8* chez nos modèles.



**Figure 30 : Réponse ERG d'une souris C57 croisée CBA.** La fonction visuelle a été évaluée en utilisant un protocole scotopique permettant de tester en priorité la réponse des bâtonnets.

## II. Axe 2 : Impact de la lumière bleue sur le comportement

L'objectif de cet axe de recherche a été de déterminer si une exposition à de la lumière bleue ou enrichie en bleu pouvait entraîner des effets directs sur les comportements de type anxieux/agressif, indépendamment des effets dus à un dérèglement du cycle circadien.

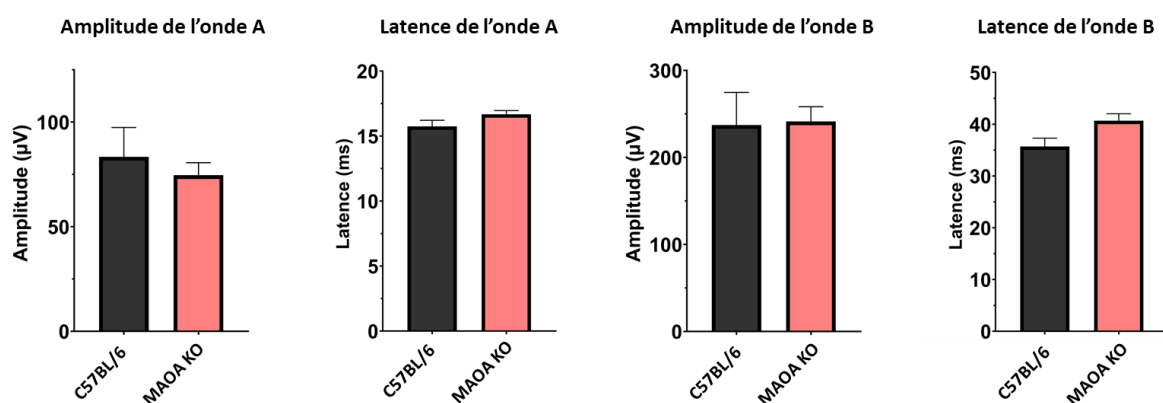
### 1. Protocole d'exposition avec néons (2017-2018)

#### a. Validation du modèle monoamine oxydase KO

Les souris MAOA KO constituent un modèle de prédisposition au comportement de type agressif/anxieux. Avant de l'utiliser dans nos protocoles d'exposition à la lumière, il était important de vérifier si ces animaux sont capables de détecter correctement la lumière et si leur ipRGCs sont comparables à des animaux WT.

##### i. Les MAOA KO présentent un ERG comparable aux WT

Afin de s'assurer que les souris MAOA KO ne présentent pas d'altération fonctionnelle de la rétine, nous avons procédé à des examens ERG en mesurant les amplitudes et les latences des ondes a et b (figure 31). La rétine des animaux a été adaptée à l'obscurité pendant 24 heures avant l'examen, puis a été exposée à un protocole scotopique. Les amplitudes et les latences des ondes a et b ont été mesurées puis comparées entre les deux modèles. De manière générale, les réponses ERG sont similaires, avec des ondes a d'amplitudes 75-80 $\mu$ V (15-16ms de latence) et des ondes b d'amplitudes proches de 240-250 $\mu$ V (latence de 35-40ms).

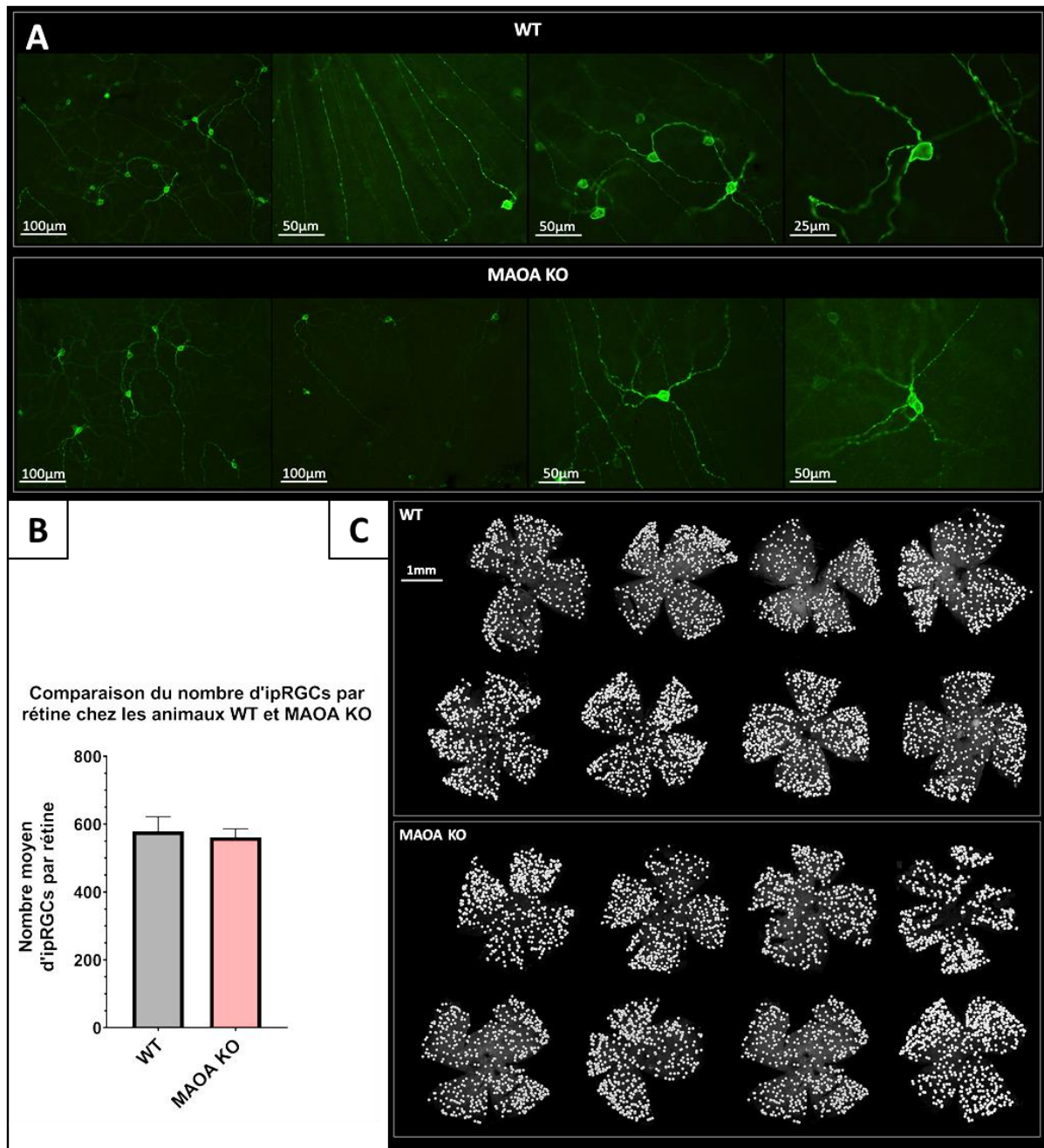


**Figure 31 : Comparaison des réponses ERG des souris MAOA KO et C57BL/6.** Les animaux C57BL/6 (en noir) et MAOA KO (en rouge) ont été adaptés à l'obscurité pendant 24h puis exposés à un protocole scotopique. Les amplitudes et latence des ondes A et B ont été mesurées puis comparées. En conclusion, aucune différence significative n'est observée entre les deux génotypes.

##### ii. Les MAOA KO présentent des ipRGCs comparables aux WT

Les ipRGCs des animaux MAOA KO ont été comparées à celles des animaux WT C57BL/6 par marquage immunohistochimique de la mélanopsine sur rétine à plat. L'anatomie mais également le nombre et la répartition des ipRGCs immunomarquées ont été comparées (figure 32). La comparaison anatomique des ipRGCs entre rétine de souris WT et MAOA KO (figure 32)

A) ne révèle aucune différence notable, avec un immunomarquage homogène sur le soma, les dendrites et l'axone. En termes de nombre et de répartition des ipRGCs (**figure 32 B-C**), les rétines de souris WT et MAOA KO sont également très similaires, avec 550 à 600 ipRGCs en moyenne par rétine. On observe également une répartition asymétrique des cellules sur les rétines chez les deux génotypes (**figure 32 C**).



**Figure 32 : Comparaison de l'anatomie et du nombre de cellules mélanopsine-positives chez les souris WT (C57BL/6) et MAOA KO. (A)** Comparaison anatomique des ipRGCs chez les animaux WT (ligne du haut) et MAOA KO (ligne du bas). **(B)** Histogramme du nombre d'ipRGCs moyen par rétine chez les animaux WT et MAOA KO. **(C)** Photos des rétines à plat WT (en haut) et MAOA KO (en bas) après comptage des ipRGCs, chaque point blanc représente une cellule.



## **b. Protocole d'exposition avec néons (2017-2018)**

L'objectif de ces protocoles était de mimer l'exposition chronique à la lumière bleue retrouvée chez l'Homme. Pour tester les effets directs de la lumière bleue en évitant les effets d'un dérèglement circadien, les expositions aux néons ont été fait en continuité avec la phase lumineuse. En raison de la différence diurne/nocturne entre l'Homme et la souris, nous avons dans un premier temps testé l'impact d'une exposition à la lumière bleue le matin versus le soir chez les souris WT et MAOA KO (**partie b.i**). Puis dans un deuxième temps, nous avons tester l'impact d'une exposition à la lumière bleue versus blanc chaud (**partie b.ii**).

### **i. Exposition à la lumière bleue en début ou fin de journée (2017)**

Pendant les 8 semaines d'exposition à la lumière bleue en fin ou en début de journée, l'activité locomotrice des animaux a été enregistrée (**figure 33**). De manière générale, les animaux MAOA KO (tracés rouges) et WT (tracés noirs) présentent une diminution importante de l'activité locomotrice pendant les créneaux de lumière bleue. On observe que l'allumage de la lumière bleue pendant la nuit (à ZT22 sur le graphique du haut) provoque une chute significative de l'activité locomotrice similaire à ce qu'on observe lors d'une transition jour/nuit (à ZT0 sur le graphique du bas). L'allumage de la lumière bleue le soir provoque également un décalage de l'activité locomotrice normalement observé à la transition jour/nuit (à ZT12 sur le graphique du haut). L'activité locomotrice des animaux MAOA KO diffère de celle des WT notamment en fin de nuit, où les WT présentent un pic d'activité pendant 3 à 4 heures juste avant l'allumage de la lumière bleue (à ZT22 en haut) ou du néon de l'animalerie (à ZT0 en bas).

A la fin des 8 semaines d'exposition à la lumière bleue le matin ou le soir, le comportement agressif des animaux MAOA KO et WT a été évalué par un test résident/intrus (**figure 34**). Ce test a été réalisé pour les deux groupes d'exposition entre ZT9 et ZT11. Les animaux MAOA KO et WT contactent la souris intruse au bout de 7 à 10 secondes indépendamment du protocole d'exposition (**figure 34 A**). Aucune différence significative n'est observée pour ce paramètre. En revanche, Les MAOA KO présentent une latence avant la 1<sup>ère</sup> attaque significativement plus basse (environ 60 secondes) comparée aux animaux WT (entre 400 et 500 secondes) (**figure 34 B**). Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les deux protocoles d'exposition au sein des deux génotypes.

Activité locomotrice des animaux WT et MAOA KO pendant l'exposition à la lumière bleue le matin

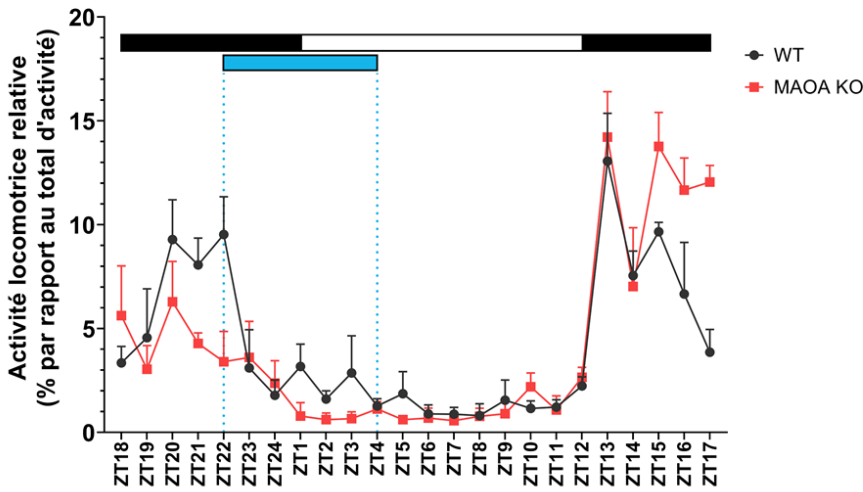
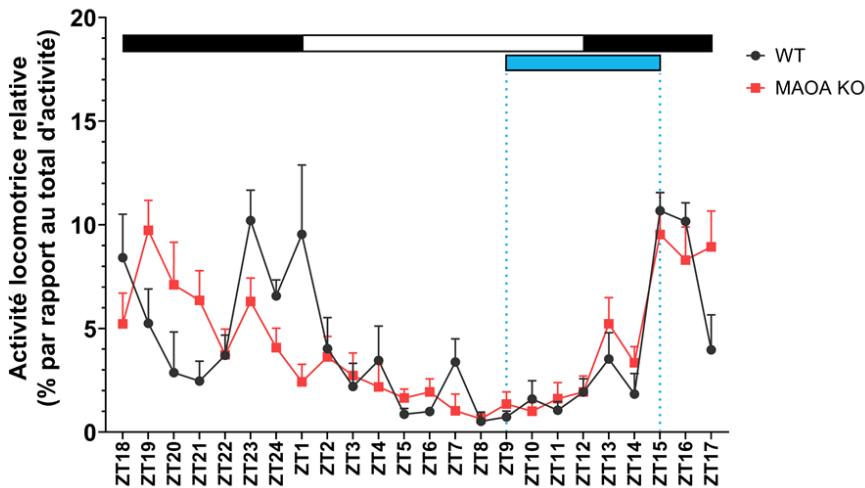
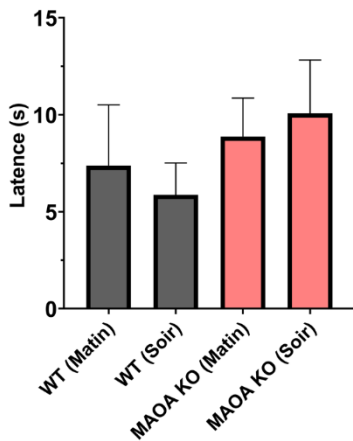


Figure 33 : Profils locomoteurs relatifs des animaux MAOA KO et WT après 8 semaines d'exposition à 6 heures de lumière bleue en début de journée ou en fin de journée.

Activité locomotrice des animaux WT et MAOA KO pendant l'exposition à la lumière bleue le soir



A Latence avant le 1<sup>er</sup> contact après une exposition à la lumière bleue le matin ou le soir



B Latence avant la 1<sup>ère</sup> attaque après une exposition à la lumière bleue le matin ou le soir

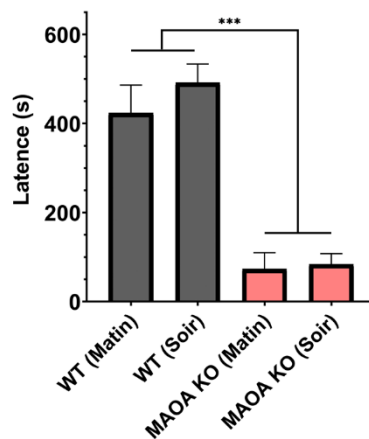


Figure 34 : Tests résident/intrus des animaux MAOA KO et WT après exposition à la lumière bleue le matin ou le soir pendant 8 semaines.

## ii. Exposition à la lumière blanc chaud ou bleue (2018)

Dans les protocoles d'exposition à la lumière bleue le matin versus le soir, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes d'exposition. Pour la suite de nos protocoles, nous avons donc décidé de maintenir des expositions à la lumière bleue ou enrichie en bleu le soir afin de rester au plus proche des conditions d'exposition chez l'Homme. Pour ce protocole, nous avons exposé de façon chronique (10 semaines) des souris WT et MAOA KO à des néons générant de la lumière blanc chaud ou bleue de ZT3 à ZT9, en raccourcissant la durée de la phase lumineuse (photopériode courte 9:15). L'objectif de ce raccourcissement était de diminuer le temps de repos de l'animal (qui a lieu durant le jour), pour mimer le raccourcissement de la période de sommeil provoqué par l'exposition aux écrans chez l'Homme.

Durant l'ensemble des expositions, l'activité locomotrice des animaux a été enregistrée (**figure 35**). Les profils locomoteurs relatifs des animaux MAOA KO et WT diffèrent de façon similaire à ce qui a été observé lors du protocole d'exposition précédent (**figure 33**). Alors que les WT présentent un pic d'activité en début de nuit (ZT9-ZT12) puis juste avant la transition jour nuit (ZT21-ZT24), l'activité des MAOA KO est concentrée dans la première partie de la nuit (ZT13-ZT18). L'activité locomotrice des animaux est fortement réduite pendant les créneaux d'exposition à la lumière bleue ou blanc chaud, indépendamment du génotype (**figure 36**). Cette réduction de l'activité locomotrice est comparable à celle observée pendant l'exposition aux plafonniers de l'animalerie en journée.

A la fin des 10 semaines d'exposition avec néons bleus ou blanc chaud, le comportement des animaux a été évalué par test résident/intrus (**figure 36**) – boîte éclairée/sombre (**figure 37**) juste avant l'allumage des néons, entre ZT1 et ZT3.

Lors de test résident/intrus (**figure 37**), aucune différence significative n'est observée concernant la latence avant le 1<sup>er</sup> contact (**figure 37 A**) entre les deux protocoles d'exposition ou entre les deux génotypes. En revanche, les animaux MAOA KO présentent une latence avant la 1<sup>ère</sup> attaque significativement plus basse (environ 10 secondes) comparées aux animaux WT (entre 400 et 500 secondes) (**figure 37 B**). Les animaux MAOA KO attaquent presque instantanément la souris intruse lors de son arrivée. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les animaux exposés à la lumière bleue ou à la lumière blanc chaud, indépendamment du génotype.

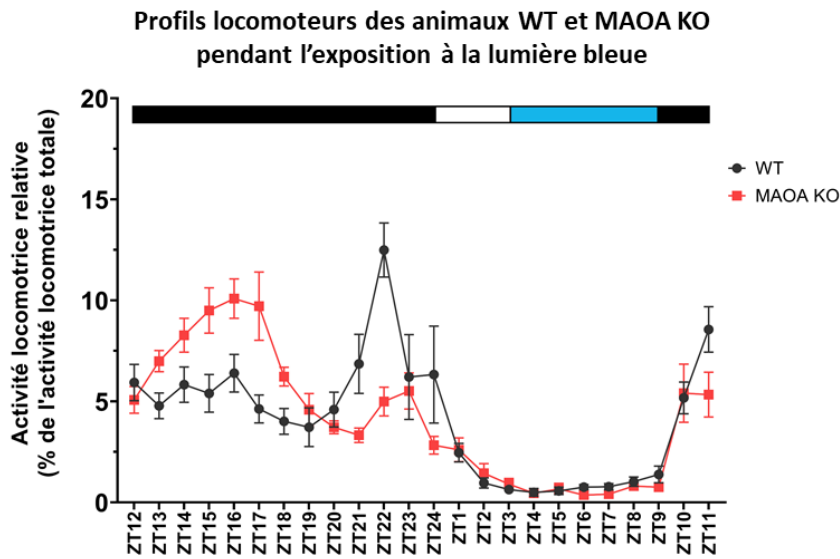
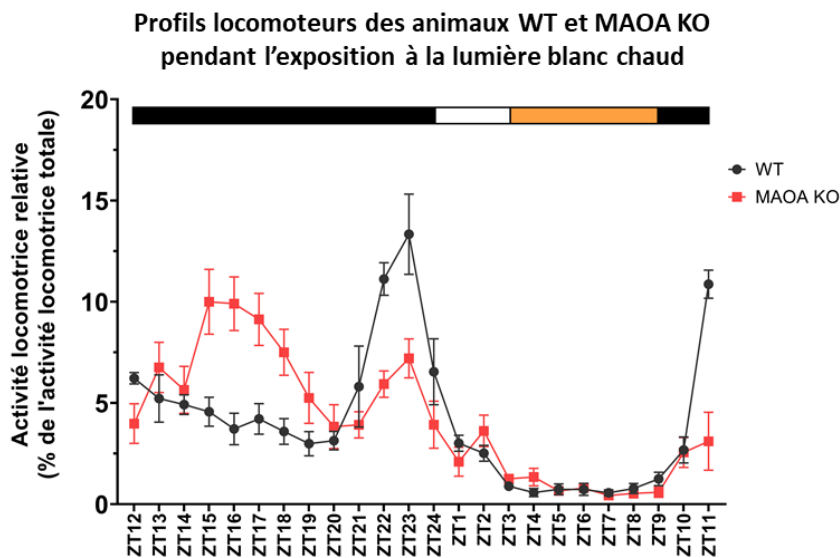


Figure 35 : Profils locomoteurs relatifs des animaux MAOA KO (en rouge) et WT (en noir) après 10 semaines d'exposition à 6 heures de lumière bleue ou blanc chaud en fin de journée.



**Activité locomotrice des animaux WT et MAOA KO pendant le créneau de lumière bleue ou blanc chaud**

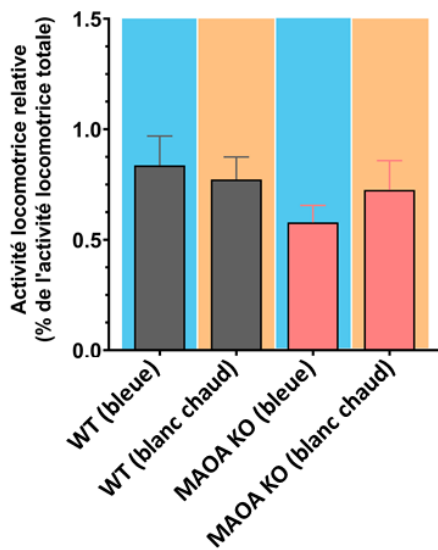
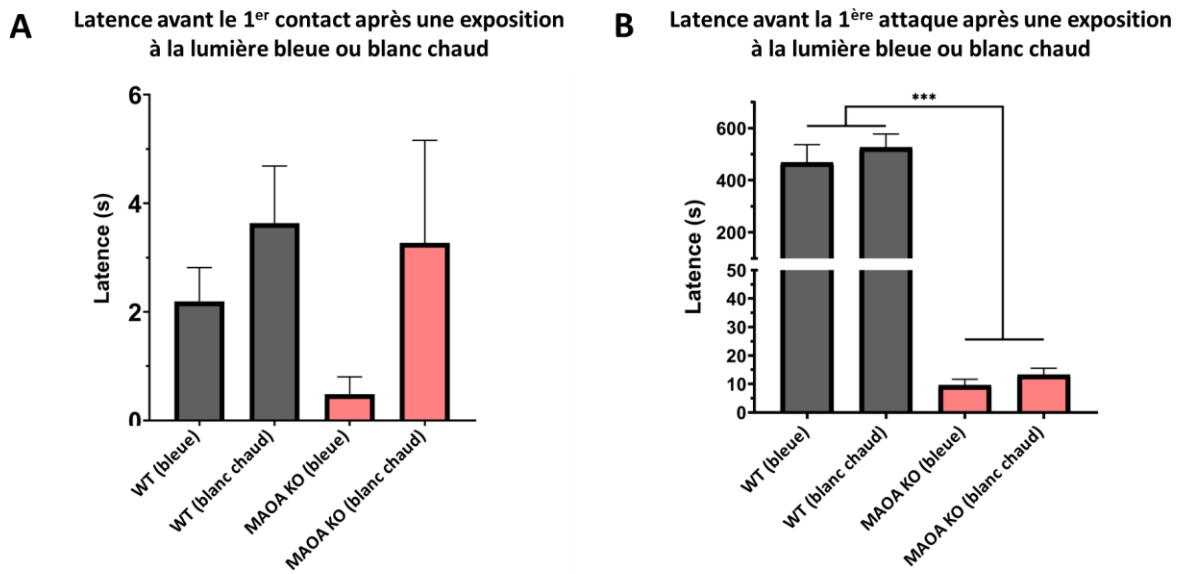


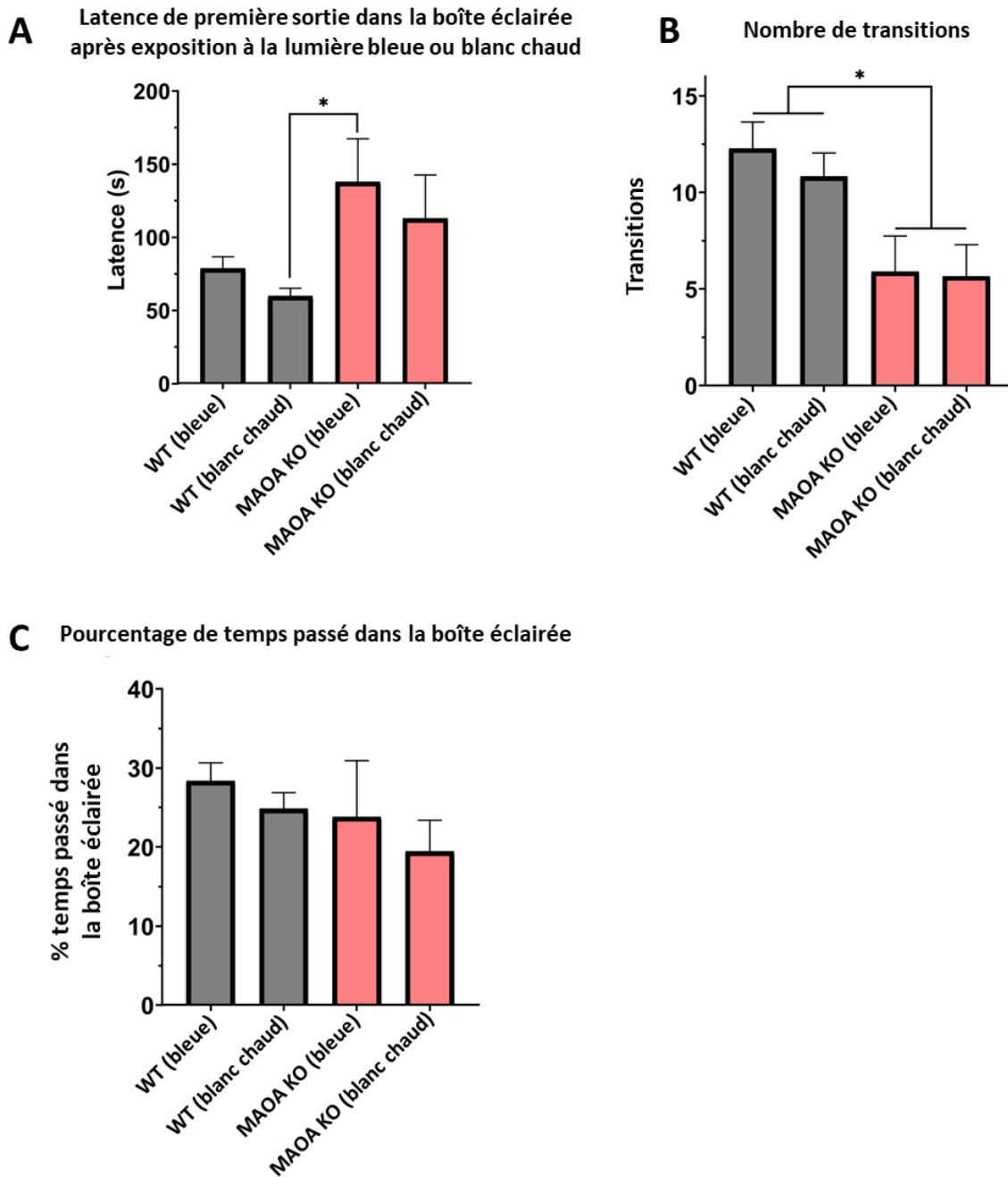
Figure 36 : Activités locomotrices relatives des animaux MAOA KO et WT pendant l'exposition à la lumière bleue ou blanc chaud.



**Figure 37 : Test résident/intrus des animaux MAOA KO et WT après exposition à la lumière bleue ou blanc chaud pendant 10 semaines.**

Lors du test boîte sombre/éclairée (**figure 38**), trois paramètres ont été mesurés : la latence avant la première sortie dans la boîte éclairée (**figure 38 A**), le nombre de transitions vers la boîte éclairée (**figure 38 B**) et le pourcentage de temps passé dans la boîte éclairée par rapport au temps total du test (**figure 38 C**). La comparaison entre les deux génotypes montre que les souris MAOA KO ont fait significativement moins de transitions (5 à 7 transitions) par rapport aux souris WT (11 à 13).

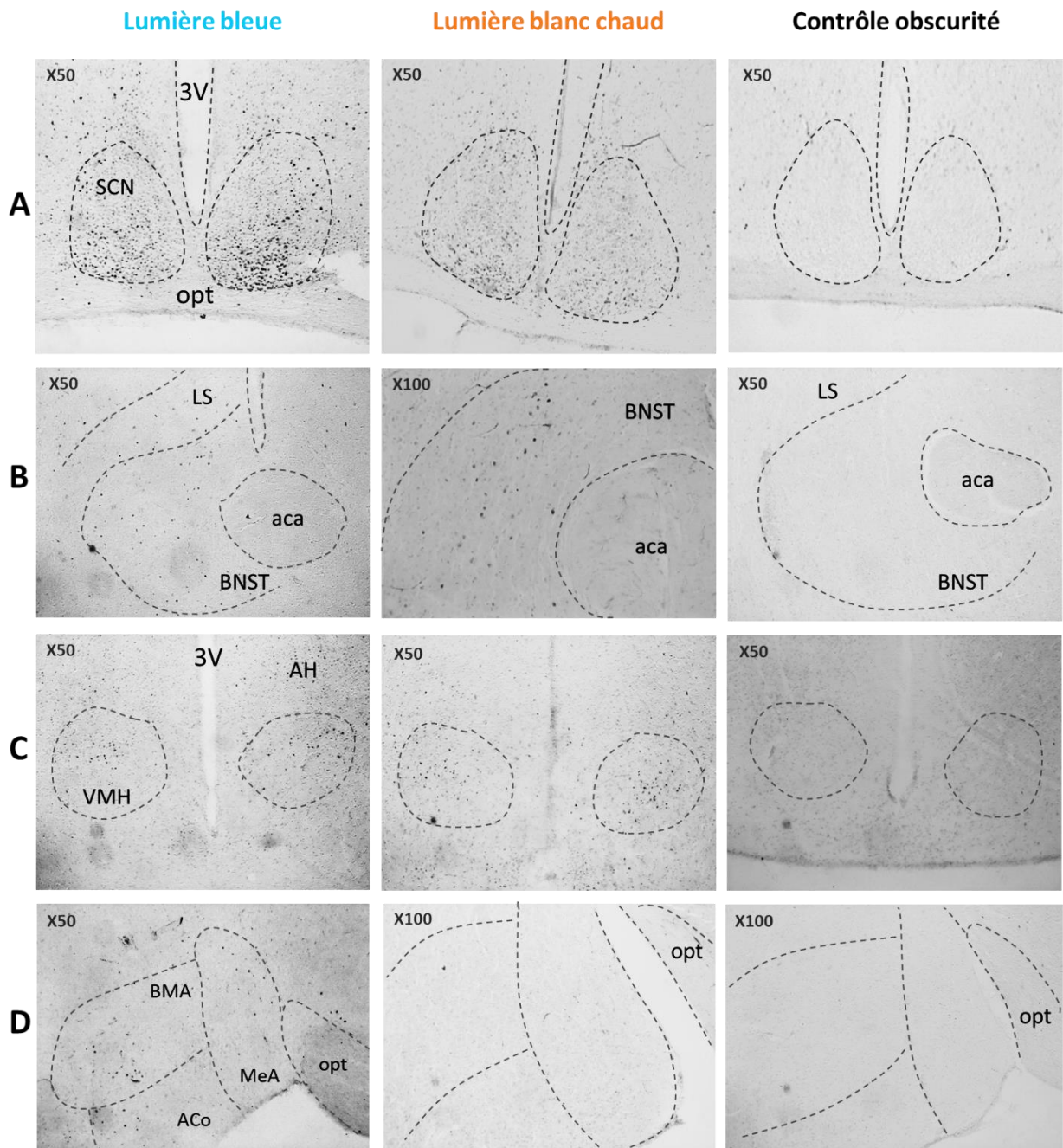
De plus, les animaux MAOA KO exposés à la lumière bleue présentent une latence de première sortie significativement plus élevée (environ 125 secondes) que les animaux WT exposés à la lumière blanc chaud (environ 50 secondes). Cependant, aucune autre différence significative au sein des 3 paramètres n'a été observée que ce soit entre les génotypes ou entre les protocoles d'exposition aux néons.



**Figure 38 : Test de la boîte éclairée/sombre des animaux MAOA KO et WT après exposition à la lumière bleue ou blanc chaud pendant 10 semaines.** (A) Les animaux WT ont tendance à montrer une latence de sortie moins élevée que les animaux MAOA KO, avec une différence significative entre le groupe WT (blanc chaud) et MAOA KO (bleue). (B) Les animaux MAOA KO réalisent significativement moins de transitions vers la boîte éclairée comparés aux animaux WT indépendamment du protocole d'exposition lumineuse (pas de différence significative). (C) Il n'y a pas de différence significative entre les génotypes ou entre les protocoles d'exposition aux néons en termes de pourcentage de temps passé dans la boîte éclairée.

À la suite des tests comportementaux, les animaux MAOA KO et WT ont été mis à mort 1 heure après une exposition aiguë aux néons lumière blanc chaud ou bleue. L'objectif était de visualiser l'activation des structures cérébrales en réponse à la lumière bleue ou blanc chaud par marquage de la protéine C-FOS : ce facteur de transcription s'exprime de manière précoce à la suite de l'activation du neurone. La protéine atteint un maximum d'expression 1 heure après l'activation puis n'est presque plus détectable après 3 heures. Cette propriété de marqueur d'activation en plus de la fenêtre temporelle d'expression de la protéine permet de visualiser les structures activées par la lumière environ 1 heure auparavant.

Après les marquages, plusieurs structures ont été comparées entre les différents génotypes en fonction de l'exposition. Aucune différence notable n'a été observée entre les MAOA KO et WT (non illustré) ni entre les différents protocoles d'exposition lumineuse (**figure 39**) à l'exception des SCN. Cependant par comparaison avec les animaux contrôles obscurité (non exposés de façon aiguë aux néons), plusieurs structures cérébrales expriment la protéine C-FOS en réponse aux expositions aiguës à la lumière bleue ou blanc chaud. Ainsi, on observe un nombre plus important de cellules C-FOS positives dans les SCN (**figure 39 A**) en condition lumière bleue comparée à la lumière blanc chaud et également du marquage dans plusieurs zones de l'amygdale (**figure 39 D**) : noyau basomédian (BMA), cortex olfactif de l'amygdale (ACo) et amygdale médiane (MeA) uniquement en lumière bleue. Par ailleurs, on observe des marquages au niveau de la partie ventrale du LS et dans la BNST (**figure 39 B**) autour de la commissure antérieure (aca) ainsi que dans le VMH (**figure 39 C**).



**Figure 39 : Immunomarquage de la protéine C-FOS dans les cerveaux de souris précédemment exposées de manière aiguë à 1 heure de néons lumière bleue, néons blanc chaud ou sans exposition. (A) hypothalamus antérieur (SCN, 3V). (B) LS et commissure antérieure (aca) avec la BNST en périphérie. (C) partie plus centrale de l'hypothalamus dans le VMH et l'hypothalamus antérieur (AH). (D) amygdale, à la hauteur de la MeA, du noyau basomédian (BMA) et de la partie corticale de l'amygdale (ACo).**



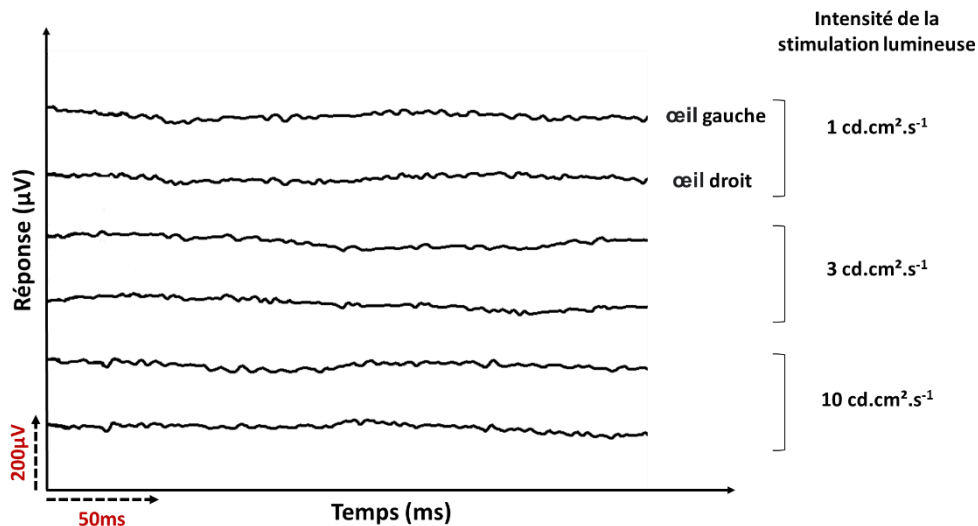
## 2. Protocole d'exposition avec Ruban LEDs (2020)

Les résultats des protocoles avec néons n'ont pas montré de différence notable au niveau des comportements de type agressif/anxieux selon une exposition lumière blanc chaud versus lumière bleue. Les marquages C-FOS démontrent par ailleurs des activations similaires dans plusieurs structures, ce qui complique la visualisation des effets spécifiques de la lumière bleue versus blanc chaud sous ces intensités lumineuses et ces créneaux d'expositions. En parallèle à la fin de l'année 2018, Todd et collaborateurs publient un article sur le contrôle circadien du comportement agressif (présenter dans la **partie IV.4.b** de l'introduction) (Todd et al., 2018). Ils démontrent que les souris présentent un comportement de type agressif maximum autour de ZT13.

En prenant en compte l'ensemble de ces données, nous avons décidé de passer à un système d'éclairage LEDs permettant un meilleur contrôle de l'intensité lumineuse et de la longueur d'onde. Le nouveau protocole a été construit sur une exposition de une semaine en cycle LD 12:12 avec une bande LEDs lumière blanc chaud à intensité modérée (50 lux), suffisante pour photoentraîner les animaux. L'exposition aux écrans a été mimée dans un groupe par un enrichissement en lumière bleue en fin de journée, qui se traduit par l'allumage d'une deuxième bande LEDs bleues à 50 lux de ZT10 à ZT12. Ce nouveau protocole devait ainsi permettre de visualiser l'effet d'un enrichissement en lumière bleue le soir versus sans enrichissement sur les comportements de type agressif/anxieux, en impactant le moins possible l'horloge. Les animaux ont été testés sur le créneau d'enrichissement en lumière bleue entre ZT10 et ZT12 juste avant le pic d'agressivité. Afin de se concentrer sur le rôle des ipRGCs, nous avons dans un premier temps réalisé ce protocole chez des souris C3H *rd1*. Chez certains animaux, nous avons procédé avant le protocole d'exposition à des injections intraoculaires d'une immunotoxine (UF008-SAP) permettant la délétion spécifique des ipRGCs. Cette délétion a pour objectif de mieux évaluer leur contribution dans l'activation des structures par une exposition aiguë à la lumière bleue, à l'aide d'un marquage C-FOS. Les tests comportementaux n'ont pas été réalisés chez les animaux ayant reçu l'injection intraoculaire d'immunotoxine, puisque leur capacité de photoentraînement est altérée, modifiant la composante circadienne du comportement de type agressif. Enfin, le protocole d'exposition ainsi que les tests comportementaux ont été également réalisés chez des animaux MAOA KO et WT littermates.

### a. Les souris C3H *rd1* n'ont plus d'activité visuelle

Avant le début des protocoles d'exposition aux LEDs, l'activité visuelle des C3H *rd1* a été évaluée par ERG, afin de confirmer la perte des bâtonnets et des cônes. Les animaux ont été placés 24h en DD pour adapter la rétine à l'obscurité, avant d'être exposés à un protocole scotopique (**figure 40**). Aucune des souris testées ne présentait de réponse électrophysiologique à la stimulation lumineuse, avec une absence totale d'onde a et d'onde b. Ce résultat indique l'absence de bâtonnets et de cônes fonctionnels, en cohérence avec la mutation *rd1*.

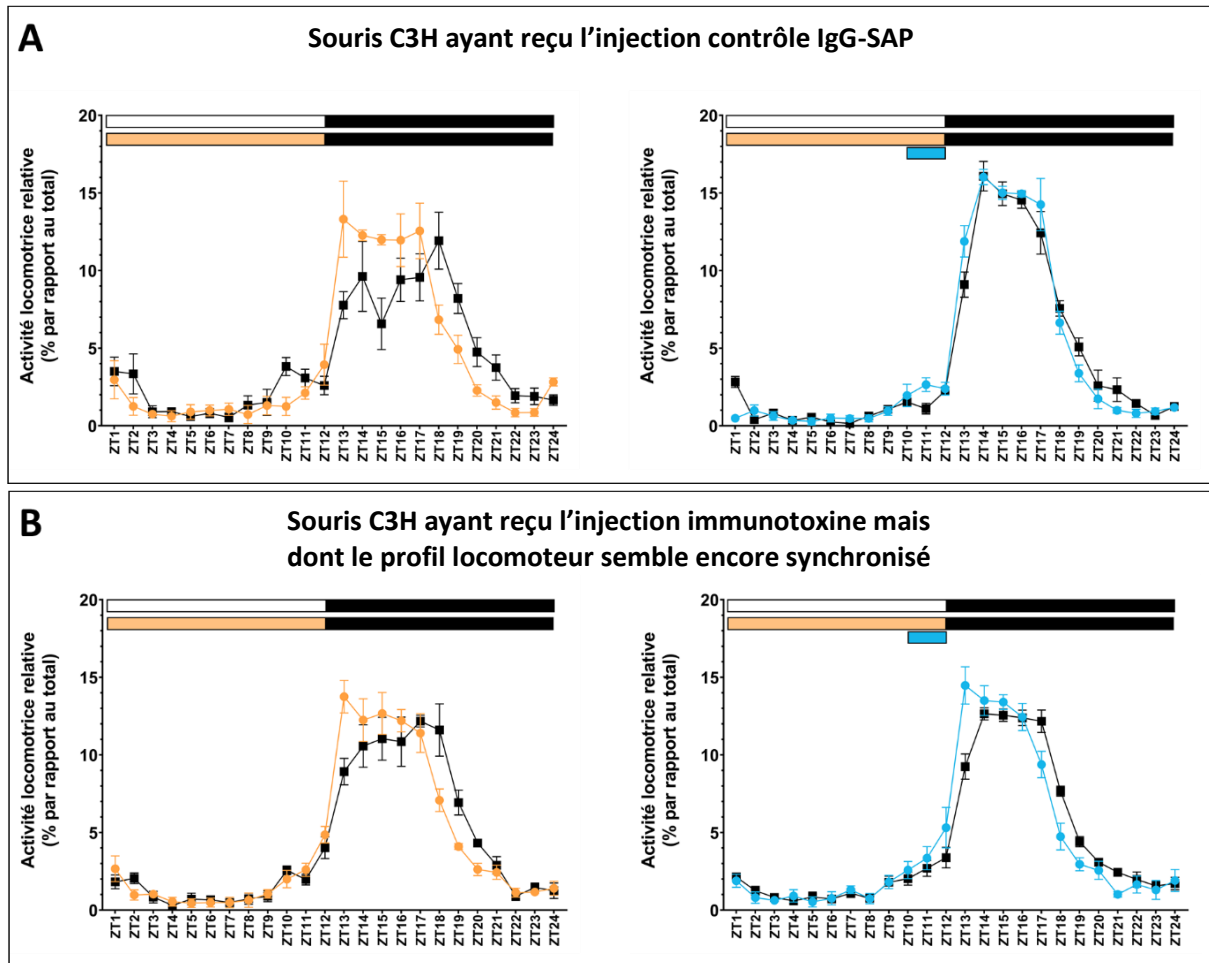


**Figure 40 : Tracé ERG d'un animal C3H *rd1* en protocole scotopique aux plus hautes intensités de stimulation.** Les animaux C3H *rd1* ne présentent ni onde **a** ni onde **b**, démontrant l'absence de réponse des photorécepteurs.

## **b. L'enrichissement en bleu entraîne peu de modification de l'activité locomotrice**

### **i. Animaux C3H *rd1***

L'activité locomotrice des animaux C3H a été enregistrée depuis les injections intraoculaires jusqu'aux tests comportementaux. Afin de mesurer l'impact d'un enrichissement en lumière bleue *via* les LEDs sur l'activité locomotrice, les profils d'activité locomotrice relatifs ont été comparés avant l'exposition aux LEDs (ligne de base, avec les plafonniers du Chronobiotron) puis pendant l'exposition aux LEDs (**figure 41**). Les animaux ayant reçu l'injection contrôle (IgG-SAP) (**figure 41 A**) sont synchronisés au cycle LD 12:12 que ce soit avant l'exposition aux LEDs (tracés noirs) ou pendant l'exposition aux LEDs (tracés en couleur). Pour les animaux qui ont été exposés aux LEDs blanc chaud sans enrichissement en lumière bleue (à gauche), l'exposition aux LEDs semble induire une légère augmentation de l'activité locomotrice en début de nuit (entre ZT12 et ZT18). En revanche, aucune différence n'est observée chez les animaux exposés aux LEDs avec enrichissement en lumière bleue comparée à la ligne de base (graphique de droite). Par ailleurs, l'activité locomotrice relative est légèrement augmentée (de 1 à 3%) à ZT11 pendant l'exposition aux LEDs bleue comparée à la ligne de base. Concernant les animaux ayant reçu l'injection d'immunotoxine (UF008-SAP) mais ne présentant pas d'activité en libre cours (**figure 41 B**), l'activité locomotrice relative semble augmentée en début de nuit (entre ZT12 et ZT17) pendant l'exposition aux LEDs indépendamment de l'enrichissement en lumière bleue. Ainsi, l'exposition aux LEDs blanc chaud à 50 lux est suffisante pour permettre le photoentraînement des souris C3H *rd1*. En somme, l'exposition aux LEDs avec ou sans enrichissement en lumière bleue ne semble pas affecter significativement le profil locomoteur des animaux.

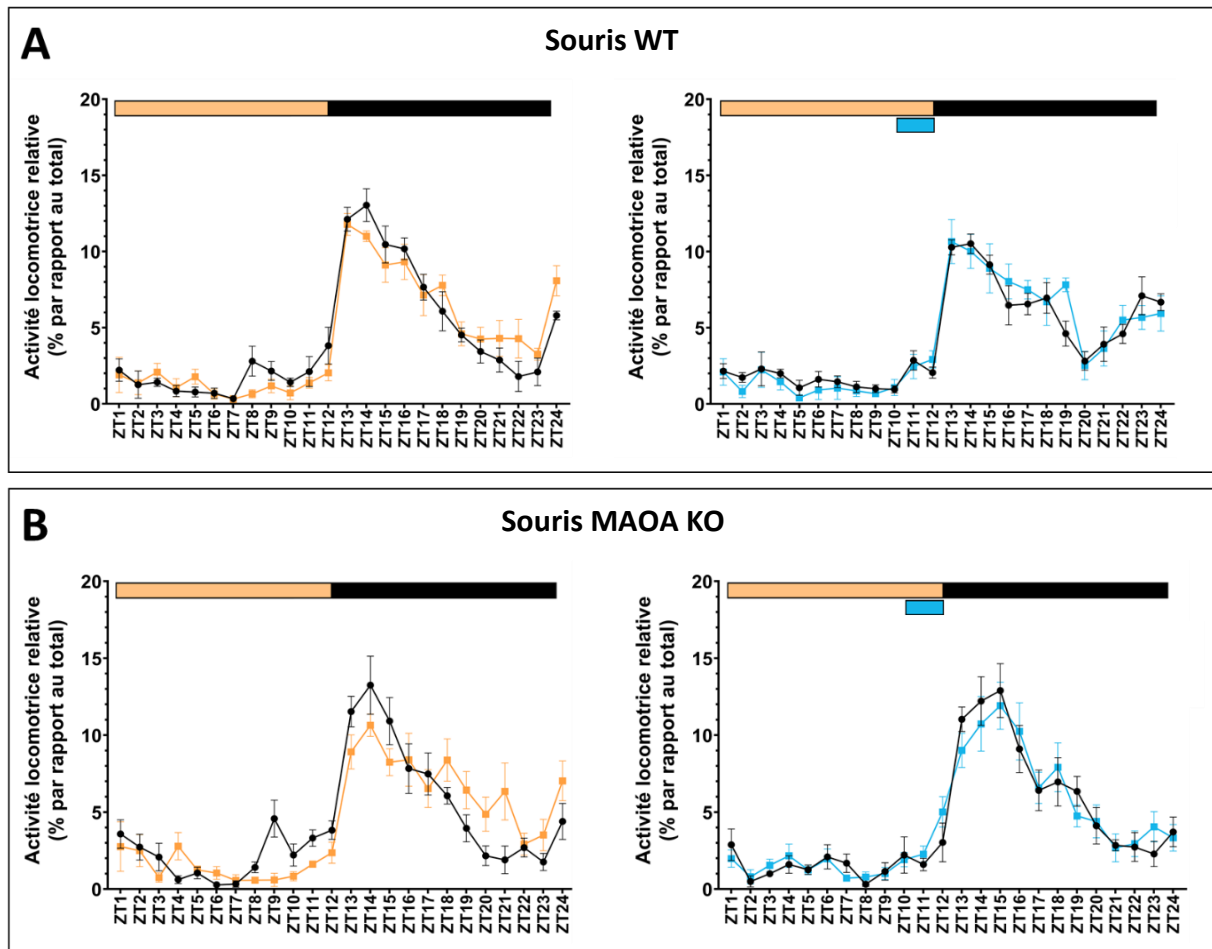


**Figure 41 : Profils d'activité locomotrice relatives des animaux C3H *rd1* avant puis pendant l'exposition aux LEDs. (A)** Animaux ayant reçu l'injection contrôle d'IgG-SAP sans enrichissement en lumière bleue (à gauche) ou avec enrichissement en lumière bleue (à droite). Les tracés noirs représentent l'activité de chaque groupe avant l'exposition aux LEDs (cycle LD 12:12 sous le plafonnier du Chronobiotron). Les tracés orange et bleu représentent respectivement l'activité relative pendant l'exposition au LEDs sans enrichissement ou avec enrichissement en lumière bleue. **(B)** Animaux ayant reçu l'injection d'immunotoxine (UF008-SAP) mais ne démontrant pas d'activité en libre cours. Les paramètres représentés sont identiques aux graphiques (A). Une exposition aux LEDs blanc chaud à 50 lux est suffisant pour permettre le photoentraînement des souris C3H *rd1*. L'exposition aux LEDs avec ou sans enrichissement en lumière bleue ne semble pas affecter significativement le profil locomoteur des animaux.

## ii. Animaux WT et MAOA KO

L'activité locomotrice relative des animaux MAOA KO et WT a également été comparée entre les expositions aux LEDs avec ou sans enrichissement en lumière bleue. Dans cette expérience, l'activité locomotrice relative des animaux a été comparée entre les 3 premiers jours (=début) et les 3 derniers jours (= fin) d'exposition aux LEDs (**figure 42**).

Chez les animaux WT (**figure 42 A**), les profils locomoteurs relatifs ne présentent pas de modifications significatives à la fin des expositions aux LEDs comparés au début d'exposition, indépendamment de l'enrichissement en lumière bleue. Chez les animaux MAOA KO exposés aux LEDs sans enrichissement (b) on observe une légère diminution de l'activité locomotrice en début de nuit (environ 2% entre ZT13 et ZT15) ainsi qu'une légère augmentation en fin de nuit (environ 2% entre ZT18 et ZT21). Aucune différence n'est observable pour le groupe MAOA KO exposé aux LEDs avec enrichissement en lumière bleue.

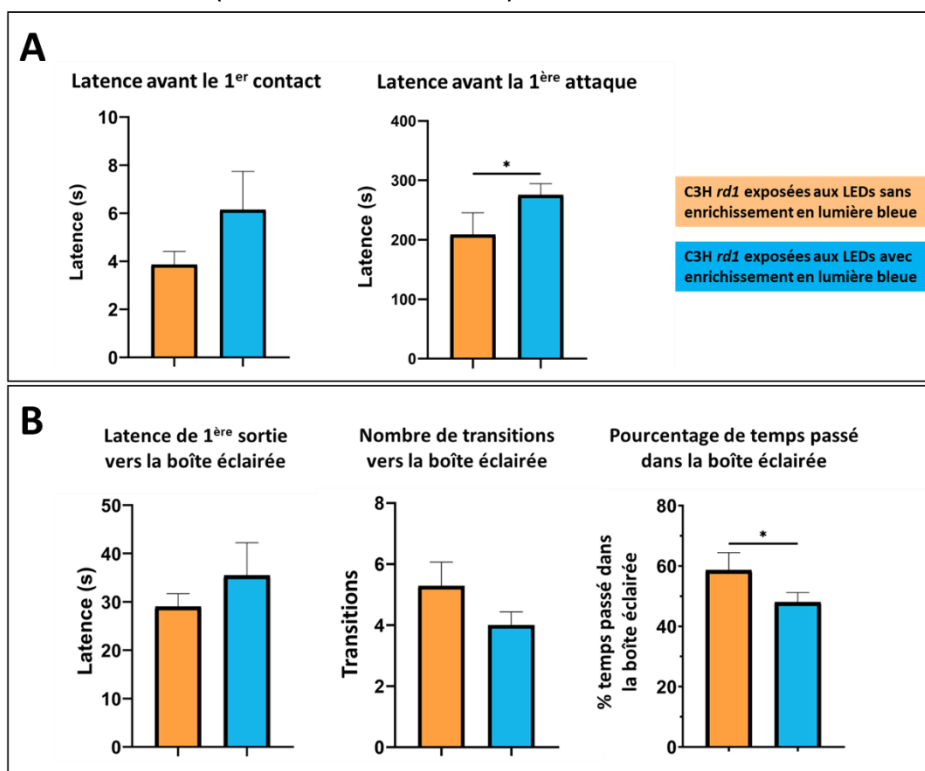


**Figure 42 : Profils d'activités locomotrices relatives des animaux WT et MAOA KO avant puis pendant l'exposition aux LEDs. (A) Animaux WT sans enrichissement en lumière bleue (à gauche) ou avec enrichissement en lumière bleue (à droite). Les tracés noirs représentent l'activité de chaque groupe au début de l'exposition aux LEDs (3 premiers jours). Les tracés oranges (sans enrichissement en lumière bleue) et bleus (avec enrichissement en lumière bleue) représentent l'activité locomotrice relative à la fin de l'exposition au LEDs (3 derniers jours). (B) Mêmes paramètres pour les animaux MAOA KO.**

### c. Modification des comportements de type anxieux/agressif selon l'exposition

#### i. Animaux C3H *rd1*

Les tests comportementaux ont été réalisés entre ZT10 et ZT12 uniquement chez les animaux ayant reçu l'injection intraoculaire contrôle (IgG-SAP), après une semaine d'exposition aux LEDs avec (histogramme bleu) ou sans enrichissement en lumière bleue (histogramme orange). Dans le test résident/intrus (**figure 43 A**), il n'y a aucune différence significative dans la latence avant le 1<sup>er</sup> contact. Les animaux exposés aux LEDs avec ou sans enrichissement entrent en contact avec la souris intruse au bout de 4 à 6 secondes en moyenne. En revanche, les animaux exposés à un enrichissement en lumière bleue présentent une latence avant la 1<sup>ère</sup> attaque significativement plus élevée (environ 290 secondes) comparée au groupe contrôle sans enrichissement (environ 200 secondes).

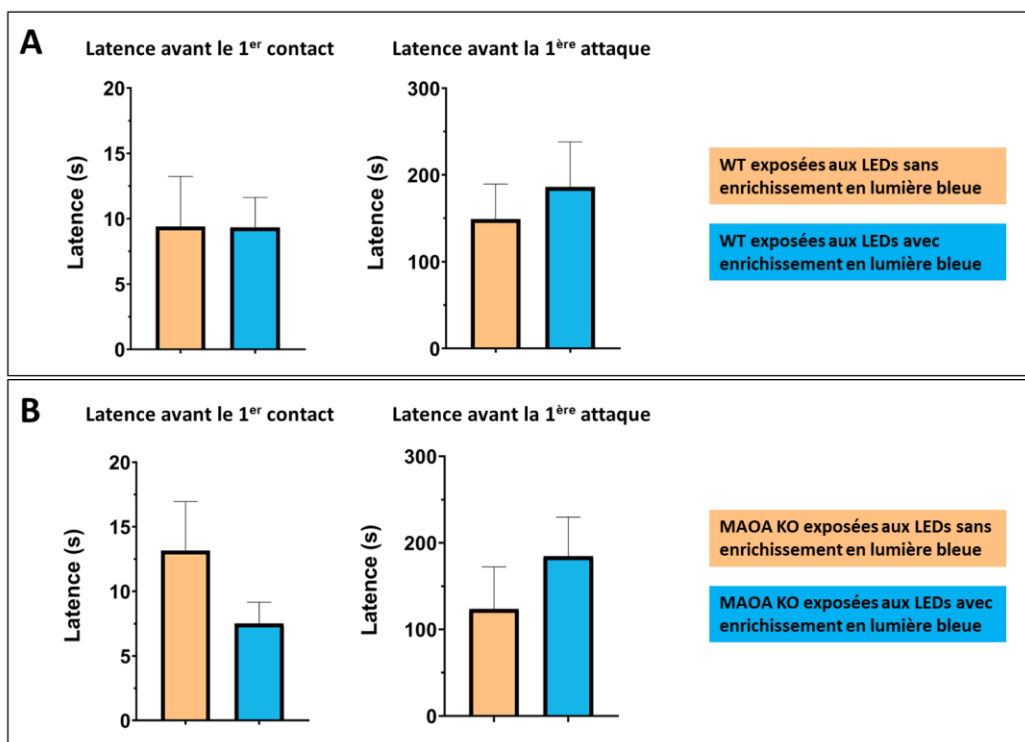


**Figure 43 :** Test résident/intrus (A) et boîte éclairée/sombre (B) chez les animaux C3H *rd1* exposés aux LEDs avec (en bleu) ou sans enrichissement en lumière bleue (en orange).

Lors du test de la boîte éclairée/sombre (**figure 43 B**), aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes d'exposition que ce soit pour la latence avant la première sortie (entre 30 secondes et 34 secondes en moyenne) ou le nombre de transitions vers la boîte éclairée (entre 4 et 5 transitions). En revanche, les animaux exposés à un enrichissement en lumière bleue présentent un pourcentage de temps passé dans la boîte sombre significativement plus bas (environ 45%) comparé au groupe contrôle sans enrichissement (environ 55%). Cependant, ces deux valeurs moyennes ne sont pas représentatives d'un comportement de type anxieux et sont très proches de 50%, pouvant indiquer l'absence d'effet photophobique procuré par la boîte éclairée.

## ii. Animaux WT et MAOA KO

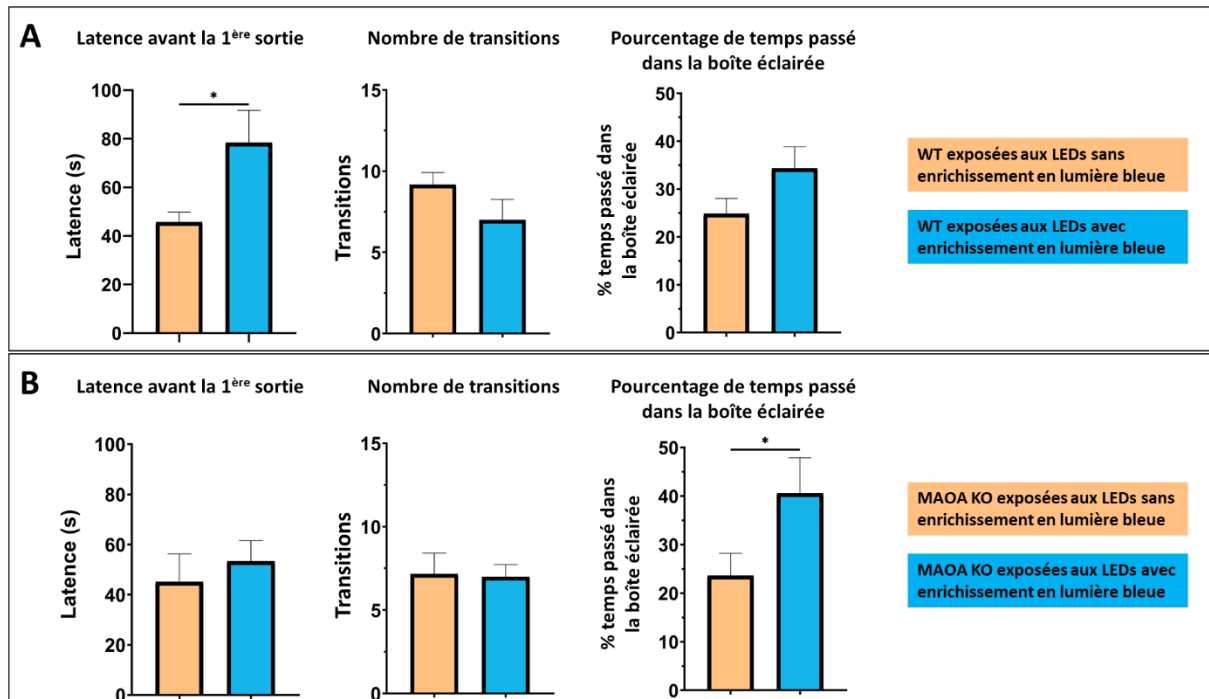
Les tests résident/intrus ont été réalisés entre ZT10 et ZT12 après 1 semaine d'exposition avec ou sans enrichissement en lumière bleue (**figure 44**). Aucune différence significative n'est observée dans la latence avant le 1<sup>er</sup> contact ou la latence avant la 1<sup>ère</sup> attaque que ce soit entre les différents génotypes ou les groupes d'exposition (**figure 44 A et B**). Cependant, les animaux exposés aux LEDs sans enrichissement en lumière bleue ont tendance à présenter une latence avant la première attaque plus basse (environ 150 secondes pour les WT (**figure 44 A**) et environ 120 secondes pour les MAOA KO (**figure 44 B**) comparés au groupe avec enrichissement en lumière bleue (environ 190 secondes pour les WT et MAOA KO). Ces résultats indiquent une tendance à la diminution du comportement de type agressif dans la condition enrichie en lumière bleue similaire à ce qui a été observé chez les animaux C3H *rd1*.



**Figure 44 : Tests résident/intrus chez les animaux WT (A) et MAOA KO (B).** Les tests ont été réalisés après une semaine d'exposition aux LEDs avec (histogramme bleu) ou sans (histogramme orange) enrichissement en lumière bleue.

Lors du test de la boîte éclairée/sombre (**figure 45**), les animaux WT exposés aux LEDs avec enrichissement en lumière bleue présentent une latence de première sortie vers la boîte éclairée significativement plus élevée (environ 75 secondes) comparée au groupe sans enrichissement (environ 45 secondes) (**figure 45 A**). Aucune différence n'est observée pour ce paramètre chez les animaux MAOA KO pour les deux groupes d'exposition (**figure 45 B**). Aucune différence significative n'est observée dans le nombre de transitions vers la boîte éclairée que ce soit entre les génotypes ou les groupes d'exposition. Cependant, les animaux MAOA KO exposés aux LEDs sans enrichissement en lumière bleue passent significativement moins de temps dans la boîte éclairée (environ 22%) comparé au groupe avec enrichissement

(environ 40%) (**figure 45 B**). Chez les WT, il n'y a pas de différence significative pour ce paramètre entre les deux groupes d'exposition, même si une forte tendance similaire à ce qui est observée chez les MAOA KO est notable. En somme, un enrichissement en lumière bleue semble induire un effet anxiolytique, qui est significatif chez les animaux MAOA KO.



**Figure 45 : Tests de la boîte éclairée/sombre chez les animaux WT (A) et MAOA KO (B).** Les tests ont été réalisés après une semaine d'exposition aux LEDs avec (histogramme bleu) ou sans (histogramme orange) enrichissement en lumière bleue.

#### d. Immunohistochimie chez les animaux C3H *rd1* exposés aux LEDs

##### i. L'activité locomotrice est liée au taux de délétion des ipRGCs

Avant les protocoles d'exposition aux LEDs, les souris C3H *rd1* ont reçu des injections intraoculaires d'immunotoxine (UF008-SAP) ou contrôle (IgG-SAP). L'injection d'immunotoxine a pour objectif de déléter spécifiquement les ipRGCs, afin d'évaluer les conséquences de la perte de ces cellules sur l'activation de différentes structures cérébrales en réponse à la lumière. Le suivi de l'activité locomotrice est un marqueur fiable de l'état du système mélanopsinergique, puisque la perte de ces cellules entraîne une activité libre cours de l'animal (Göz et al., 2008).

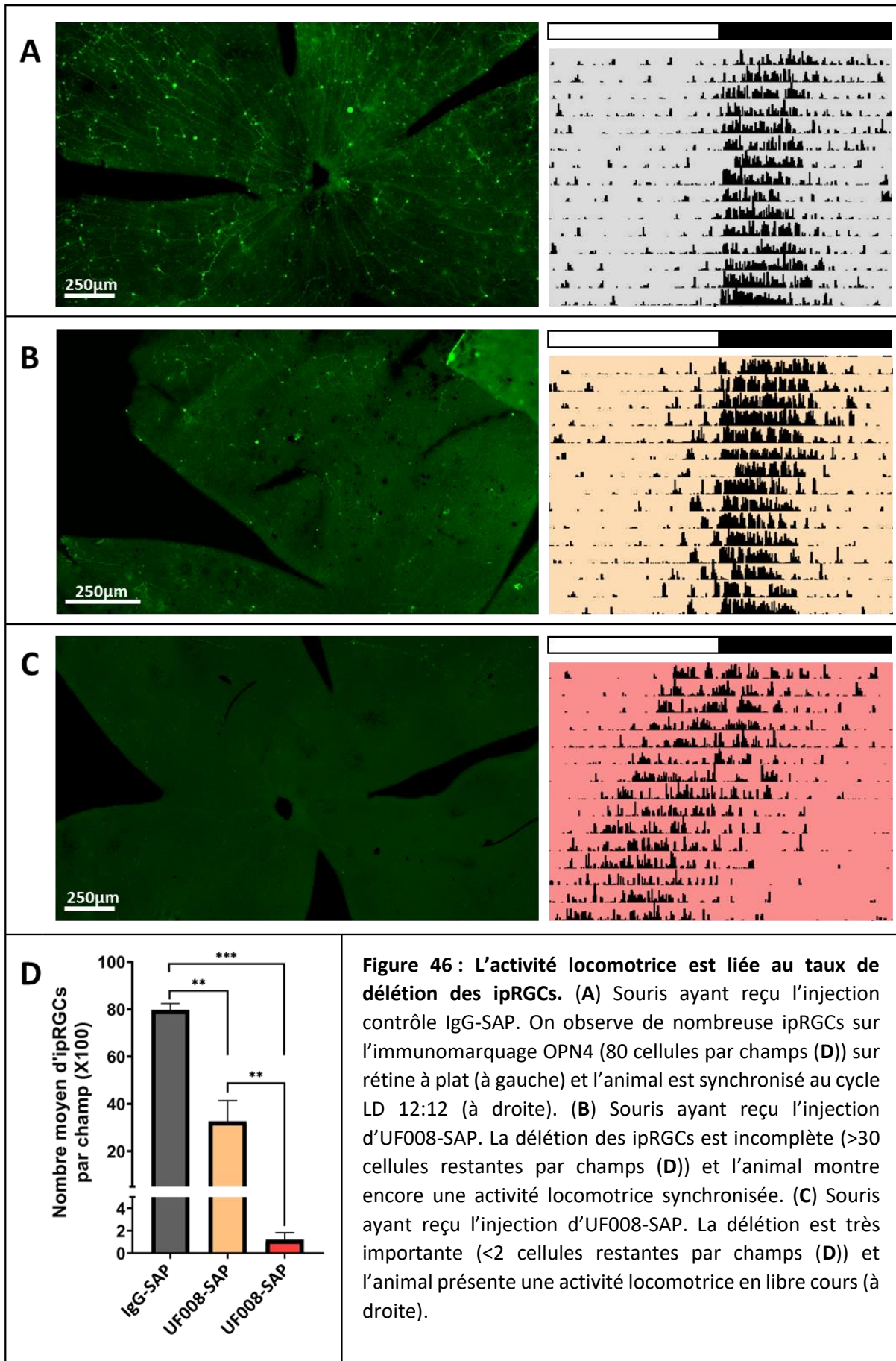
Les animaux ayant reçu l'injection contrôle IgG-SAP présentent un profil locomoteur synchronisé au cycle LD 12:12 et l'immunohistochimie sur rétine à plat révèle des ipRGCs normales (**figure 46 A**). Sur 16 souris ayant reçu l'injection d'UF008-SAP, 10 présentent encore un profil locomoteur synchronisé. L'immunomarquage montre qu'il reste encore des ipRGCs sur les rétines de ces animaux, mais en nombre réduit (**figure 46 B**). Pour la plupart des cellules restantes, on note une forte réduction du marquage avec une diminution importante du

diamètre de l'arbre dendritique comparé aux ipRGCs des animaux contrôles IgG-SAP. Enfin, 6 souris sur 16 ayant reçu l'injection d'UF008-SAP présentent un profil locomoteur en libre cours (**figure 46 C**). L'immunomarquage sur les rétines de ces animaux révèle une dégénérescence quasi-totale des ipRGCs.

Pour aller plus loin, un comptage des ipRGCs (par champ d'observation X100) a été réalisé sur les rétines des 3 conditions **A, B et C (figure 46 D)**. Les animaux qui se trouvent dans la condition (**B**) (10/16) possèdent environ 37,5% des ipRGCs (environ 30 cellules par champ) comparés aux souris contrôles (**A**) (environ 80 cellules par champ). Ces souris présentent donc un taux de délétion des ipRGCs inférieur à 70%. Alors que les animaux se trouvant dans la condition (**C**) (6/16) n'ont plus que 2,5% des ipRGCs comparé aux animaux contrôles. Le taux de délétion des ipRGCs dans ce groupe est donc supérieur à 90%.

Ainsi, Les marquages immunohistochimiques de la mélanopsine sur rétine à plat ont permis de confirmer le lien entre taux de délétion des ipRGCs et profils locomoteurs. La capacité des souris à photoentraîner est dépendante d'un nombre minimal d'ipRGCs inférieur à 30% du nombre total de cellule.





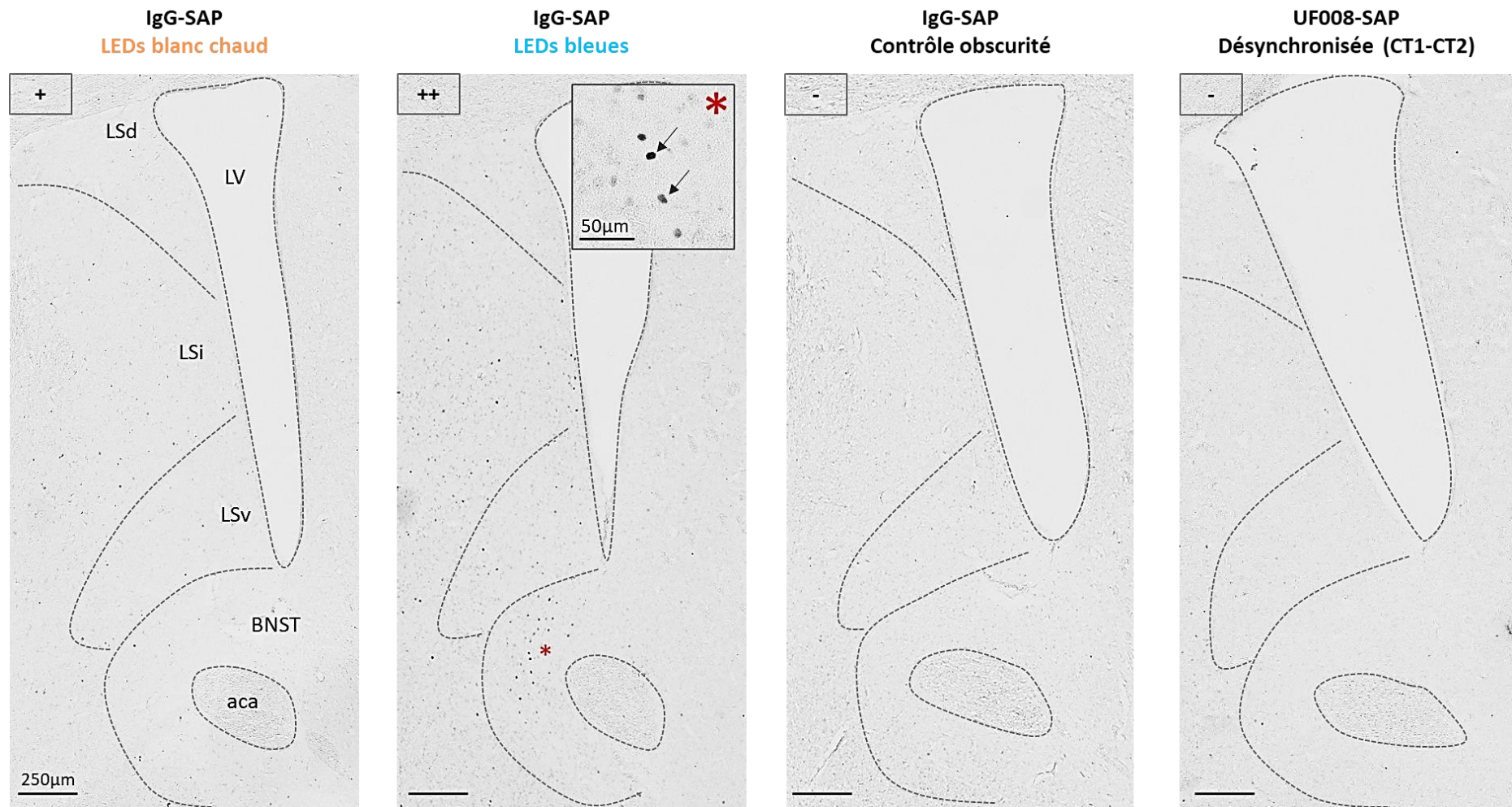
## ii. Marquage C-FOS dans les cerveaux des souris C3H *rd1*

L'objectif du marquage C-FOS est d'évaluer l'impact d'une exposition aiguë aux LEDs blanc chaud ou bleues sur l'activation des structures cérébrales liées aux comportements de type anxieux/agressif. A la fin des tests comportementaux, les animaux C3H *rd1* ont été placés pendant 24 heures en obscurité (DD) avant de recevoir un pulse de 1 heure de lumière à 50 Lux soit des LEDs blanc chaud soit des LEDs bleues seules (entre ZT10 et ZT11). Certains animaux n'ont pas reçu de pulse de lumière et constituent le groupe contrôle « obscurité ». Au bout d'une heure, les animaux ont été mis à mort. Ce protocole de mise à mort permet ainsi au marquage C-FOS d'être aussi représentatif que possible de l'impact de notre enrichissement en lumière bleue pendant la semaine d'exposition, aux ZT pendant lesquels les tests comportementaux ont été réalisés. Par ailleurs, les animaux qui ont reçu une injection d'UF008-SAP et qui présentent une activité en libre cours (désynchronisée du cycle LD 12:12) ont également été mis à mort suivant le même protocole. Le suivi de l'activité locomotrice a permis de déterminer que ces animaux ont été sacrifiés entre CT0 et CT4. Pour les animaux désynchronisés, les photos ont été prises à partir des tissus de souris sacrifiées entre CT1 et CT2, peu après le début de la phase d'activité endogène des SCN.

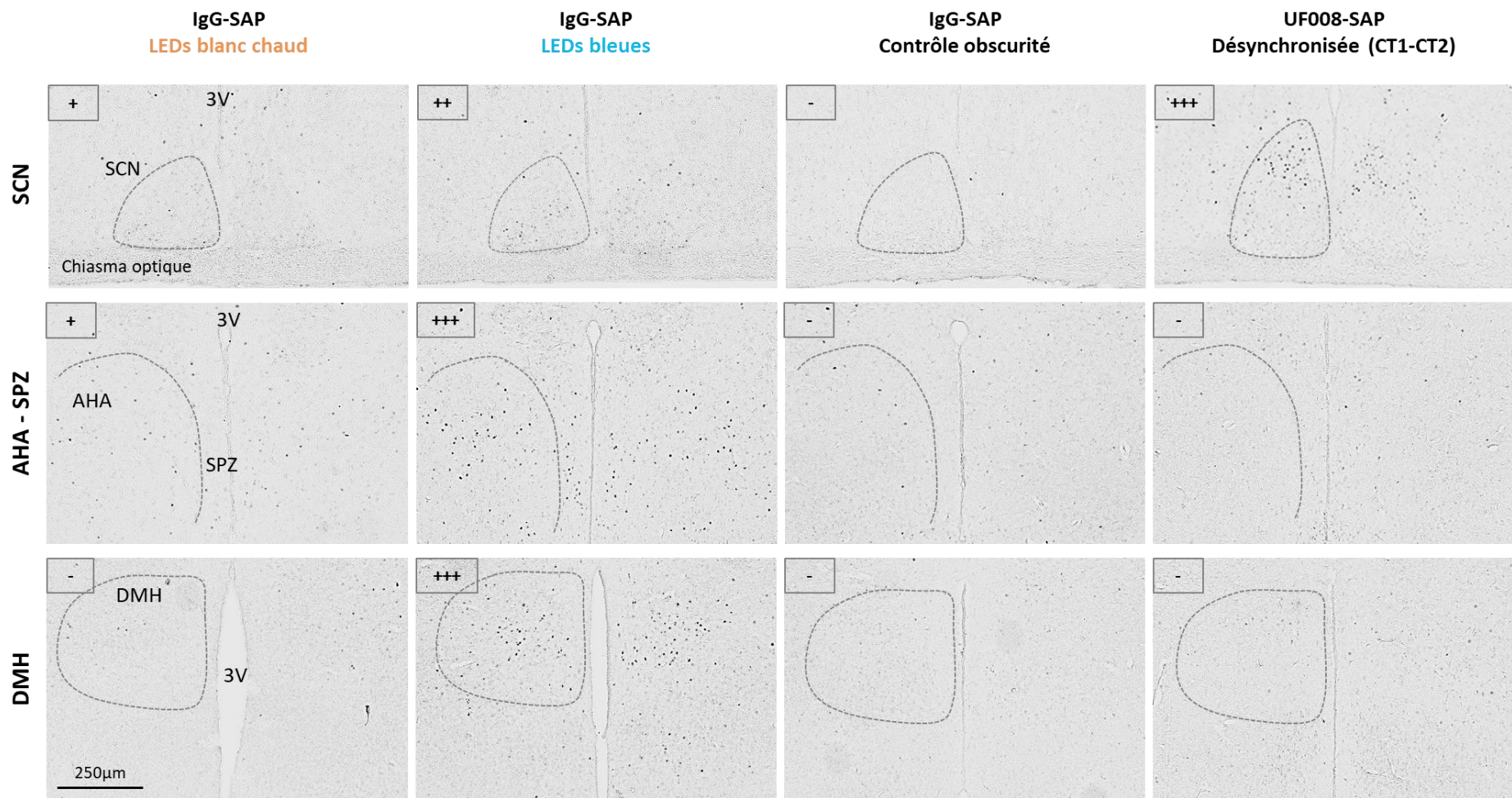
Les résultats du marquage C-FOS ont été analysés à partir de l'atlas de souris modifiées qui met en évidence les zones de présence des fibres des ipRGCs et les structures impliquées dans les comportements de type anxieux/agressif (**partie II.6.c.i** du matériels et méthodes). Cette analyse a pour but de visualiser les activations dans les structures liées aux ipRGCs, dont celles impliquées dans la régulation du comportement de type agressif.

Les premiers traitements (non illustrés) montrent qu'il n'y a pas de différence notable entre les 3 groupes (blanc chaud, bleu, obscurité) dans les aires préoptiques (VLPO, MPO), dans certaines zones du thalamus/épithalamus (LHb, PHb) ou encore dans la PAG. En revanche, d'autres zones semblent présenter des variations dans le marquage en fonction du protocole d'exposition. Les animaux exposés de façon aiguë aux LEDs bleues présentent du marquage C-FOS plus intense dans le LS et la BNST que les animaux exposés aux LEDs blanc chaud (**figure 47 partie 1**). Les animaux non exposés ou désynchronisés ne montrent aucun marquage. Par ailleurs, les animaux exposés aux LEDs bleues présentent également un marquage un plus important au niveau du *core* des SCN, de la SPZ et de l'AHA (**figure 47 partie 2**). On observe également un marquage au niveau du DMH chez les animaux exposés aux LEDs bleue qui est moins intense chez les animaux exposés aux LEDs blanc chaud. Dans le groupe contrôle obscurité, on observe un peu ou pas de marquage dans l'ensemble de ces zones. Chez les animaux désynchronisés, on observe un marquage important dans le *shell* des SCN. Au niveau thalamique (**figure 47 partie 3**), on observe un marquage similaire entre les groupes LEDs blanc chaud et bleues au niveau du vLGN, dLGN et de l'IGL. Les groupes contrôles et désynchronisés ne présentent aucun marquage dans cette zone. Enfin, il y a peu de différence entre les groupes au niveau de l'amygdale (MeA, BMA, ACo), avec seulement quelques neurones marqués dans le groupe LEDs bleues.

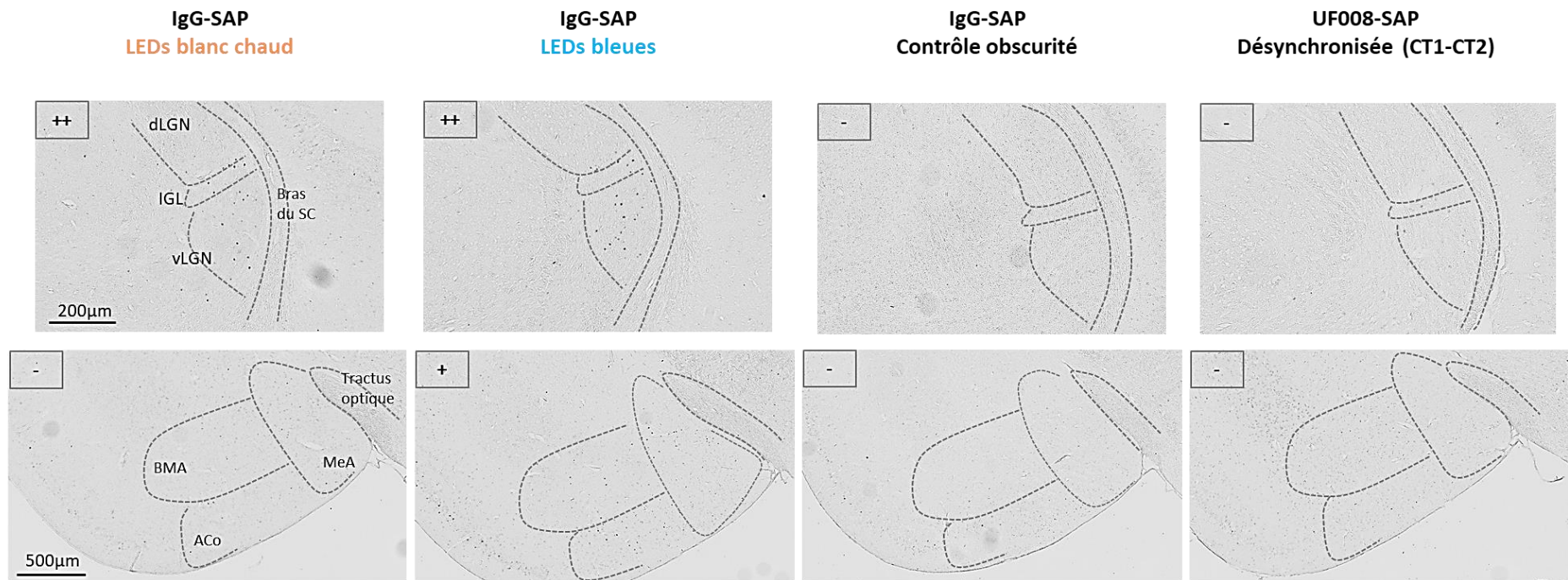
Ces résultats suggèrent que l'enrichissement en lumière bleue pendant les protocoles d'exposition a pu modifier l'activation de plusieurs structures (SPZ, AHA, LS, DMH) liées à la régulation des comportements, notamment de type anxieux/agressif.



**Figure 47 (partie 1) : Immunohistochimie de la protéine C-FOS sur les cerveaux de souris C3H *rd1*.** Les animaux ont été exposés de façon aiguë à 1 heure de LEDs blanc chaud, de LEDs bleues ou sans exposition (contrôle obscurité) avant d'être mis à mort. Les souris désynchronisées ont été sacrifiées entre CT1 et CT2. **Partie 1** : photos des marquages dans le septum latéral dorsal (LSd) intermédiaire (LSi) et ventral (LSv). En dessous, on trouve la BNST en périphérie de la commissure antérieure (aca). La quantité relative de marquage est indiquée sur chaque photo : pas de cellules marquées (-) à beaucoup de cellules marquées (+++).



**Figure 47 (partie 2) : Immunohistochimie de la protéine C-FOS depuis la partie antérieure de l'hypothalamus vers la partie postérieure.** Première ligne : marquage dans les SCN, entre le chiasma optique et le 3<sup>ème</sup> ventricule sur la partie médiane (3V). Deuxième ligne : marquage dans la partie dorsale de la SPZ et dans l'AHA. Troisième ligne : marquage dans l'hypothalamus postérieur au sein du DMH.

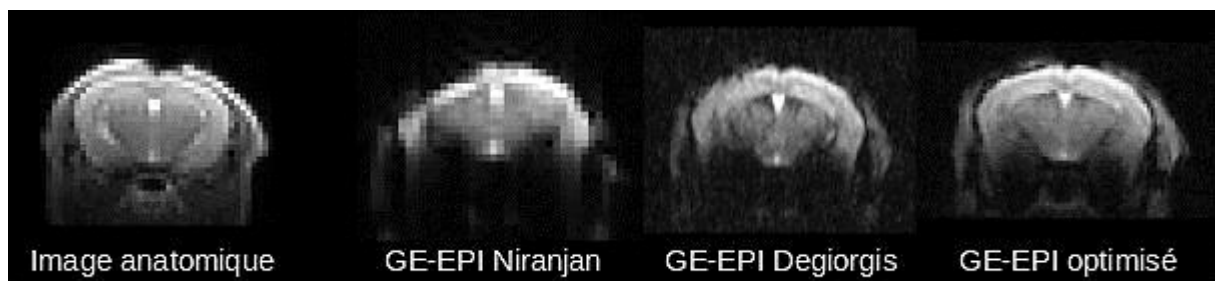


**Figure 47 (partie 3) : Immunohistochimie de la protéine C-FOS dans le thalamus et l'amygdale.** Première ligne : marquage dans les 3 parties du noyau géniculé latéral (dLGN, IGL et vLGN). Deuxième ligne : marquage dans l'amygdale médiane (MeA), noyau basomédian (BMA) et partie corticale de l'amygdale (ACo).

### 3. IRMf chez le petit animal

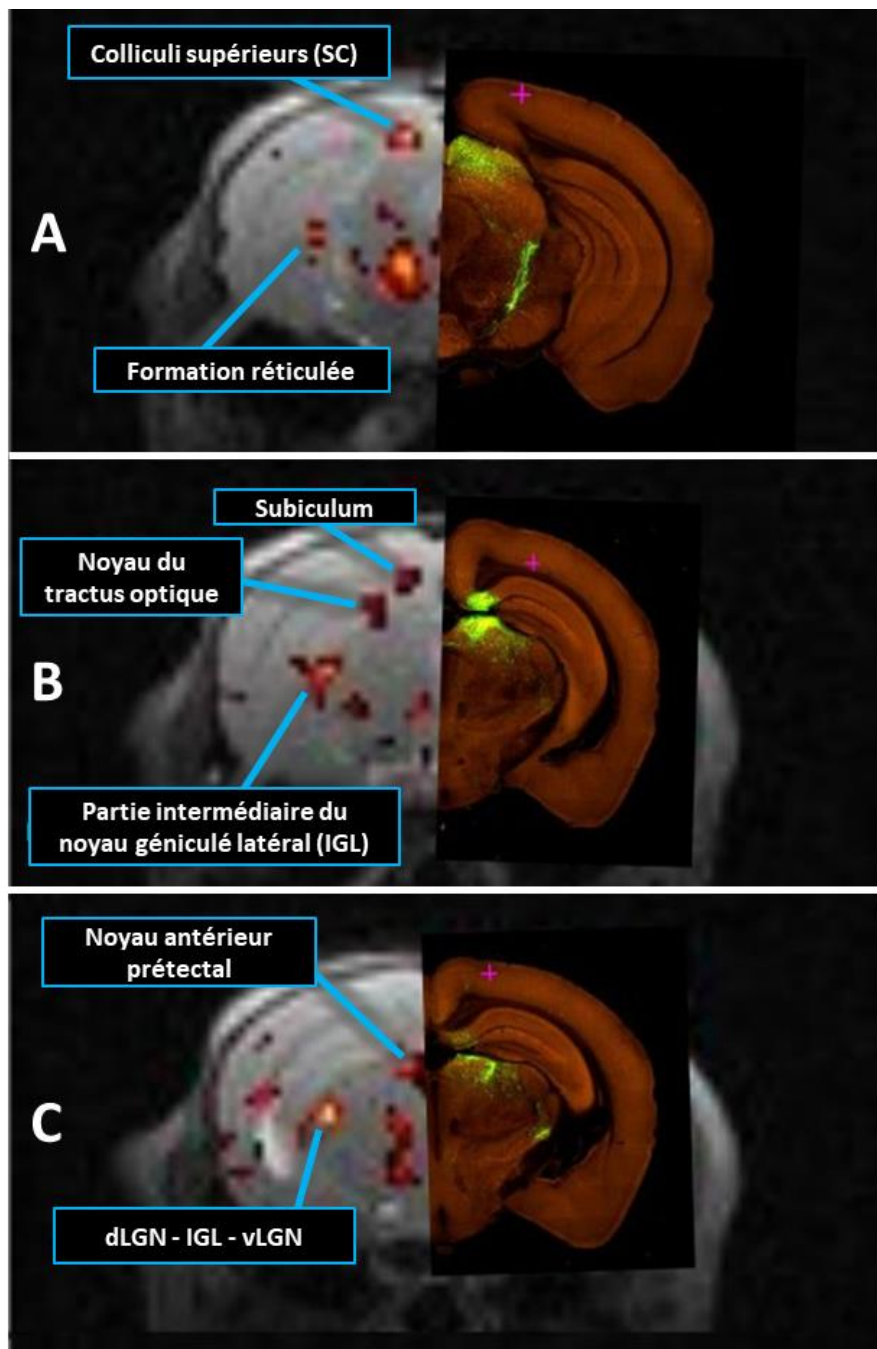
Les études préliminaires IRMf chez le petit animal ont été réalisées à partir de 2019 en collaboration avec le Dr. Chrystelle Po, responsable scientifique de la plateforme d'imagerie petit animal du laboratoire ICube (UMR7357, Strasbourg, France). Ces études préliminaires ont pour but sur le long terme de développer un protocole d'exposition aux LEDs en IRMf, afin d'étudier en temps réel l'activité des structures cérébrales liées aux comportements de type agressif/anxieux en réponse à la lumière. Il s'agissait ici dans un premier temps de tester la stimulation des voies visuelles chez la souris en IRMf *via* de la lumière blanche ou bleue (460nm) par fibre optique.

Les essais ont permis d'optimiser les paramètres de la séquence GE-EPI (**figure 48**) comparés aux précédents travaux qui sont la thèse de Laetitia Degiorgis (2019) et les travaux de Niranjana et collaborateurs ([Niranjana et al., 2016](#)).



**Figure 48 : Optimisation des paramètres de la séquence GE-EPI.** L'image anatomique a été acquise avec une séquence RARE (TR/TE : 5000/24 ms ; RARE factor : 11 ; 2 averages ; FOV : 35 x 35 x 0.5 mm ; Mtx : 96 x 96 ; TA : 1 minute et 20 secondes). L'image **GE-EPI Niranjana** correspond à une séquence GE-EPI avec les paramètres de l'article de Niranjana et al, 2016 (TR/TE : 2500/19 ms ; spectral width : 178.6 kHz ; FOV 30 x 30 x 0.5 mm ; mtx : 96 x 96). L'image **GE-EPI Degiorgis** correspond à une séquence GE-EPI avec les paramètres de la thèse de L. Degiorgis (TR/TE : 2000/15 ms ; spectral width : 400 kHz ; FOV 21.2 x 20 x 0.4 mm ; mtx : 147 x 147). L'image **GE-EPI optimisé** correspond à une séquence GE-EPI avec les paramètres suivants TR/TE : 2500/10 ms ; spectral width : 300 kHz ; FOV 20 x 20 x 0.5 mm ; mtx : 100 x 100). Adapté de [Laetitia Degiorgis \(2019\)](#) et [Niranjana et al., 2016](#).

Lors des premiers essais de stimulation en lumière bleue, aucun signal n'a pu être enregistré et ce malgré différents paramètres testés (résultats non montrés). En revanche, des expositions de deux minutes à la lumière blanche entraînent des activations dans de nombreuses structures cérébrales notamment liées au circuit visuel (**figure 49**). On trouve des activations dans les SC, dans la formation réticulée (**figure 49 A**) mais également dans le subiculum, le noyau du tractus optique et l'IGL (**figure 49 B**). Enfin, des activations importantes sont observées au niveau de l'APT et du LGN (**figure 49 C**). Ces données démontrent qu'il est possible de suivre en temps réel l'activation de plusieurs structures cérébrales en réponse à une stimulation des photorécepteurs de la rétine par la lumière.



**Figure 49 : Activité des structures cérébrales par IRMf pendant une stimulation à la lumière blanche (2 minutes).** La partie de gauche représente les zones cérébrales en activité (couleurs jaune et rouge) superposées sur l'image anatomique. La partie de droite est la coupe histologique correspondante indiquant le réseau visuel obtenu par Allen Institute après injection d'un traceur EGFP (en vert) dans le noyau du tractus optique. **(A)** zones en activité qui correspondent aux SC et à la formation réticulée. **(B)** zones en activité qui correspondent au subiculum, au noyau du tractus optique et à l'IGL. **(C)** zones en activité qui correspondent au noyau antérieur prétectal (APT) et aux différentes parties du noyau géniculé latéral. La stimulation à la lumière blanche est responsable de l'activité dans plusieurs zones impliquées dans le système visuel. Adapté du traçage des voies visuelles (expérience 158915602) chez des souris C57BL/6 ([www.brain-map.org/](http://www.brain-map.org/)), par l'institut Allen ([Brain-map.org](http://Brain-map.org)).

## DISCUSSION

---

### I. Les ipRGCs, actrices de l'intégration de la photopériode chez les souris C3H *rd1*

#### 1. Intégration de la photopériode par la rétine

Les souris C3H *rd1* présentent des ipRGCs comparables à celles des animaux possédant une rétine intacte, c'est-à-dire avec des cônes et des bâtonnets (Morin and Studholme, 2011) et elles constituent ainsi le seul système de photoréception chez cette souche (Zhang et al., 2017). Notre hypothèse est que la rétine, et notamment les ipRGCs, pourraient présenter des modifications en réponse à la photopériode et moduler en retour les informations lumineuses transmises au cerveau. Alors que la plupart des études portant sur les rythmes saisonniers se sont concentrées sur l'horloge et l'hypothalamus, notamment la mélatonine et la PT, il est possible que la rétine puisse constituer un maillon important dans l'intégration de la photopériode.

Pour répondre à cette question, nous avons dans un premier temps visualiser les ipRGCs par immunohistochimie sur rétine à plat et procédé à un comptage du nombre d'ipRGCs sur les rétines des souris exposées aux photopériodes courte et longue, afin de savoir si une modification pouvait s'opérer à ce niveau. Les résultats de ce comptage ont montré une tendance à la diminution du nombre de cellules mélanopsine-positives dans le groupe LP (environ 93 cellules par champ contre 102 cellules par champ dans le groupe SP). Ce phénomène pourrait être expliqué par une perte d'immunoréactivité de certaines cellules. Nous avons donc émis l'hypothèse que la photopériode pouvait affecter l'expression de la mélanopsine. En effet, une étude d'Hannibal et collaborateurs a démontré qu'une exposition extrême en LL provoquait une perte d'immunomarquage de la mélanopsine au niveau des dendrites en quelques jours (Hannibal et al., 2005). *A contrario*, selon la même étude, une exposition de plusieurs jours en DD induit une augmentation de l'immunomarquage au niveau des dendrites.

Afin de tester l'hypothèse d'un changement de l'expression de la mélanopsine quand la photopériode varie, nous avons procédé à une analyse de l'intensité relative du marquage au niveau des dendrites des ipRGCs chez nos souris C3H *rd1*. Cette analyse a montré une différence significative dans l'intensité relative du marquage, avec une intensité plus forte sur les rétines du groupe SP comparée au groupe LP. Ainsi, cette variation dans l'intensité du marquage pourrait expliquer la perte d'immunoréactivité de certaines cellules en réponse aux variations de la photopériode. À la suite de ces résultats, nous avons étudié le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la mélanopsine par RT-qPCR. Nous avons alors analysé à la fois l'expression de l'ARNm codant pour l'OPN4 totale (OPN4T), mais également l'expression des deux isoformes OPN4S et OPN4L. Cependant, nos résultats n'ont démontré



aucune différence significative dans l'expression de la mélanopsine et de ses isoformes entre les groupes LP et SP. Si les quantités d'ARNm de la mélanopsine et de ses isoformes ne montrent pas de variations entre les deux photopériodes dans notre étude, il est possible d'envisager que le profil d'expression de la protéine ait tout de même été modifié. En effet, nous avons mis à mort nos animaux à ZT3, ZT16, ZT20 et la répartition de ces points horaires était avant tout optimisée pour la détection de la mélatonine (sécrétion nocturne). En revanche, l'expression de l'ARNm de la mélanopsine augmente au fur et à mesure de la phase lumineuse pour atteindre son maximum au début de la nuit, avant de retomber progressivement (Hannibal et al., 2005; Mathes et al., 2007). Il n'est donc pas exclu que le pic d'expression soit de même amplitude en SP et en LP, mais que celui-ci soit plus soutenu dans le temps dans la condition SP. Ainsi, alors que la quantité d'ARNm mesurée est similaire entre les groupes LP et SP à ZT3 et à ZT16, le niveau d'expression d'ARNm a peut-être atteint un plateau plus rapidement en SP avant ZT16, augmentant la quantité totale de protéine.

De nombreuses études ont montré que l'expression de la mélanopsine était très probablement sous contrôle de l'horloge circadienne rétinienne (Bobu et al., 2013; Hannibal et al., 2013) mais était également régulée par la lumière, notamment *via* les bâtonnets/cônes et la sécrétion de dopamine dans l'INL (Sakamoto et al., 2005, 2004). Chez les souris C3H *rd1*, la perte de l'ONL exclue la possibilité d'une régulation provenant de l'activité des bâtonnets et des cônes. En revanche, l'horloge circadienne de la rétine semble toujours fonctionnelle dans l'INL et la GCL chez le modèle C3H *rd1* (Dinet et al., 2007). Ces données suggèrent que l'horloge circadienne dans la rétine pourrait continuer à jouer un rôle dans la régulation du système mélanopsinergique en réponse à la photopériode.

Une autre hypothèse serait que la transcription de la mélanopsine ne soit effectivement pas impactée par les variations de la photopériode mais qu'une modification s'opère à un niveau post-traductionnel. Cette hypothèse est soutenue par une étude d'Hannibal et collaborateurs, qui démontrent qu'un protocole d'exposition LL entraîne une diminution de la quantité de mélanopsine sans affecter son expression (Hannibal et al., 2013). Si les mécanismes de régulation de la mélanopsine à un niveau post-transcriptionnel ne sont pas totalement élucidés, un candidat potentiel de cette régulation pourrait être la mélatonine. Il a été montré que la mélatonine était synthétisée de façon rythmique dans la rétine (Gianesini et al., 2015; Tosini and Menaker, 1996; Yu, 1981) et que ses récepteurs étaient notamment exprimés dans l'INL et dans la GCL (Dubocovich and Markowska, 2005; Laurent et al., 2017). De plus, l'expression de l'AANAT dans la rétine est sensible aux variations de la photopériode, suggérant que la libération de mélatonine dans la rétine varie en fonction de la longueur du jour (Engel et al., 2004). L'étude de Dinet et collaborateurs en 2007 a montré chez des souris C3H *rd1* que malgré l'absence de rythmicité dans l'expression des protéines CRY2 et PER1, la quantité des deux protéines varie de façon rythmique entre le jour et la nuit au sein de l'INL et de la GCL (Dinet et al., 2007). Cette rythmicité n'est pas présente chez la souris C57BL/6 déficiente en mélatonine. Les auteurs suggèrent alors que la mélatonine pourrait jouer un rôle important dans la régulation post-traductionnelle de plusieurs protéines horloge, notamment

à travers la régulation de leur adressage dans différents compartiments cellulaires (Dinet et al., 2007). De plus, les récepteurs de la mélatonine sont exprimés par les ipRGCs de type M1/M4 et l'application de mélatonine modifie l'activité électrophysiologique des M4 (W Pack et al., 2015; Sheng et al., 2015). Bien que le mécanisme par lequel la mélatonine module la réponse des ipRGCs ne soit pas connu, il est probable que celui-ci implique la phosphorylation de la mélanopsine. En effet la mélatonine, *via* ses récepteurs, diminue l'activité de la PKA (Masana and Dubocovich, 2001; Pandi-Perumal et al., 2008), alors que cette kinase est décrite comme régulatrice de l'excitabilité de la mélanopsine (Blasic et al., 2012b; Stachurska and Sarna, 2019). Par ailleurs, Pack et collaborateurs suggèrent également que la phosphorylation de la mélanopsine pourrait constituer un mécanisme menant à la dégradation de la protéine (W Pack et al., 2015; Varedi et al., 2010). Ainsi, si la sécrétion de mélatonine dans la rétine varie en réponse à la photopériode (Engel et al., 2004), elle pourrait réguler l'excitabilité des ipRGCs et la dégradation de la mélanopsine en modulant la phosphorylation de la protéine (W Pack et al., 2015; Stachurska and Sarna, 2019). En plus de la mélatonine, la dopamine pourrait également jouer un rôle dans les modifications de la mélanopsine en réponse aux variations de la photopériode. L'étude de Van Hook et collaborateurs chez le rat montre que l'application de dopamine diminue la réponse intrinsèque des ipRGCs de type M1 à une stimulation lumineuse (Van Hook et al., 2012). De façon très intéressante, ils montrent que cette diminution peut être corrigée par l'application d'un inhibiteur de la PKA. La dopamine régulerait donc l'activité de la mélanopsine de façon similaire à la mélatonine, *via* des processus de phosphorylation.

Premièrement, nous avons ces deux études qui démontrent des effets opposés de la mélatonine et de la dopamine sur la réponse des ipRGCs, très probablement *via* la phosphorylation de la mélanopsine par la PKA (Blasic et al., 2012a; W. Pack et al., 2015; Van Hook et al., 2012). Deuxièmement, nous savons que la mélatonine et la dopamine sont sécrétées de manière rythmique en antiphase au sein de la rétine: la mélatonine est libérée durant la nuit et inhibe la sécrétion de dopamine, qui est alors majoritairement libérée le jour (Doyle et al., 2002; Pierce and Besharse, 1988; Tosini and Menaker, 1996; Witkovsky, 2004).

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la rétine puisse intégrer la photopériode à travers son horloge circadienne qui régule en retour la sécrétion de mélatonine et de dopamine. En SP, le raccourcissement de la durée du jour entraînerait à la fois l'augmentation de la libération de mélatonine et la diminution de la sécrétion de dopamine, qui favoriseraient la stabilité de la mélanopsine en augmentant l'excitabilité des ipRGCs. En LP, l'augmentation de la libération de dopamine par raccourcissement de la phase de libération de la mélatonine entraînerait l'effet inverse, menant à la dégradation de la mélanopsine et à une diminution de l'excitabilité des ipRGCs. Ce phénomène serait d'autant plus amplifié par les synapses *en passant* des M1 avec les ACs qui favoriseraient la libération de dopamine le jour (Dkhissi-Benyahya et al., 2013; Prigge et al., 2016). Ce modèle d'intégration de la photopériode par la rétine (**figure 50**) constituerait un mécanisme adaptatif qui lui permettrait d'ajuster la sensibilité de ses systèmes de photodétection. Il est essentiel pour les organismes de

continuer à entraîner leurs rythmes biologiques, alors que l'intensité, la quantité et la composition spectrale de la lumière sont significativement modifiées en hiver (Thorne et al., 2009). Cette modulation de l'excitabilité des ipRGCs, avec une sensibilité plus importante en SP comparée à la LP, pourrait permettre d'assurer une lecture optimale des variations de lumière dans l'environnement au cours de l'année. Cette hypothèse est cohérente avec les variations saisonnières du PIPR chez l'Homme, qui démontrent une sensibilité plus importante du système mélanopsinergique en hiver comparé à l'été (Kawasaki, 2017; Kawasaki et al., 2018). A l'inverse, l'absence d'adaptation du système mélanopsinergique en hiver pourrait mener à une hyposensibilité et contribuer au développement du SAD (Roeklein et al., 2013, 2009).

## 2. Modifications de l'activité locomotrice photopériode-dépendante

Au sein des SCN, la cinétique d'expression des gènes horloges ainsi que le profil électrophysiologique sont modifiés en réponse à des variations de la photopériode (Rohling et al., 2006; Tournier et al., 2009; VanderLeest et al., 2009). Certaines études ont alors assimilé les SCN à une « horloge saisonnière » (Coomans et al., 2015) et ont montré que ces réponses au sein des SCN étaient associées à des modifications dendritiques, impliquant très probablement des mécanismes de neuroplasticité (Mendoza-Viveros et al., 2017; Porcu et al., 2018; Tackenberg and McMahon, 2018). Ces données indiquent que les SCN intègrent la photopériode à travers des modifications anatomo-fonctionnelles.

L'activité locomotrice constitue une des principales sorties comportementales de l'horloge et reflète indirectement l'activité de celle-ci (Houben et al., 2009). Chez les souris C3H *rd1*, l'activité locomotrice a donc été enregistrée durant l'ensemble du protocole d'exposition aux photopériodes courte et longue. Alors que l'intégration de la photopériode au sein des SCN serait un processus progressif (Rohling et al., 2006), notre hypothèse est que les souris pourraient présenter une modification progressive de l'activité locomotrice. Celle-ci reflèterait une intégration de la photopériode au niveau central. Tandis que la quantité totale d'activité locomotrice n'est pas significativement différente entre les deux groupes, la répartition de l'activité locomotrice est progressivement modifiée entre les deux groupes au fur et à mesure de l'exposition. Les animaux exposés en LP présentent un profil locomoteur stable avec un pic d'activité en début de nuit sur les 8 semaines d'exposition alors que chez les animaux du groupe SP, le profil locomoteur a tendance à devenir biphasique, avec un premier pic d'activité en début de nuit et un deuxième pic d'activité au milieu de la nuit.

Nos résultats concomitants de ceux de l'étude de Metzger et collaborateurs, (Metzger et al., 2019), reflètent pour la première fois des modifications progressives de l'activité locomotrice chez la souris, en réponse à des variations de la photopériode. Alors que ces modifications de l'activité locomotrice pourraient être en partie attribuées à une intégration progressive de la photopériode dans les SCN, l'étude de Metzger et collaborateurs démontre que ces modifications ne sont pas présentes chez les animaux déficients en mélatonine (C57BL/6). Il

est envisageable que le profil de sécrétion de la mélatonine soit responsable du modelage de l'activité locomotrice. Une étude de Klante et collaborateurs chez le rat a démontré que le profil locomoteur des animaux pouvait être associé au profil de sécrétion de la mélatonine (Klante et al., 1999). Nous pourrions expliquer ces effets *via* une signalisation *feedback* de la mélatonine sur le SCN. En effet, des études chez des animaux MT1/MT2 KO ont démontré que la mélatonine était impliquée dans la régulation de l'activité électrique des SCN et dans la modulation de l'entrée PACAPergique de la rétine vers l'horloge (Jin et al., 2003; Stehle et al., 2002; Von Gall et al., 2000). Les deux types de récepteurs à la mélatonine sont exprimés par l'horloge principale : le récepteur MT1 serait impliqué dans l'inhibition de l'activité électrophysiologique de l'horloge (Jiang et al., 1995; Jin et al., 2003; von Gall et al., 1998) alors que le récepteur MT2 jouerait un rôle dans le décalage de phase et le réentraînement (Liu et al., 1997; Pfeffer et al., 2012). Ainsi, des études comparatives entre les souris C57BL/6 déficientes en mélatonine et les souris C3H qui synthétisent de la mélatonine ont montré que la mélatonine pouvait modifier la cinétique d'expression des gènes horloges. Pfeffer et collaborateurs ont découvert que la mélatonine peut faciliter le réentraînement de l'horloge *via* son récepteur MT2 (Pfeffer et al., 2017, 2012). Enfin, il a été récemment montré que la mélatonine pouvait réguler l'activité des noyaux du raphé en fonction de la photopériode. Ces modifications du système sérotoninergique en fonction des saisons pourraient également impacter l'activité locomotrice des animaux (Giannoni-Guzmán et al., 2020; Green et al., 2015). Si certaines études suggèrent que la sécrétion de mélatonine constitue un signal redondant sur l'horloge (Houdek et al., 2016), l'ensemble de ces données suggère qu'elle pourrait constituer un mécanisme important dans l'adaptation comportementale en réponse aux variations saisonnières. En somme, les variations de l'activité locomotrice chez les souris C3H *rd1* en réponse aux changements de photopériode pourraient résulter de la synergie entre une régulation *feedback* mélatonine-SCN et une modification du signal d'entrée mélanopsinergique dans l'horloge (Porcu et al., 2018).

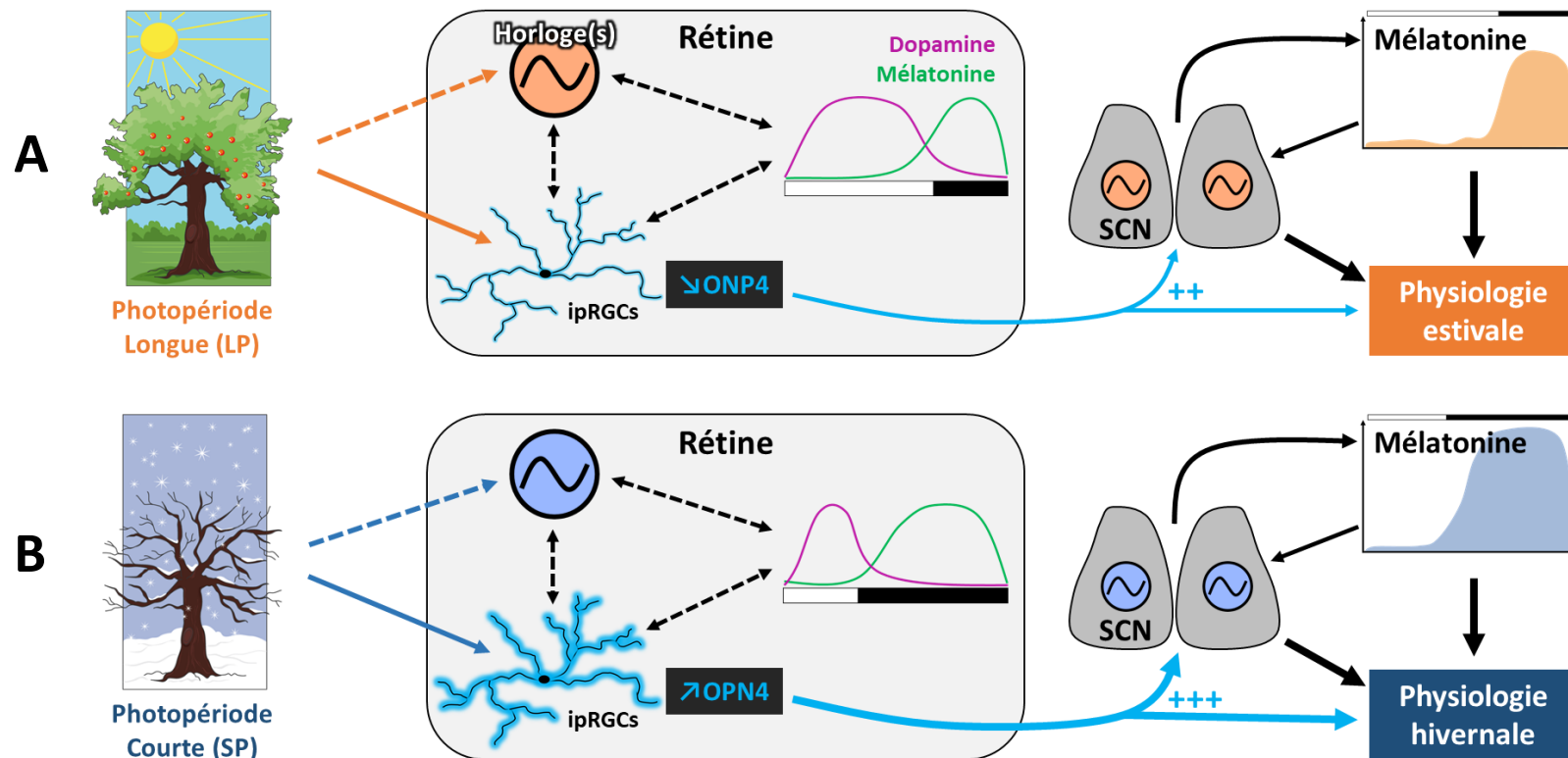
### 3. Intégration centrale de la photopériode : de la mélatonine à la TSH

Pour étudier l'intégration de la photopériode chez les souris C3H *rd1*, nous avons analysé les différentes étapes de cette intégration depuis la sécrétion de la mélatonine à l'expression de la TSH dans la *pars tuberalis* (PT). En effet, la libération de la mélatonine est sous contrôle de l'activité des SCN (Simonneaux and Ribelayga, 2003) : la sécrétion est inhibée par l'activité des SCN et par la lumière *via* une voie polysynaptique SCN-PVN-IML-SCG-Pinéale. La mélatonine est donc sécrétée exclusivement pendant la nuit et assure notamment un rôle de distribution de l'information circadienne dans l'organisme. De plus, la sécrétion de mélatonine varie également selon la photopériode (Arendt, 1998) : plus la photopériode est longue, plus le pic de sécrétion est court et inversement. Ainsi, les variations de la photopériode au cours de l'année sont encodées à travers le profil de sécrétion de mélatonine. Par la suite, le message mélatoninergique est décodé au niveau de la PT, une structure clé dans la régulation de la physiologie saisonnière chez les mammifères. La PT est notamment impliquée dans la

régulation du circuit de la reproduction dans l'hypothalamus (Klosen et al., 2013; Korf, 2018; Malpaux et al., 1999). La mélatonine contrôle *via* le récepteur MT1 le fonctionnement de l'horloge dans la PT et l'expression de gènes dépendants de l'AMPC (Jilg et al., 2005; Kell and Stehle, 2005; Von Gall et al., 2005). Par ce mécanisme, l'augmentation de la sécrétion de mélatonine entraîne un arrêt de la production de la TSH par les tanocytes de la PT (Dardente et al., 2010, 2003; Wood et al., 2020). Ainsi, l'encodage de la photopériode à travers la sécrétion de mélatonine agit directement sur les composants circadiens dans la PT et régule la voie EYA3/TSH, responsable de la mise en place de la physiologie saisonnière (Dardente et al., 2003; Unfried et al., 2009; Wood et al., 2020). En résumé, la sécrétion de mélatonine favorise l'activation ou l'inhibition de l'expression de la TSH par les tanocytes, cette inhibition/activation de la TSH est responsable du contrôle de la reproduction saisonnière (Dardente et al., 2010; Korf, 2018).

Chez les souris C3H *rd1* exposées à 8 semaines de LP ou de SP, la quantité de mélatonine dans les glandes pinéales a été mesurée par RIA à trois différents ZT par photopériode. Nous avons confirmé que la libération de mélatonine était inhibée pendant la journée que ce soit en LP ou en SP. En SP, la sécrétion de mélatonine augmente progressivement au fur et à mesure de la nuit pour atteindre son maximum en fin de nuit. Chez les LP, la sécrétion de mélatonine semble plus importante en début de nuit et retombe très rapidement en fin de nuit, quand la sécrétion chez les SP est encore importante. Ces données démontrent que les souris C3H *rd1* ont encodé les variations de la photopériode à travers la sécrétion de mélatonine. Ces résultats sont cohérents avec de précédentes études qui ont montré que les souris C3H produisent de la mélatonine et que sa libération était sensible à la lumière (Goto and Ebihara, 1990; Lucas et al., 1999). Cependant, c'est la première fois à notre connaissance que des profils de sécrétion de la mélatonine d'animaux sans cônes et sans bâtonnets sont comparés entre SP/LP. Nos résultats concordent avec les profils de mélatonine décrits chez d'autres souches de souris (De Miera et al., 2020). Afin de confirmer que l'intégration de la photopériode est complète chez nos souris C3H *rd1*, nous avons réalisé des hybridations *in situ* pour mesurer l'expression de la TSH $\beta$  au niveau de la PT. L'analyse semi-quantitative de l'intensité du marquage démontre que la TSH $\beta$  est significativement moins exprimée en LP qu'en SP. Ces données sont cohérentes avec d'autres études majoritairement réalisées chez des animaux de souche CBA/N (Masumoto et al., 2010; Ono et al., 2008).

Nos résultats montrent non seulement que les C3H *rd1* ont bien encodé la photopériode *via* la sécrétion de mélatonine, mais également que cet encodage est corrélé à l'expression de la TSH par les tanocytes dans la PT. Ces données indiquent que malgré l'absence des bâtonnets et des cônes, les souris C3H *rd1* présentent une intégration de la photopériode comparable à des animaux possédant une rétine intacte. Ajoutés aux variations de l'activité locomotrice, ces résultats démontrent que les ipRGCs sont suffisantes pour assurer des modifications physiologiques et comportementales en réponse aux variations de la photopériode.



**Figure 50 : Modèle d'intégration de la photopériode par la rétine et ses conséquences dans l'intégration centrale de la photopériode.** (A) la photopériode longue (LP) est détectée par les photorécepteurs dans la rétine puis est encodée par l'horloge (en orange). La lumière et l'horloge régulent conjointement les profils de sécrétion de la mélatonine et de la dopamine dans la rétine, qui favorisent une libération abondante de dopamine comparée à la mélatonine. Ces modifications ont pour conséquence de favoriser la baisse d'activité de la mélanopsine (OPN4) diminuant l'entrée mélanopsinergique dans les SCN et d'autres structures centrales (VLPO, SPZ notamment). En réponse, les SCN intègrent l'information et régulent la libération de mélatonine par la glande pinéale, permettant l'intégration de la photopériode au niveau central et la mise en place d'une physiologie estivale. (B) En photopériode courte (SP), l'intégration de la photopériode par la rétine favorise l'augmentation de l'activité de la mélanopsine, assurant une meilleure lecture des variations lumineuses environnementales et participant à la mise en place d'une physiologie de type hivernale. Dessins été/hiver adaptés de *Servier medical ART*. D'après [Tosini & Menaker, 1996](#) ; [Witkovski, 2004](#) ; [Blasic et al., 2012](#) ; [Pack et al., 2015](#) ; [Van Hook et al., 2012](#) ; [Engel et al., 2014](#) ; [Sakamoto et al., 2005](#) ; [Hannibal et al., 2013](#) ; [Bobu et al., 2013](#) ; [Tackenberg and McMahon, 2018](#) ; [Porcu et al., 2018](#) ; [Doyle et al., 2012](#) ; [Wong et al., 2005](#) ; [Wood et al., 2020](#).

#### 4. Perspectives de l'axe 1

L'objectif sur le long terme est de confirmer que la rétine intègre des informations relatives à la photopériode et de mettre en évidence, le cas échéant, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans cette adaptation saisonnière. Récemment, une plateforme de Multielectrode Array (MeA) a été mise en place pour permettre des études électrophysiologiques *in vitro* de la rétine au laboratoire. Un des principaux objectifs avec cet outil est de confirmer que les variations de la photopériode entraînent des modifications dans la rétine, notamment un changement dans l'activité électrophysiologique des ipRGCs. Plusieurs études ont déjà démontré la possibilité d'étudier le système mélanopsinergique par utilisation d'un MeA (Hughes et al., 2016; Weng et al., 2018). L'idée est de comparer l'activité des ipRGCs de rétines d'animaux précédemment exposés à plusieurs semaines de photopériode courte ou longue. Selon notre modèle, nous pourrions nous attendre à une augmentation de la sensibilité du système mélanopsinergique des rétines précédemment exposées à un protocole SP. Cette méthode offrira également la possibilité de tester l'effet de la mélatonine et de la dopamine sur les ipRGCs de rétines d'animaux précédemment exposés à une photopériode longue ou courte. Ces études électrophysiologiques *in vitro* permettront de confirmer et de compléter les résultats obtenus pendant cette thèse.

En parallèle, des études par RT-qPCR et Western-blot sur des rétines d'animaux précédemment exposés à différentes photopériodes, permettront de mettre en évidence les modifications d'expression de différents gènes cibles en réponse aux variations de la photopériode. Dans un premier temps, nous concentrerons nos études d'expression de gènes sur l'OPN4, l'AANAT/HIOMT, PER, CRY, CLOCK et BMAL1.

Par ailleurs, l'obtention récente d'un modèle de souris C57BL/6 productrice de mélatonine, va permettre de générer dans les prochains mois des souris OPN4 KO produisant de la mélatonine. Ces modèles permettront de savoir si des changements similaires à ceux observés chez les souris *rd1* s'opèrent également dans des rétines intactes. De plus, l'utilisation de ces deux modèles offre pour la première fois la possibilité d'étudier l'intégration de la photopériode en l'absence de mélanopsine. Il sera intéressant de comparer la cinétique de l'intégration de la photopériode au niveau comportemental (activité locomotrice) et physiologique (libération de mélatonine, expression de la TSH). L'hypothèse étant que la perte de la mélanopsine pourrait réduire la capacité d'intégration au niveau central. Des études par IHC, Western-blot et RT-qPCR permettront d'évaluer les modifications physiologiques au sein de la rétine. Des études *in vitro* par utilisation du MeA apporteront des données supplémentaires sur les modifications physiologiques des rétines de ces animaux, en réponse aux variations de la photopériode. Ces prochaines études auront ainsi pour objectif de mieux caractériser les modifications s'opérant dans la rétine en réponse aux variations de la photopériode, ainsi que leurs conséquences sur la régulation de la physiologie et des comportements par la lumière à travers les saisons.

## II. Un enrichissement en lumière bleue induit des modifications comportementales

### 1. Modification du comportement et du connectome de l'agressivité par la lumière

La surexposition de l'Homme à la lumière enrichie en bleu et notamment par l'utilisation croissante des écrans et des LEDs, est corrélée à des troubles de sommeil et à des modifications de l'humeur (Cajochen et al., 2011; Munch, 2005; Vandewalle et al., 2013). Par ailleurs, les projections des ipRGCs, qui sont particulièrement photosensibles à la lumière bleue (460-480nm), se superposent à plusieurs structures impliquées dans la régulation des comportements, notamment de type agressif/anxieux. (Delwig et al., 2016; Kirkwood et al., 2018; Lee et al., 2019; Nelson and Trainor, 2007). L'objectif de cet axe de recherche était donc d'étudier l'effet d'une exposition à lumière bleue sur les comportements de type agressif/anxieux, en évaluant notamment la contribution des ipRGCs.

#### Etudes préliminaires d'expositions aux néons chez les souris MAOA KO et C57BL/6

Lors des protocoles d'exposition aux néons (2017-2018) chez les souris C57BL/6 et MAOA KO, aucune différence significative n'a été observée dans les tests comportementaux entre les groupes exposés à la lumière bleue ou blanc chaud, au sein d'un même génotype. Cependant, des différences significatives ont été observées entre les souris C57BL/6 et les souris MAOA KO. La délétion de l'enzyme MAOA chez les souris provoque une perturbation de la neurotransmission monoaminergique, notamment sérotoninergique (Godar et al., 2014), entraînant des conséquences sur le comportement de type agressif. Nos résultats montrent que les souris MAOA KO présentent un comportement de type agressif significativement plus important comparé aux animaux C57BL/6. Ces résultats confirment les conclusions de nombreuses autres études qui ont démontré un comportement de type agressif exacerbé chez ces souris (Bortolato et al., 2013; Godar et al., 2011). Ce comportement exacerbé peut être corrigé par administration de fluoxétine (un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine), démontrant que les troubles comportementaux des MAOA KO sont effectivement dus à des perturbations dans la neurotransmission sérotoninergique (Godar et al., 2014). En revanche, peu de différences entre les deux génotypes ont été observées pour les comportements de type anxieux, évalués *via* le test de la boîte éclairée/sombre. Les animaux MAOA KO ont effectué significativement moins de transitions vers la boîte éclairée que les souris C57BL/6, alors qu'il n'y pas de différence significative pour le pourcentage de temps passé dans la boîte éclairée. Ces données avaient déjà été démontrées par Scott et collaborateurs : la différence dans le nombre de transitions pouvant être expliquée par une diminution de l'activité locomotrice (comportement exploratoire) des souris MAOA KO dans un nouvel environnement (Scott et al., 2008). En somme, si les protocoles d'exposition aux néons bleus ou blanc chaud pourraient affecter de façon différentielle le comportement des souris C57BL/6 et MAOA KO, la grande majorité des différences significatives observées lors des tests comportementaux est due à un effet génotype. Par ailleurs, les analyses qualitatives



du marquage C-FOS n'ont révélé aucune différence notable dans l'activation de structures cérébrales comme les SCN, le VMH, le BNST ou dans l'amygdale entre les deux génotypes. La comparaison des groupes d'exposition à la lumière bleue et blanc chaud n'a démontré que peu de différence dans l'activation de ces structures, ce qui est cohérent avec l'absence d'effet significatif au niveau comportemental.

Ces résultats pourraient indiquer que les effets induits par la lumière bleue ou par la lumière blanc chaud sont difficilement discernables, en raison d'une intensité d'exposition trop élevée. En effet, il est possible qu'une intensité lumineuse de 100 lux entraîne une saturation de la réponse mélanopsinergique que ce soit dans la condition lumière bleue ou lumière blanc chaud. Dans ce cas, les structures contactées par les ipRGCs recevraient des informations similaires dans les deux protocoles d'exposition, entraînant une sortie comportementale similaire. Il aurait été utile de mesurer en plus de l'intensité lumineuse, le flux lumineux (puissance lumineuse) des deux sources de lumière dans le spectre correspondant au bleu. Cependant, le but de notre étude est de modéliser les effets d'un enrichissement en lumière bleue le soir chez la souris. Chez l'Homme, un individu s'exposant aux écrans le soir en plus de l'éclairage domestique recevra une quantité plus importante de lumière bleue qu'un individu qui est seulement exposée à l'éclairage domestique.

Afin de modéliser au mieux cette situation, il serait nécessaire de diminuer l'intensité de la lumière ambiante dans les deux conditions, pour ne pas « saturer » les ipRGCs et en gardant une intensité suffisante pour assurer le photoentraînement, tout en augmentant l'intensité de la lumière bleue le soir dans la condition d'enrichissement en lumière bleue. L'élaboration de ce modèle, qui a été accompagnée de la publication des travaux de Todd et collaborateurs fin 2018 (Todd et al., 2018), ont conduit en 2019 à un remaniement des protocoles d'exposition. Un système d'éclairage par bandes LEDs a été installé pour permettre de tester un nouveau protocole d'exposition, offrant un meilleur contrôle de l'intensité et du spectre de stimulation. Nous avons alors testé ce nouveau protocole chez des souris C3H *rd1*, ce qui nous a permis d'étudier l'implication spécifique des ipRGCs dans les effets directs de la lumière enrichie en bleu.

### **Protocoles d'exposition aux LEDs : effet sur le comportement des C3H *rd1***

Lors des protocoles d'exposition aux LEDs (2019), seules les souris C3H *rd1* qui ont reçu une injection intraoculaire contrôle (IgG-SAP) ont été testées ; car leur système mélanopsinergique est intact (validé en immunohistochimie) et permet une comparaison valide entre les deux groupes d'exposition.

Les tests de la boîte éclairée/sombre ont révélé une différence significative dans le pourcentage de temps passé dans la boîte éclairée : les souris précédemment exposées à un enrichissement en lumière bleue ont passé significativement moins de temps (environ 48% du temps total du test) dans la boîte éclairée, comparées aux animaux du groupe sans enrichissement en lumière bleue (environ 58% du temps total du test). Cependant, ces deux

valeurs sont très proches de la valeur de 50%, qui indique l'absence d'effet photophobique de la lumière et l'absence d'un comportement de type anxieux (Bourin and Hascoët, 2003). Alors que plusieurs études avaient démontré que le test de la boîte éclairée/sombre constituait un test valable pour l'évaluation du comportement de type anxieux chez les souris C3H *rd1* (Bouwknicht and Paylor, 2002; Kopp et al., 1999; Lad et al., 2010), les résultats d'une autre étude démontrent l'absence de comportement photophobique dans ce test chez cette souche (Thompson et al., 2010). Dans notre étude, les animaux du groupe avec enrichissement en lumière bleue ont pris un peu plus de temps pour sortir de la boîte sombre et ont fait moins de transitions (tendances non significatives) comparés aux animaux du groupe sans enrichissement. Ces deux paramètres pourraient être à l'origine de la différence observée dans le pourcentage de temps passé dans la boîte éclairée. Ainsi, il est possible que la boîte éclairée ne procure pas d'effet photophobique chez les C3H *rd1* (Thompson et al., 2010), et que la différence significative observée entre les groupes soit due à une diminution du comportement d'exploration des souris du groupe avec enrichissement. Alors que la diminution du comportement d'exploration peut également constituer un marqueur d'anxiété dans ce test, il n'y a pas de différence significative dans le nombre de transitions et la latence de première sortie entre les deux groupes. En conclusion, nos résultats dans ce test ne permettent pas de se prononcer clairement en faveur d'un effet anxiogène ou anxiolytique d'un enrichissement en lumière bleue.

Les effets d'une exposition avec enrichissement en lumière bleue sur le comportement de type agressif ont été évalués par des tests résident/intrus. Ce test permet notamment de mesurer le comportement de type agressif lié à l'aspect de défense territoriale (Takahashi and Miczek, 2014). Les souris C3H *rd1* précédemment exposées à un enrichissement en lumière bleue présentent une latence avant la première attaque significativement plus élevée comparée au groupe sans enrichissement. De plus, parmi les 7 souris exposées à un enrichissement en lumière bleue, seulement 2 ont attaqué les souris intruses, alors que 4 souris sur 7 ont attaqué dans le groupe sans enrichissement. L'augmentation de la latence avant la première attaque n'est pas corrélée à une diminution de l'interaction sociale, puisque qu'aucune différence significative n'est observée dans la latence avant le premier contact. Ces résultats semblent indiquer que l'exposition à la lumière bleue diminue le comportement de type agressif.

### **Protocoles d'exposition aux LEDs : effet sur le connectome de l'agressivité**

Avant les protocoles d'exposition, les animaux C3H *rd1* ont reçu une injection intraoculaire d'immunotoxine (UF008-SAP = anticorps anti-mélanopsine couplé à la toxine saporine) ou une injection contrôle (IgG-SAP = anticorps non spécifique couplé à la toxine saporine). L'immunotoxine permet la délétion spécifique des ipRGCs en moins de deux semaines (Göz et al., 2008). Chez l'ensemble des animaux, l'immunotoxine et l'IgG-SAP ont été co-injectés avec 2µg de la sous-unité B de la toxine cholérique (CTB). Ainsi, un des objectifs des injections intraoculaires réalisées chez les souris C3H *rd1* était d'associer le marquage C-FOS au

marquage CTB, permettant la visualisation des projections des ipRGCs aux zones cérébrales activées, pour la constitution de cartes anatomo-fonctionnelles. Toutefois, les nombreuses études par immunohistochimie n'ont pas permis de révéler le marquage CTB (résultats non montrés). Pour le moment, les raisons de cette perte d'immunoréactivité ne sont pas connues, mais pourraient être liées soit à une dégradation de la CTB due à la durée des protocoles ou à la déshydratation des cerveaux lors du protocoles d'enrobage au PEG. En effet, pour permettre la dégénérescence totale des ipRGCs, puis le protocole d'exposition et enfin de la réalisation des tests comportementaux, environ 4 semaines ont été nécessaires entre l'injection intraoculaire et la mise à mort des animaux. Il est possible que la majeure partie de la CTB injectée ait été dégradée pendant cette longue période. Cependant, certaines études montrent qu'il est encore possible de détecter de la CTB au bout de deux semaines post-injection chez le rat (Yao et al., 2018). Une autre explication serait que le protocole d'enrobage au PEG puisse affecter l'immunoréactivité de la CTB. La majorité des études de traçages visualise la CTB sur des coupes de cerveau réalisées au cryostat, ce qui ne nécessite aucune étape de déshydratation. A l'inverse, l'enrobage en PEG nécessite la déshydratation complète du tissu pour permettre la pénétration du polymère. Lors des protocoles d'immunohistochimie ou d'ISH sur des tissus enrobés au PEG, il est souvent nécessaire de passer par une étape de réactivation antigénique, car les sites d'immunoréactivité peuvent être masqués par cette étape de déshydratation. Si le protocole de réactivation antigénique au tris-citrate est efficace pour permettre le marquage de la protéine C-FOS, il n'est peut-être pas adapté pour rétablir l'immunoréactivité de la CTB. En somme, il sera nécessaire dans les prochains mois de réaliser de nouveaux essais afin de tester indépendamment les paramètres et également différents anticorps anti-CTB. A l'avenir, la CTB pourrait être injectée à la fin des protocoles d'exposition, indépendamment de l'immunotoxine, afin de réduire le délai entre l'injection et la mise à mort.

Les marquages C-FOS ont été réalisés sur les cerveaux des souris C3H *rd1* des différents groupes expérimentaux. Les analyses du marquage C-FOS ont révélé des activations dans de nombreuses structures liées au ipRGCs, notamment au sein de la SPZ, de l'IGL et du vLGN ou encore dans l'AHA (Delwig et al., 2016; Li and Schmidt, 2018). Ces activations sont bien dues à la stimulation lumineuse, puisqu'elles ne sont pas présentes chez les contrôles maintenus en obscurité. Les souris qui n'ont plus d'ipRGCs (à la suite de l'injection d'immunotoxine) et qui ont été mises à mort entre CT1 et CT2, montrent une activation importante dans les SCN. Cette activation est très probablement due à l'expression endogène de C-FOS induit par le début d'activité de l'horloge (Prosser et al., 1994). Ce contrôle immunotoxine est très utile car il confirme à la fois l'absence de projections des ipRGCs (Göz et al., 2008), mais permet également de visualiser les structures qui sont stimulées à la suite du début de l'activité de l'horloge (horloge-dépendant). Nous pouvons ainsi différencier les structures dont l'activation est uniquement due aux ipRGCs, des structures dont l'activation est liée à l'activité de l'horloge.

L'analyse comparative de ces marquages C-FOS chez les souris C3H *rd1* a montré que les animaux exposés de façon aiguë à la lumière bleue présentent une activation plus importante notamment dans la SPZ, dans l'AHA, dans le LS, la BNST et dans le DMH (**figure 47**). Le DMH est impliqué dans la régulation circadienne du rythme d'activité locomoteur, de la prise alimentaire et du métabolisme (Abrahamson and Moore, 2006; Gooley et al., 2006) et exerce notamment une action inhibitrice sur la VLPO, ce qui favoriserait plutôt l'éveil (Muindi et al., 2014; Pilorz et al., 2016). Or la lumière bleue favorise plutôt le sommeil chez la souris. Si le DMH n'est pas décrit comme jouant un rôle central dans la régulation du comportement agressif/anxieux, il serait impliqué dans la régulation de la thermogénèse et du système cardiovasculaire en réponse au stress (Dampney, 2015; Todd and Machado, 2019). Le fait que le DMH semble plus activé dans la condition d'exposition aux LEDs bleues reste non élucidé.

Les études de Todd et collaborateurs en 2018 ont démontré que le comportement de type-agressif était provoqué par l'activation de l'hypothalamus ventromédian (VMH) (Todd et al., 2018; Todd and Machado, 2019). Deux structures particulièrement activées chez les animaux exposés de manière aiguë à la lumière bleue sont impliquées dans l'inhibition du VMH et donc du comportement de type agressif : Le LS et la SPZ (Todd et al., 2018; Wong et al., 2016). En effet, une étude de Wong et collaborateurs a démontré que l'activation optogénétique des neurones dans le LS induisait l'arrêt du comportement agressif par inhibition des neurones du VMH (Wong et al., 2016). Bien que le LS reçoive des informations de la rétine *via* des projections du SCN (Porcu et al., 2018), le mécanisme sous-jacent à l'activation plus marquée du LS dans la condition d'exposition aiguë à la lumière bleue reste inconnu. Concernant la SPZ, nous savons que cette structure reçoit des projections directes des ipRGCs (Delwig et al., 2016; Legates et al., 2014) mais également des projections GABAergiques des SCN qui sont impliquées dans la régulation circadienne du comportement de type agressif (Todd et al., 2018). Nos résultats du marquage C-FOS montrent non seulement une importante activation de la SPZ dans la condition d'exposition aiguë à la lumière bleue, mais également une faible activation des SCN dans les deux conditions d'exposition aiguë à la lumière (bleue et blanc chaud). Cette faible activation des SCN en réponse à la stimulation lumineuse peut-être expliquée par le ZT de la stimulation. En effet, alors que la stimulation lumineuse a été réalisée entre ZT10 et ZT11, les neurones des SCN sortent juste de la phase de non-réponse à la lumière sur la courbe de réponse de phase (PRC) et ne sont donc pas particulièrement excitables (Cloues and Sather, 2003; Colwell, 2001; Lundkvist and Block, 2005). Cette hypothèse est largement soutenue par d'autres études qui montrent une diminution de l'induction de C-FOS par la lumière dans les SCN à ZT10 comparé à ZT22 (Masana et al., 1996).

Dans notre étude, l'ensemble de ces données pourrait indiquer que la stimulation des ipRGCs par la lumière bleue à ZT10 favorise l'activation directe de la SPZ, qui à son tour favorise l'inhibition du VMH (**figure 51**). Ainsi, l'activation de la VMH des souris exposées à un enrichissement en lumière bleue lors des tests résident/intrus aurait pu être diminuée par l'activation conjointe du LS et de la SPZ entre ZT10 et ZT12. Cependant, l'AHA, la BNST et la MeA sont également connues pour constituer des structures favorisant le comportement de

type agressif (Lebow and Chen, 2016; Nelson and Trainor, 2007) et présentent toutes les trois un marquage C-FOS un peu plus important dans la condition d'exposition aiguë à la lumière bleue. De plus, elles sont également des structures cibles des projections des ipRGCs (Delwig et al., 2016; Legates et al., 2014; Li and Schmidt, 2018). Compte tenu de ces informations, il est possible que les sorties comportementales observées chez les C3H *rd1* résultent à la fois d'une modification du ratio activation/inhibition par les ipRGCs du comportement agressif et de la régulation circadienne de ce comportement (**figure 51**) (Todd et al., 2018; Todd and Machado, 2019). Ainsi, il est possible qu'une stimulation à la lumière bleue à un autre ZT, par exemple à ZT16 ou à ZT22 quand les SCN sont particulièrement sensibles à la lumière, puisse *a contrario* favoriser des comportements de type anxieux/agressif. Cette hypothèse serait cohérente avec les effets délétères d'une exposition à la lumière en début de nuit chez la souris (An et al., 2020) et de l'utilisation des écrans en soirée chez l'Homme (Khouja et al., 2019; Maras et al., 2015).

### **Protocoles d'exposition aux LEDs chez les souris MAOA KO et WT**

Les protocoles d'exposition aux LEDs et les tests comportementaux ont été répétés en fin d'année 2020 sur des animaux MAOA KO et WT de la même portée (littermate). Lors des tests résident/intrus, aucune différence significative n'est observée dans la latence avant le premier contact ou la latence avant la première attaque entre les deux protocoles d'exposition. Cependant, nous remarquons une tendance à la diminution du comportement de type agressif dans les groupes exposés à un enrichissement en lumière bleue, similaire à ce qui a été obtenu chez les C3H *rd1*. Il est intéressant de noter que sur les 12 animaux exposés à un enrichissement en lumière bleue, seulement 7 animaux ont attaqué la souris intruse, contre 10 animaux dans le groupe sans enrichissement. Lors des tests de la boîte éclairée/sombre, les animaux exposés à un enrichissement en lumière bleue ont tendance à passer plus de temps dans la boîte éclairée, avec une différence significative chez les animaux MAOA KO. Cette anxiolyse observée chez les animaux exposés à un enrichissement en lumière bleue pourrait être expliquée par une activation du LS, qui est impliqué dans l'inhibition des comportements de type anxieux (Sheehan et al., 2004). Cette hypothèse est cohérente avec l'activation du LS observée lors des marquages C-FOS chez les souris C3H *rd1*. Par ailleurs, les souris du groupe WT exposées à un enrichissement en lumière bleue présentent une latence avant la première sortie significativement plus élevée que les animaux du groupe sans enrichissement. Si ce résultat peut indiquer une diminution du comportement exploratoire, il n'y a pourtant aucune différence significative dans le nombre de transitions et le temps passé dans la boîte éclairée, ce qui rend cette hypothèse peu probable. Dans l'ensemble, les modifications comportementales observées chez les animaux MAOA KO / WT littermate présentent des similitudes avec celles obtenues chez les souris C3H *rd1*.

Cependant, nous avons noté une forte réduction voire l'absence d'un effet génotype dans les comportements. Lors des protocoles d'exposition aux néons, les animaux MAOA KO présentaient un phénotype de type agressif significativement plus important que les animaux

contrôles C57BL/6. Malgré la validation du génotype par PCR, les animaux MAOA KO et WT littermate semblent présenter un comportement assez similaire lors des tests. Historiquement, les souris MAOA KO sont originaires de la souche 129/SvEvTac (Scott et al., 2008). Dans la plupart des études travaillant avec les souris MAOA KO, les animaux contrôles ne sont pas littermates, mais de souche 129/S6 (Godar et al., 2014). Pour leur étude, Godar et collaborateurs ont croisé en 2014 des souris MAOA KO hétérozygotes avec des animaux WT 129/S6 pour générer des animaux MAOA KO homozygotes (Godar et al., 2014). En comparant les résultats des comportements dans les tests résident/intrus, on remarque que les MAOA KO de l'étude de Godar et collaborateurs sont bien moins agressives (latence avant 1<sup>ère</sup> attaque  $\pm$  100 secondes) (Godar et al., 2014) que les MAOA KO d'origine de l'article de Scott et collaborateurs (latence avant 1<sup>ère</sup> attaque  $\pm$  25 secondes). Dans notre volonté de générer des contrôles avec un fond génétique similaire à celui des MAOA KO, nous avons généré des animaux KO et WT littermate par croisement sur fond génétique C57BL/6 à partir du milieu de l'année 2019. Ainsi, ce changement de fond génétique pourrait être responsable d'une forte atténuation du phénotype chez les animaux KO.

En somme, les tendances obtenues chez les animaux MAOA KO et WT sont comparables aux comportements observés chez les souris C3H *rd1*. Ces données suggèrent que l'enrichissement en lumière bleue pourrait affecter le comportement des souris MAOA KO et WT *via* un circuit semblable à ce qui a été décrit chez les C3H *rd1* grâce au marquage C-FOS. La diminution des effets d'un enrichissement en lumière bleue chez les animaux MAOA KO et WT pourrait être dû à la présence des cônes et des bâtonnets. En effet, à la différence des souris C3H, les animaux MAOA KO et WT littermate possèdent des bâtonnets et des cônes intacts (résultats des ERGs et des immunohistochimies). La connexion des ipRGCs avec les bâtonnets et les cônes leur confère une sensibilité plus importante à la lumière, qui facilite leur activation même à faible intensité lumineuse (Lee et al., 2019; Schmidt and Kofuji, 2010). Ainsi, il est possible que les ipRGCs soient activées de façon similaire entre les protocoles d'exposition avec et sans enrichissement en lumière bleue : tandis que les souris C3H ne perçoivent que la partie bleue du spectre des LEDs blanc chaud, les ipRGCs des souris MAOA KO et WT littermates peuvent être stimulées par le reste du spectre *via* les bâtonnets et les cônes. Ce phénomène serait donc responsable d'une perte de contraste entre les deux protocoles qui résulterait en des sorties comportementales moins marquées. Il sera nécessaire dans les prochains mois de répéter les expériences en augmentant les effectifs. L'objectif sera d'une part de confirmer les résultats obtenus lors des tests comportementaux, mais également de réaliser des études histologiques approfondies afin de savoir si ces sorties comportementales sont associées à la stimulation des ipRGCs.

Les travaux sur cet axe de recherche avaient pour objectif d'étudier les effets de la lumière bleue sur le comportement agressif. Notre hypothèse est que la lumière bleue peut modifier les comportements de type agressif, à travers la stimulation des ipRGCs dont les projections anatomiques sont liées au connectome de l'agressivité. A la différence de nombreuses autres études, nous avons décidé d'étudier les effets directs de la lumière en limitant les

perturbations sur l'horloge circadienne (An et al., 2020; Huang et al., 2019; LeGates and Kvarta, 2020). Nos résultats montrent qu'un enrichissement en lumière bleue chez des souris C3H *rd1* entre ZT10 et ZT12 modifie le comportement de type agressif. Ces modifications semblent être accompagnées par l'activation de différentes structures impliquées dans le connectome de l'agressivité. De plus, l'enrichissement en lumière bleue entraîne des modifications comportementales similaires chez des souris MAOA KO et WT. Ces données préliminaires soutiennent notre hypothèse selon laquelle les ipRGCs sont impliquées dans la balance activation/inhibition du comportement agressif, indépendamment d'un dérèglement du rythme circadien. De futures études permettront de confirmer ce rôle des ipRGCs dans la modulation du connectome de l'agressivité.

## 2. L'enrichissement en lumière bleue ne semble pas affecter la locomotion

Une des difficultés majeures dans la mise en place des protocoles d'exposition est d'éviter un dérèglement des rythmes circadiens. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une perturbation des rythmes biologiques pouvait favoriser le développement de symptômes de type anxieux/dépressif (LeGates et al., 2013; Touitou et al., 2016). Les effets directs de la lumière sont alors difficilement discernables des effets médiés *via* les SCN. Dans nos protocoles, Les expositions à la lumière bleue ou au blanc chaud ont toujours été réalisées dans la continuité de la phase lumineuse, pour éviter autant que possible des décalages de phase des SCN.

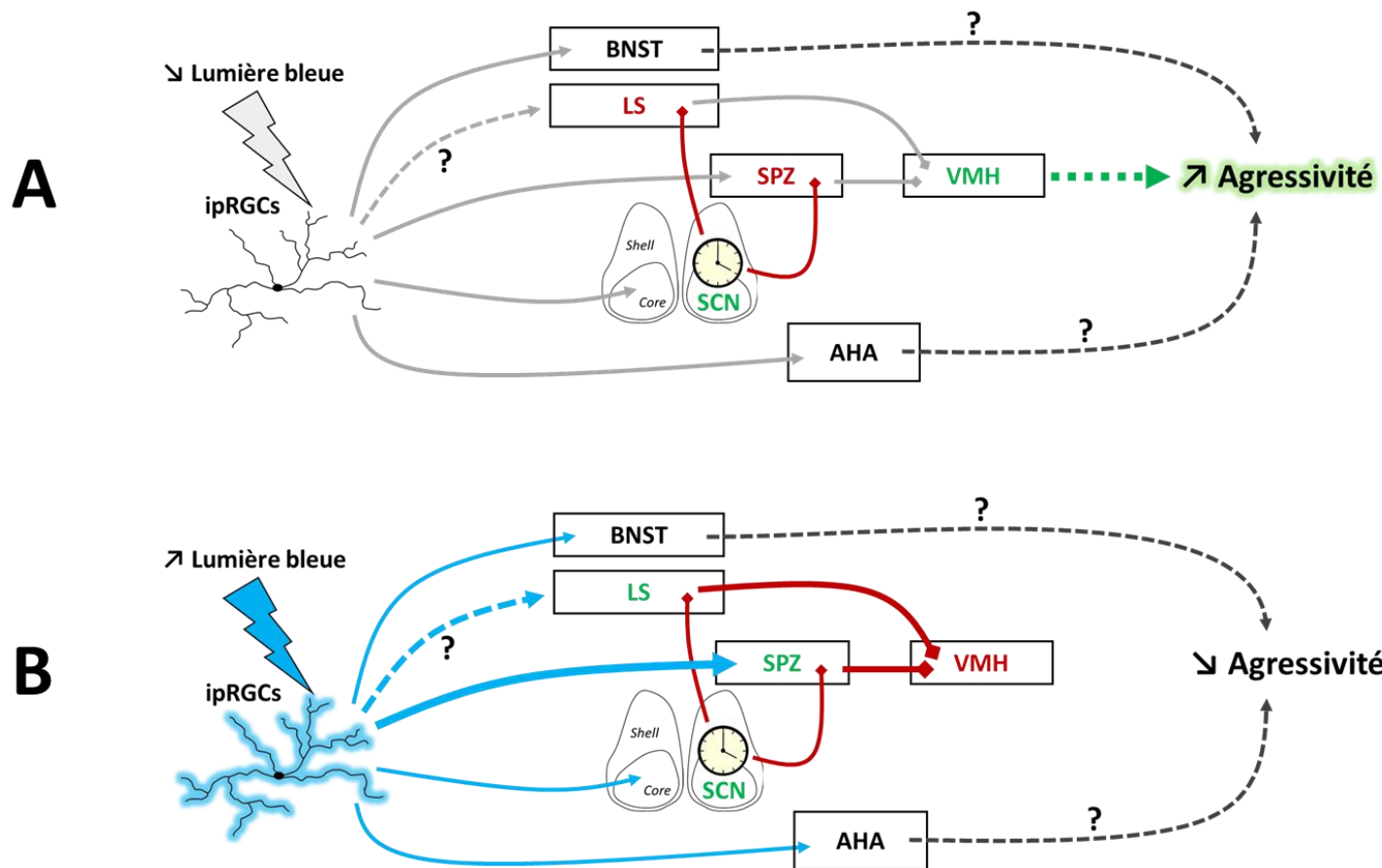
Afin d'évaluer indirectement l'impact de nos protocoles d'exposition sur l'horloge, nous avons procédé à des enregistrements de l'activité locomotrice durant l'ensemble des expositions aux néons (2017-2018) ou aux LEDs (2019-2020). Pendant les protocoles d'expositions aux néons (2018), nous n'avons pas observé de modification significative de l'activité locomotrice entre les protocoles d'exposition à la lumière bleue ou blanc chaud. Les deux sources lumineuses ont induit une inhibition similaire de l'activité locomotrice sur les créneaux d'expositions et aucune différence n'a été observée dans les profils d'activité nocturne. Ce phénomène pourrait être dû au fait que l'intensité lumineuse des néons blanc chaud ou bleu entraîne dans les deux protocoles une saturation de la réponse des ipRGCs. Cette explication serait cohérente avec les résultats similaires des marquages C-FOS, obtenus à la suite des expositions aiguës aux néons blanc chaud ou bleus. Seule une différence dans la répartition de l'activité locomotrice est visible entre animaux C57BL/6 et MAOA KO. Cependant, ces variations entre les profils d'activité peuvent être expliquées à la fois par la différence de fond génétique (Kopp, 2001) mais aussi par une modification dans la neurotransmission des monoamines chez les MAOA KO (Chen et al., 2004; Edgar et al., 1997).

Pendant les expositions aux LEDs (2019), il y a également peu de différences notables entre les profils d'activité dues au protocole d'exposition. Chez les C3H *rd1*, les animaux qui ont reçu l'injection d'IgG-SAP et qui ont été exposés au protocole sans enrichissement présentent une légère augmentation de leur activité locomotrice en début de nuit lors de l'exposition aux LEDs

comparée à la ligne de base avant l'exposition aux LEDs (**figure 41 A**). Cependant, les profils d'activité des animaux des groupes avec et sans enrichissement en lumière bleue sont similaires dès lors qu'ils sont exposés aux LEDs. Cette modification de l'activité des animaux du groupe sans enrichissement en lumière bleue au moment du passage des plafonniers aux LEDs, n'est pas observée chez le groupe avec enrichissement. Pourtant, les deux protocoles d'exposition aux LEDs entraînent une inhibition similaire de l'activité locomotrice. Si pour le moment aucune explication à ce phénomène n'a été trouvée, cela n'est probablement pas dû à une modification au niveau de l'horloge, puisque la répartition de l'activité locomotrice n'est pas affectée significativement entre les deux groupes d'exposition.

En conclusion, l'analyse des profils d'activité locomotrice des souris C3H, MAOA KO et C57BL/6 n'a révélé que peu de modifications qui pourraient être dues aux protocoles d'expositions aux néons ou aux LEDs. La plupart des différences observées peuvent être expliquées par des différences de fond génétique (entre C3H et C57BL/6) ([Kopp, 2001](#)) ou par la perte de la MAOA qui affecte les systèmes monoaminergiques, notamment sérotoninergique ([Chen et al., 2004](#); [Edgar et al., 1997](#)). De manière générale, si la quantité d'activité locomotrice a faiblement varié, la répartition de l'activité locomotrice n'est pas significativement impactée par le protocole d'exposition aux néons/LEDs et ce, chez l'ensemble de nos modèles de souris. Ces données indiquent que nos protocoles d'exposition n'entraînent pas de perturbation importante du rythme circadien, ce qui permet d'étudier les effets directs de la lumière en se substituant aux effets dépendants de l'horloge.





**Figure 51 : Modèle de régulation du comportement de type agressif par la lumière *via* les ipRGCs. (A)** En l'absence d'exposition à la lumière bleue en fin de journée, les SCN exercent un contrôle inhibiteur sur le LS et la SPZ, ce qui favorise l'activation du VMH, responsable de l'augmentation du comportement de type agressif. Le comportement de type agressif est alors régulé majoritairement par l'activité de l'horloge (effets dépendants de l'horloge). **(B)** La stimulation des ipRGCs par de la lumière bleue à la fin de journée a peu d'impact sur les SCN, mais entraîne l'activation du LS, du BNST, de l'AHA ainsi qu'une forte activation de la SPZ. L'activation du LS et de la SPZ favorise la baisse d'activité du VMH, ce qui diminue le comportement de type agressif. Le comportement de type agressif est alors directement régulé par la lumière (effets directs de la lumière). Adapté d'après [Todd et al., 2018](#) ; [Todd & Machado, 2019](#) ; [Nelson & Trainor, 2007](#) ; [Lebow & Chen, 2016](#) ; [Wong et al., 2016](#) ; [Delwig et al., 2016](#) ; [Legates et al., 2014](#) ; [Porcu et al., 2018](#).

### 3. Perspectives de l'axe 2

Ces travaux de thèse ont permis de tester différents types de protocoles d'exposition à l'aide de différents systèmes d'éclairages (néons et LEDs) pour étudier l'impact de la lumière bleue sur le comportement chez des souris C3H *rd1*, MAOA KO et WT. Nos résultats montrent qu'un enrichissement en lumière bleue modifie le comportement de type agressif ainsi que l'activation de structures impliquées dans le connectome de l'agressivité. Alors que ces effets sont semblables chez 3 différentes souches de souris, les résultats chez les C3H *rd1* sont cohérents avec notre hypothèse d'une implication des ipRGCs.

Les objectifs à court terme seront de répéter les protocoles d'expositions aux LEDs sur des effectifs plus importants d'animaux MAOA KO et WT, mais également de procéder à une étude d'activation par marquage C-FOS. Cette étude permettra de confirmer si les modifications comportementales observées chez les animaux MAOA KO et WT en réponse à la lumière bleue s'accompagnent de l'activation des mêmes structures que chez les souris C3H *rd1*. En parallèle, nous approfondirons les études de projections des ipRGCs par traçage CTB, afin de valider des liens anatomo-fonctionnels entre les ipRGCs et des structures impliquées dans le connectome de l'agressivité.

Les objectifs à long terme seront de disséquer les voies anatomiques impliquées dans les modifications du comportement agressif *via* l'activation des ipRGCs en réponse à la lumière bleue. Nous utiliserons des opsinamides, des inhibiteurs pharmacologiques de la mélanopsine qui bloquent temporairement la phototransduction au sein des ipRGCs (Jones et al., 2013). L'application d'opsinamides pendant des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez des souris C3H *rd1* exposées à de la lumière bleue, permettra de caractériser l'impact des ipRGCs sur l'activité de structures comme la SPZ ou encore la VMH. Dans un deuxième temps, des approches par transfection virale/optogénétique permettront d'inhiber sélectivement des structures telle que la SPZ. Ainsi, la voie ipRGCs-SPZ-VMH discutée dans cette thèse pourra être étudiée par inhibition optogénétique de la SPZ pendant une exposition à la lumière bleue. Nous évaluerons alors les effets sur l'activité de la VMH et sur le comportement de type agressif.

Enfin, les études préliminaires par IRMf en collaboration avec le laboratoire ICube ont permis de confirmer qu'il était possible de visualiser *in vivo* l'activation de structures cérébrales spécifiques en réponse à la lumière. Ces expériences seront répétées chez des animaux C3H *rd1*, C57BL/6 ou encore OPN4 KO pour renforcer l'étude du lien fonctionnel entre ipRGCs et connectome de l'agressivité. De plus en début d'année 2021, l'IRM 7T d'IRIS sera enrichi de l'acquisition d'une cryosonde 4 éléments qui améliorera considérablement la résolution spatiale. Enfin, un système d'éclairage IRMf compatible développé en collaboration avec le Dr. Paulo Loureiro de Sousa (laboratoire ICube, Strasbourg) permettra de réaliser des expositions à différentes longueurs d'onde et à différentes intensités lumineuses.



### III. Conclusion

Ces travaux de thèse se sont concentrés sur les fonctions non-visuelles de la rétine, à travers deux axes de recherches : (1) le rôle de la rétine et des ipRGCs dans le contexte de l'intégration de la photopériode et (2) l'impact de la lumière bleue sur le comportement de type agressif/anxieux.

Dans l'axe de recherche (1), nous avons testé l'implication des ipRGCs et de la rétine dans l'intégration de la photopériode chez la souris. Alors que le rôle des différents photorécepteurs dans le photoentraînement des rythmes circadiens a été largement étudié, la plupart des études ont été réalisées chez des modèles déficients en mélatonine. Cette hormone joue pourtant un rôle central dans la mise en place des comportements saisonniers et assure de nombreuses fonctions physiologiques au sein de la rétine. Ces travaux de thèse ont montré que l'intégration de la photopériode chez des souris C3H *rd1* se traduisait par des variations de l'activité locomotrice, de la sécrétion de mélatonine et de l'expression de la TSH dépendantes de la photopériode. Cette étude longitudinale permet d'affirmer que **la seule présence des ipRGCs est suffisante pour assurer une intégration centrale de la photopériode** comparable à des animaux possédant une rétine intacte. De plus, des analyses approfondies par immunohistochimie et RT-qPCR ont permis de montrer que **les ipRGCs présentent des modifications physiologiques en réponse à la photopériode**. Ces données, ajoutées aux études démontrant la présence d'une horloge dans la rétine et sa capacité à répondre à la lumière, suggèrent que la rétine pourrait intégrer la photopériode localement. Nous proposons un modèle au sein duquel **l'intégration de la photopériode par la rétine constituerait un mécanisme adaptatif, qui permettrait un ajustement de la sensibilité des photorécepteurs selon la saison**. Ce mécanisme offrirait une meilleure lecture des variations de la lumière en hiver, assurant à l'organisme une capacité visuelle et des réponses comportementale et physiologique optimales. Ces modifications saisonnières de la rétine seront étudiées de façon plus approfondie prochainement, à travers l'utilisation d'un modèle de souris OPN4 KO produisant de la mélatonine, mais également grâce à des études électrophysiologiques *in vitro* par MeA.

Dans l'axe de recherche (2), nous avons cherché à modéliser l'impact de la surexposition à la lumière bleue émise par les écrans, sur le connectome de l'agressivité. D'une part, ces travaux de thèse ont permis d'élaborer et de tester plusieurs protocoles d'exposition lumineuse *via* différents systèmes d'éclairage (néons et LEDs) sur l'activité locomotrice et le comportement de plusieurs souches de souris (C3H *rd1*, C57BL/6, MAOA KO). D'autre part, les données préliminaires obtenues sont similaires dans l'ensemble des souches testées et suggèrent qu'**une exposition à la lumière bleue pourrait modifier le comportement de type agressif, via les ipRGCs**. Enfin, des études en collaboration avec le laboratoire ICube ont permis de valider l'utilisation de l'IRMf, comme outil d'analyse de l'impact de la lumière sur l'activité de structures cérébrales spécifiques chez la souris. Ainsi, ces travaux de thèse ont mené à la validation de protocoles d'exposition à la lumière bleue et à la mise en place d'approches

techniques *in vitro* et *in vivo*. Prochainement, les effets de la lumière bleue sur le connectome de l'agressivité *via* les ipRGCs seront étudiés à travers des approches comportementales, pharmacologiques et électrophysiologiques.

**En conclusion, la rétine constitue une interface essentielle et dynamique entre l'environnement et notre cerveau. Les ipRGCs, au centre des fonctions non-visuelles de la rétine, seraient impliquées dans la régulation de notre physiologie, de nos comportements et de nos humeurs, à travers le temps et les saisons.**

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Abe, M., Herzog, E.D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., Menaker, M., Block, G.D., 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22, 350–356. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-01-00350.2002>
- Abrahamson, E.E., Moore, R.Y., 2006. Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252, 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.036>
- Alaimo, A., Liñares, G.G., Bujjamer, J.M., Gorojod, R.M., Alcon, S.P., Martínez, J.H., Baldessari, A., Grecco, H.E., Kotler, M.L., 2019. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: implications for age-related macular degeneration. *Arch. Toxicol.* 93, 1401–1415. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02409-6>
- Allen, C.N., Lasarev, M.R., Moldavan, M.G., Sollars, P.J., Pickard, G.E., 2018. Circadian Behavioral Responses to Light and Optic Chiasm-Evoked Glutamatergic EPSCs in the Suprachiasmatic Nucleus of ipRGC Conditional vGlut2 Knock-Out Mice. *Eneuro* 5, ENEURO.0411-17.2018. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0411-17.2018>
- An, K., Zhao, H., Miao, Y., Xu, Q., Li, Y.F., Ma, Y.Q., Shi, Y.M., Shen, J.W., Meng, J.J., Yao, Y.G., Zhang, Z., Chen, J.T., Bao, J., Zhang, M., Xue, T., 2020. A circadian rhythm-gated subcortical pathway for nighttime-light-induced depressive-like behaviors in mice. *Nat. Neurosci.* 23, 869–880. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0640-8>
- Arendt, J., 1998. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev. Reprod.* 3, 13–22. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0030013>
- Bailes, H.J., Lucas, R.J., Lucas, R.J., 2013. Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light (  $\lambda_{max}$  479 nm ) supporting activation of G q / 11 and G i / o signalling cascades. *R. Soc.* 280, 1–9.
- Balasubramanian, R., Gan, L., 2014. Development of Retinal Amacrine Cells and Their Dendritic Stratification. *Curr. Ophthalmol. Rep.* 2, 100–106. <https://doi.org/10.1007/s40135-014-0048-2>
- Bartholow, B.D., 2018. The aggressive brain: insights from neuroscience. *Curr. Opin. Psychol.* 19, 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.002>
- Bauer, M., Glenn, T., Monteith, S., Gottlieb, J.F., Ritter, P.S., Geddes, J., Whybrow, P.C., 2018. The potential influence of LED lighting on mental illness. *World J. Biol. Psychiatry* 19, 59–73. <https://doi.org/10.1080/15622975.2017.1417639>
- Baver, S.B., Pickard, Galen E., Sollars, P.J., Pickard, Gary E., 2008. Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1763–1770. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06149.x>
- Beaulé, C., Mitchell, J.W., Lindberg, P.T., Damadzic, R., Eiden, L.E., Gillette, M.U., 2009. Temporally restricted role of retinal PACAP: Integration of the phase-advancing light signal to the SCN. *J. Biol. Rhythms* 24, 126–134. <https://doi.org/10.1177/0748730409332037>
- Bedrosian, T.A., Nelson, R.J., 2017. Timing of light exposure affects mood and brain circuits. *Transl. Psychiatry* 7. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.262>

- Bell-Pedersen, D., Cassone, V.M., Earnest, D.J., Golden, S.S., Hardin, P.E., Thomas, T.L., Zoran, M.J., 2005. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6, 544–56. <https://doi.org/10.1038/nrg1633>
- Benedetto, M.M., Guido, M.E., Contin, M.A., 2017. Non-Visual Photopigments Effects of Constant Light-Emitting Diode Light Exposure on the Inner Retina of Wistar Rats. *Front. Neurol.* 8, 417. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00417>
- Berson, D.M., Castrucci, A.M., Provencio, I., 2010. Morphology and mosaics of melanopsin-expressing retinal ganglion cell types in mice. *J. Comp. Neurol.* 518, 2405–2422. <https://doi.org/10.1002/cne.22381>
- Berson, D.M., Dunn, F.A., Takao, M., 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science (80-. )*. 295, 1070–1073. <https://doi.org/10.1126/science.1067262>
- Blasiak, J., Reiter, R.J., Kaarniranta, K., 2016. Melatonin in Retinal Physiology and Pathology: The Case of Age-Related Macular Degeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/6819736>
- Blasic, J.R., Brown, R.L., Robinson, P.R., 2012a. Phosphorylation of Mouse Melanopsin by Protein Kinase A. *PLoS One* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045387>
- Blasic, J.R., Lane Brown, R., Robinson, P.R., 2012b. Light-dependent phosphorylation of the carboxy tail of mouse melanopsin. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1551–1562. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0891-3>
- Bobu, C., Hicks, D., 2009. Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3495–3502. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3145>
- Bobu, C., Sandu, C., Laurent, V., Felder-Schmittbuhl, M.-P., Hicks, D., 2013. Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the *Arvicantis ansorgei* retina. *Mol. Vis.* 19, 1060–73.
- Bockmann, J., Böckers, T.M., Vennemann, B., Niklowitz, P., Müller, J., Wittkowski, W., Sabel, B., Kreutz, M.R., 1996. Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin-alpha and -beta in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* 137, 1804–13. <https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612518>
- Bonmati-Carrion, M.A., Baño-Otalora, B., Madrid, J.A., Rol, M.A., 2017. Light color importance for circadian entrainment in a diurnal (*Octodon degus*) and a nocturnal (*Rattus norvegicus*) rodent. *Sci. Rep.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08691-7>
- Bortolato, M., Godar, S.C., Alzghoul, L., Zhang, J., Darling, R.D., Simpson, K.L., Bini, V., Chen, K., Wellman, C.L., Lin, R.C.S., Shih, J.C., 2013. Monoamine oxidase A and A/B knockout mice display autistic-like features. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 869–888. <https://doi.org/10.1017/S1461145712000715>
- Bourin, M., Hascoët, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3)
- Bouwknicht, J.A., Paylor, R., 2002. Behavioral and physiological mouse assays for anxiety: A survey in nine mouse strains. *Behav. Brain Res.* 136, 489–501. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00200-0)
- Boycott, B.B., Wässle, H., 1974. The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J. Physiol.* 240, 397–419. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010616>

- Brown, T.M., 2016. Using light to tell the time of day: sensory coding in the mammalian circadian visual network. *J. Exp. Biol.* 219, 1779–1792. <https://doi.org/10.1242/jeb.132167>
- Brown, T.M., Piggins, H.D., 2007. Electrophysiology of the suprachiasmatic circadian clock. *Prog. Neurobiol.* 82, 229–255. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.05.002>
- Buhr, E.D., Takahashi, J.S., 2013. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Handb. Exp. Pharmacol.* 217, 3–27. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0-1>
- Buhr, E.D., Van Gelder, R.N., 2014. Local photic entrainment of the retinal circadian oscillator in the absence of rods, cones, and melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 8625–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323350111>
- Buhr, E.D., Yue, W.W.S., Ren, X., Jiang, Z., Liao, H.R., Mei, X., Vemaraju, S., 2015. circadian oscillators in mammalian retina and cornea 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516259112>
- Cajochen, C., Frey, S., Anders, D., Späti, J., Bues, M., Pross, A., Mager, R., Wirz-Justice, A., Stefani, O., 2011. Evening exposure to a light-emitting diodes (LED)-backlit computer screen affects circadian physiology and cognitive performance. *J. Appl. Physiol.* 110, 1432–1438. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00165.2011>
- Calligaro, H., Coutanson, C., Najjar, R.P., Mazzaro, N., Cooper, H.M., Haddjeri, N., Felder-Schmittbuhl, M.P., Dkhissi-Benyahya, O., 2019. Rods contribute to the light-induced phase shift of the retinal clock in mammals. *PLoS Biol.* 17, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006211>
- Carter-Dawson, L., LaVail, M.M., 1979. Rods and Cones in the Mouse Retina. *J. Comp. Neurol.* 188, 263–272.
- Carter-Dawson, L.D., LaVail, M.M., Sidman, R.L., 1978. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 489–498.
- Chaix, A., Zarrinpar, A., Panda, S., 2016. The circadian coordination of cell biology. *J. Cell Biol.* 215, 15–25. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603076>
- Challet, E., 2019. The circadian regulation of food intake. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 393–405. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0210-x>
- Challet, E., Mendoza, J., 2010. Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. *Cell Tissue Res.* 341, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1001-9>
- Chang, A.-M., Aeschbach, D., Duffy, J.F., Czeisler, C.A., 2015. Evening use of light-emitting eReaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1232–1237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418490112>
- Chang, B., 2015. Survey of the nob5 mutation in C3H substrains 1101–1105.
- Chellappa, S.L., Steiner, R., Oelhafen, P., Lang, D., Götz, T., Krebs, J., Cajochen, C., 2013. Acute exposure to evening blue-enriched light impacts on human sleep. *J. Sleep Res.* 22, 573–580. <https://doi.org/10.1111/jsr.12050>
- Chen, C.Q., Fichna, J., Bashashati, M., Li, Y.Y., Storr, M., 2011. Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. *World J. Gastroenterol.* 17, 3888–3898. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i34.3888>
- Chen, J., Yoshida, T., Bitensky, M.W., 2008. Light-induced translocation of cyclic-GMP phosphodiesterase on rod disc membranes in rat retina. *Mol. Vis.* 14, 2509–2517.



- Chen, K., Holschneider, D.P., Wu, W., Rebrini, I., Shih, J.C., 2004. A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *J. Biol. Chem.* 279, 39645–39652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405550200>
- Chen, S.K., Badea, T.C., Hattar, S., 2011. Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature* 476, 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature10206>
- Chindamo, S., Buja, A., DeBattisti, E., Terraneo, A., Marini, E., Gomez Perez, L.J., Marconi, L., Baldo, V., Chiamenti, G., Doria, M., Ceschin, F., Malorgio, E., Tommasi, M., Sperotto, M., Buzzetti, R., Gallimberti, L., 2019. Sleep and new media usage in toddlers. *Eur. J. Pediatr.* 178, 483–490. <https://doi.org/10.1007/s00431-019-03318-7>
- Christensen, M.A., Bettencourt, L., Kaye, L., Moturu, S.T., Nguyen, K.T., Olgin, J.E., Pletcher, M.J., Marcus, G.M., 2016. Direct measurements of smartphone screen-time: Relationships with demographics and sleep. *PLoS One* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165331>
- Cloues, R.K., Sather, W.A., 2003. Afterhyperpolarization regulates firing rate in neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J. Neurosci.* 23, 1593–1604. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-05-01593.2003>
- Colwell, C.S., 2001. NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: Gating by the circadian system. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1420–1428. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01517.x>
- Coomans, C.P., Ramkisoensing, A., Meijer, J.H., 2015. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front. Neuroendocrinol.* 37, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.002>
- Dacheux, R.F., Raviola, E., 1986. The rod pathway in the rabbit retina: A depolarizing bipolar and amacrine cell. *J. Neurosci.* 6, 331–345. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.06-02-00331.1986>
- Dampney, R.A.L., 2015. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R429–R443. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00051.2015>
- Dardente, H., Klosin, P., Pévet, P., Masson-Pévet, M., 2003. MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: Effect of photoperiod. *J. Neuroendocrinol.* 15, 778–786. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01060.x>
- Dardente, H., Wyse, C.A., Birnie, M.J., Dupré, S.M., Loudon, A.S.I., Lincoln, G.A., Hazlerigg, D.G., 2010. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr. Biol.* 20, 2193–2198. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.048>
- De Miera, C.S., Beymer, M., Routledge, K., Król, E., Selman, C., Hazlerigg, D.G., Simonneaux, V., 2020. Photoperiodic regulation in a wild-derived mouse strain. *J. Exp. Biol.* 223, 1–9. <https://doi.org/10.1242/jeb.217687>
- Delwig, A., Larsen, D.D., Yasumura, D., Yang, C.F., Shah, N.M., Copenhagen, D.R., 2016. Retinofugal projections from melanopsin-expressing retinal ganglion cells revealed by intraocular injections of Cre-dependent virus. *PLoS One* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149501>
- Demb, J.B., Singer, J.H., 2012. Intrinsic properties and functional circuitry of the All amacrine cell. *Vis. Neurosci.* 29, 51–60. <https://doi.org/10.1017/S0952523811000368>
- Denman, D.J., Siegle, J.H., Koch, C., Reid, R.C., Blanche, T.J., 2017. Spatial organization of chromatic pathways in the mouse dorsal lateral geniculate nucleus. *J. Neurosci.* 37, 1102–1116. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1742-16.2016>

- Dhande, O.S., Stafford, B.K., Lim, J.-H.A., Huberman, A.D., 2015. Contributions of Retinal Ganglion Cells to Subcortical Visual Processing and Behaviors. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 1, 291–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-082114-035502>
- Diamond, J.S., 2017. Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 3, 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-102016-061345>
- Dinet, V., Ansari, N., Torres-Farfan, C., Korf, H.W., 2007. Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.* 42, 83–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00387.x>
- Dkhissi-Benyahya, O., Coutanson, C., Knoblauch, K., Lahouaoui, H., Leviel, V., Rey, C., Bennis, M., Cooper, H.M., 2013. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3435–3447. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1338-9>
- Dkhissi-Benyahya, O., Gronfier, C., De Vanssay, W., Flamant, F., Cooper, H.M., 2007. Modeling the Role of Mid-Wavelength Cones in Circadian Responses to Light. *Neuron* 53, 677–687. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.02.005>
- Do, M.T.H., 2019. Melanopsin and the Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: Biophysics to Behavior. *Neuron* 104, 205–226. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.016>
- Do, M.T.H., 2018. Mixed Palettes of Melanopsin Phototransduction. *Cell* 175, 637–639. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.046>
- Domingues-Montanari, S., 2017. Clinical and psychological effects of excessive screen time on children. *J. Paediatr. Child Health* 53, 333–338. <https://doi.org/10.1111/jpc.13462>
- Doyle, S.E., Grace, M.S., McIvor, W., Menaker, M., 2002. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: The role of melatonin. *Vis. Neurosci.* 19, 593–601. <https://doi.org/10.1017/S0952523802195058>
- Dubocovich, M.L., Markowska, M., 2005. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27, 101–110. <https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:101>
- Dumanskaya, G. V., Kosheleva, S.O., Veselovsky, N.S., 2012. Chemical neurotransmission from retinal ganglion cells to Superior Colliculus neurons under conditions of long-lasting neighboring co-culturing. *Neurophysiology* 44, 356–362. <https://doi.org/10.1007/s11062-012-9306-9>
- Dumitrescu, O.N., Pucci, F.G., Wong, K.Y., Berson, D.M., 2009. Ectopic retinal ON bipolar cell synapses in the OFF inner plexiform layer: Contacts with dopaminergic amacrine cells and melanopsin ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 517, 226–244. <https://doi.org/10.1002/cne.22158>
- Eckel-Mahan, K., Sassone-Corsi, P., 2015. Phenotyping Circadian Rhythms in Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 5, 271–281. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo140229>
- Ecker, J.L., Dumitrescu, O.N., Wong, K.Y., Alam, N.M., Chen, S.K., LeGates, T., Renna, J.M., Prusky, G.T., Berson, D.M., Hattar, S., 2010. Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: Cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.05.023>
- Edgar, D.M., Reid, M.S., Dement, W.C., 1997. Serotonergic afferents mediate activity-dependent entrainment of the mouse circadian clock. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.1.r265>

- Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., Hacimuftuoglu, A., 2016. Bir melatonin derlemesi, reseptörleri ve ilaçları. *Eurasian J. Med.* 48, 135–141. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2015.0267>
- Engel, L., Vollrath, L., Spessert, R., 2004. -acetyltransferase gene expression in retina and pineal gland of rats under various photoperiods 318, 983–986. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.133>
- Enthoven, C.A., Tideman, J.W.L., Polling, J.R., Yang-Huang, J., Raat, H., Klaver, C.C.W., 2020. The impact of computer use on myopia development in childhood: The Generation R study. *Prev. Med. (Baltim)*. 132, 105988. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2020.105988>
- Estevez, M.E., Michelle Fogerson, P., Ilardi, M.C., Borghuis, B.G., Chan, E., Weng, S., Auferkorte, O.N., Demb, J.B., Berson, D.M., 2012. Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision. *J. Neurosci.* 32, 13608–13620. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1422-12.2012>
- Evans, J.A., 2016. Collective timekeeping among cells of the master circadian clock. *J. Endocrinol.* 230, R27-49. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0054>
- Evans, J.A., Suen, T.C., Callif, B.L., Mitchell, A.S., Castanon-Cervantes, O., Baker, K.M., Kloehn, I., Baba, K., Teubner, B.J.W., Ehlen, J.C., Paul, K.N., Bartness, T.J., Tosini, G., Leise, T., Davidson, A.J., 2015. Shell neurons of the master circadian clock coordinate the phase of tissue clocks throughout the brain and body. *BMC Biol.* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0157-x>
- Falcón, J., 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 58, 121–162. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00078-1)
- Felder-Schmittbuhl, M.-P., Calligaro, H., Dkhissi-Benyahya, O., 2017. The retinal clock in mammals: role in health and disease. *ChronoPhysiology Ther. Volume 7*, 33–45. <https://doi.org/10.2147/cpt.s115251>
- Feng, D., Lazar, M.A., 2012. Clocks, Metabolism, and the Epigenome. *Mol. Cell* 47, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.026>
- Fernandez, D.C., Fogerson, P.M., Lazzarini Ospri, L., Thomsen, M.B., Layne, R.M., Severin, D., Zhan, J., Singer, J.H., Kirkwood, A., Zhao, H., Berson, D.M., Hattar, S., 2018. Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell* 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.004>
- Foulkes, N.S., Cermakian, N., Whitmore, D., Sassone-Corsi, P., 2000. Rhythmic transcription: the molecular basis of oscillatory melatonin synthesis. *Novartis Found. Symp.* 227, 5–14; discussion 15-18.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., Von Schantz, M., Muñoz, M., David-Gray, Z., Foster, R., 1999. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science (80-. )*. 284, 502–504. <https://doi.org/10.1126/science.284.5413.502>
- Fu, Y., Yau, K.W., 2007. Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 454, 805–819. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0194-y>
- Garbaza, C., Benedetti, F., 2018. Genetic factors affecting seasonality, mood, and the circadian clock. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00481>
- Gaucher, J., Montellier, E., Sassone-Corsi, P., 2018. Molecular Cogs: Interplay between Circadian Clock and Cell Cycle. *Trends Cell Biol.* 28, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.01.006>

- Gauer, F., Masson-Pévet, M., Pévet, P., 1994. Differential regulation of melatonin receptors by short-versus long-term pinealectomy in the rat suprachiasmatic nuclei and pars tuberalis. *J. Pineal Res.* 16, 73–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1994.tb00085.x>
- Gianesini, C., Clesse, D., Tosini, G., Hicks, D., Laurent, V., 2015. Unique regulation of the melatonin synthetic pathway in the retina of diurnal female *Arvicanthis ansorgei* (Rodentia). *Endocrinology* 156, 3292–3308. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1267>
- Gianesini, C., Hiragaki, S., Laurent, V., Hicks, D., Tosini, G., 2016. Cone viability is affected by disruption of melatonin receptors signaling. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 94–104. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18235>
- Giannoni-Guzmán, M.A., Kamitakahara, A., Magalong, V., Levitt, P., McMahon, D.G., 2020. Circadian Photoperiod alters TREK-1 channel function and expression in dorsal raphe serotonergic neurons via Melatonin Receptor 1 signaling. *J. Pineal Res.* e12705. <https://doi.org/10.1111/jpi.12705>
- Godar, S.C., Bortolato, M., Castelli, M.P., Casti, A., Casu, A., Chen, K., Ennas, M.G., Tambaro, S., Shih, J.C., 2014. The aggression and behavioral abnormalities associated with monoamine oxidase A deficiency are rescued by acute inhibition of serotonin reuptake. *J. Psychiatr. Res.* 56, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.04.014>
- Godar, S.C., Bortolato, M., Frau, R., Dousti, M., Chen, K., Shih, J.C., 2011. Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 1195–1207. <https://doi.org/10.1017/S1461145710001483>
- Goldman, B.D., 2001. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J. Biol. Rhythms* 16, 283–301. <https://doi.org/10.1177/074873001129001980>
- Golombek, D.A., Rosenstein, R.E., 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol. Rev.* 90, 1063–1102. <https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>
- Gooley, J.J., Schomer, A., Saper, C.B., 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat. Neurosci.* 9, 398–407. <https://doi.org/10.1038/nn1651>
- Goto, M., Ebihara, S., 1990. The influence of different light intensities on pineal melatonin content in the retinal degenerate C3H mouse and the normal CBA mouse. *Neurosci. Lett.* 108, 267–272. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90652-P](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90652-P)
- Göz, D., Studholme, K., Lappi, D. a., Rollag, M.D., Provencio, I., Morin, L.P., 2008. Targeted Destruction of Photosensitive Retinal Ganglion Cells with a Saporin Conjugate Alters the Effects of Light on Mouse Circadian Rhythms. *PLoS One* 3, e3153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003153>
- Graham, D.M., Wong, K.Y., Shapiro, P., Frederick, C., Pattabiraman, K., Berson, D.M., 2008. Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomic phototransduction cascade. *J. Neurophysiol.* 99, 2522–2532. <https://doi.org/10.1152/jn.01066.2007>
- Graydon, C.W., Lieberman, E.E., Rho, N., Briggman, K.L., Singer, J.H., Diamond, J.S., 2018. Synaptic Transfer between Rod and Cone Pathways Mediated by All Amacrine Cells in the Mouse Retina. *Curr. Biol.* 28, 2739-2751.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.063>
- Green, N.H., Jackson, C.R., Iwamoto, H., Tackenberg, M.C., McMahon, D.G., 2015. Photoperiod Programs Dorsal Raphe Serotonergic Neurons and Affective Behaviors. *Curr. Biol.* 25, 1389–1394. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.03.050>

- Guilding, C., Piggins, H.D., 2007. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: Are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur. J. Neurosci.* 25, 3195–3216. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05581.x>
- Güler, A.D., Ecker, J.L., Lall, G.S., Haq, S., Altimus, C.M., Liao, H.-W., Barnard, A.R., Cahill, H., Badea, T.C., Zhao, H., Hankins, M.W., Berson, D.M., Lucas, R.J., Yau, K., Hattar, S., 2008. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* 453, 102–5. <https://doi.org/10.1038/nature06829>
- Ham, W.T., Ruffolo, J.J., Mueller, H.A., Clarke, A.M., Moon, M.E., 1978. Histologic analysis of photochemical lesions produced in rhesus retina by short-wavelength light. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 1029–1035.
- Han, J., Dinculescu, A., Dai, X., Du, W., Clay Smith, W., Pang, J., 2013. Review: The history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations. *Mol. Vis.* 19, 2579–2589.
- Hankins, M., Peirson, S., Foster, R., 2008. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci.* 31, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.11.002>
- Hannibal, J., Christiansen, A.T., Heegaard, S., Fahrenkrug, J., Kiilgaard, J.F., 2017. Melanopsin expressing human retinal ganglion cells: Subtypes, distribution, and intraretinal connectivity. *J. Comp. Neurol.* 525, 1934–1961. <https://doi.org/10.1002/cne.24181>
- Hannibal, J., Fahrenkrug, J., 2004. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res.* 316, 99–113. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0858-x>
- Hannibal, J., Georg, B., Fahrenkrug, J., 2013. Differential expression of melanopsin mRNA and protein in Brown Norwegian rats. *Exp. Eye Res.* 106, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.11.006>
- Hannibal, J., Georg, B., Hindersson, P., Fahrenkrug, J., 2005. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J. Mol. Neurosci.* 27, 147–55. <https://doi.org/10.1385/JMN:27:2:147>
- Harbour, V.L., Weigl, Y., Robinson, B., Amir, S., 2013. Comprehensive Mapping of Regional Expression of the Clock Protein PERIOD2 in Rat Forebrain across the 24-h Day. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076391>
- Hargrave, P.A., Hamm, H.E., Hofmann, K.P., 1993. Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. *Bioessays* 15, 43–50. <https://doi.org/10.1002/bies.950150107>
- Harrington, M.E., 1997. The ventral lateral geniculate nucleus and the intergeniculate leaflet: Interrelated structures in the visual and circadian systems. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 705–727. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(96\)00019-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(96)00019-X)
- Harrison, K.R., Reifler, A.N., Chervenak, A.P., Wong, K.Y., 2020. Prolonged Melanopsin-based Photoresponses Depend in Part on RPE65 and Cellular Retinaldehyde-binding Protein (CRALBP). *Curr. Eye Res.* 0. <https://doi.org/10.1080/02713683.2020.1815793>
- Hattar, S., 2002. Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science (80- )*. 295, 1065–1070. <https://doi.org/10.1126/science.1069609>
- Hayter, E.A., Brown, T.M., 2018. Additive contributions of melanopsin and both cone types provide broadband sensitivity to mouse pupil control. *BMC Biol.* 16, 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0552-1>
- Hermawati, D., Rahmadi, F.A., Sumekar, T.A., Winarni, T.I., 2018. Early electronic screen exposure and autistic-like symptoms. *Intractable Rare Dis. Res.* 7, 69–71. <https://doi.org/10.5582/irdr.2018.01007>

- Herzog, E.D., Takahashi, J.S., Block, G.D., 1998. Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 708–13. <https://doi.org/10.1038/3708>
- Hiragaki, S., Baba, K., Coulson, E., Kunst, S., Spessert, R., Tosini, G., 2014. Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina. *PLoS One* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106819>
- Horowitz-Kraus, T., Hutton, J.S., 2018. Brain connectivity in children is increased by the time they spend reading books and decreased by the length of exposure to screen-based media. *Acta Paediatr. Int. J. Paediatr.* 107, 685–693. <https://doi.org/10.1111/apa.14176>
- Houben, T., Deboer, T., Van Oosterhout, F., Meijer, J.H., 2009. Correlation with behavioral activity and rest implies circadian regulation by scn neuronal activity levels. *J. Biol. Rhythms* 24, 477–487. <https://doi.org/10.1177/0748730409349895>
- Houdek, P., Nováková, M., Polidarová, L., Sládek, M., Sumová, A., 2016. Melatonin is a redundant entraining signal in the rat circadian system. *Horm. Behav.* 83, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.05.006>
- Hu, C., Hill, D.D., Wong, K.Y., 2013. Intrinsic physiological properties of the five types of mouse ganglion-cell photoreceptors. *J. Neurophysiol.* 109, 1876–1889. <https://doi.org/10.1152/jn.00579.2012>
- Huang, H., Wang, Z., Weng, S.J., Sun, X.H., Yang, X.L., 2013. Neuromodulatory role of melatonin in retinal information processing. *Prog. Retin. Eye Res.* 32, 64–87. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.07.003>
- Huang, L., Xi, Y., Peng, Y., Yang, Y., Huang, X., Fu, Y., Tao, Q., Xiao, J., Yuan, T., An, K., Zhao, H., Pu, M., Xu, F., Xue, T., Luo, M., So, K.F., Ren, C., 2019. A Visual Circuit Related to Habenula Underlies the Antidepressive Effects of Light Therapy. *Neuron* 102, 128–142.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.037>
- Huang, L., Yuan, T., Tan, M., Xi, Y., Hu, Y., Tao, Q., Zhao, Z., Zheng, J., Han, Y., Xu, F., Luo, M., Sollars, P.J., Pu, M., Pickard, G.E., So, K.F., Ren, C., 2017. A retinorecipient projection regulates serotonergic activity and looming-evoked defensive behaviour. *Nat. Commun.* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14908>
- Hughes, S., Hankins, M.W., Foster, R.G., Peirson, S.N., 2012a. Melanopsin phototransduction: slowly emerging from the dark., 1st ed, Progress in brain research. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00002-2>
- Hughes, S., Rodgers, J., Hickey, D., Foster, R.G., Peirson, S.N., Hankins, M.W., 2016. Characterisation of light responses in the retina of mice lacking principle components of rod, cone and melanopsin phototransduction signalling pathways. *Sci. Rep.* 6, 28086. <https://doi.org/10.1038/srep28086>
- Hughes, S., Watson, T.S., Foster, R.G., Peirson, S.N., Hankins, M.W., 2013. Nonuniform distribution and spectral tuning of photosensitive retinal ganglion cells of the mouse retina. *Curr. Biol.* 23, 1696–1701. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.010>
- Hughes, S., Welsh, L., Katti, C., González-Menéndez, I., Turton, M., Halford, S., Sekaran, S., Peirson, S.N., Hankins, M.W., Foster, R.G., 2012b. Differential expression of melanopsin isoforms Opn4L and Opn4S during postnatal development of the mouse retina. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034531>
- Ichinose, T., Hellmer, C.B., 2016. Differential signalling and glutamate receptor compositions in the OFF bipolar cell types in the mouse retina. *J. Physiol.* 594, 883–894. <https://doi.org/10.1113/JP271458>

- Ingram, N.T., Sampath, A.P., Fain, G.L., 2016. Why are rods more sensitive than cones? *J. Physiol.* 594, 5415–5426. <https://doi.org/10.1113/JP272556>
- Isoldi, M.C., Rollag, M.D., De Lauro Castrucci, A.M., Provencio, I., 2005. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1217–1221. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409252102>
- Jaadane, I., Boulenguez, P., Chahory, S., Carré, S., Savoldelli, M., Jonet, L., Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Torriglia, A., 2015. Retinal damage induced by commercial light emitting diodes (LEDs). *Free Radic. Biol. Med.* 84, 373–384. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.034>
- Jacob, N., Vuillez, P., Lakdhar-Ghazal, N., Pévet, P., 1999. Does the intergeniculate leaflet play a role in the integration of the photoperiod by the suprachiasmatic nucleus? *Brain Res.* 828, 83–90. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01324-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01324-4)
- Jacobs, G.H., Williams, G.A., 2007. Contributions of the mouse UV photopigment to the ERG and to vision. *Doc. Ophthalmol.* 115, 137–144. <https://doi.org/10.1007/s10633-007-9055-z>
- Jaeger, C., Sandu, C., Malan, A., Mellac, K., Hicks, D., Felder-Schmittbuhl, M.-P., 2015. Circadian organization of the rodent retina involves strongly coupled, layer-specific oscillators. *FASEB J.* 1–12. <https://doi.org/10.1096/fj.14-261214>
- Jagannath, A., Hughes, S., Abdelgany, A., Potheary, C.A., Di Pretoro, S., Pires, S.S., Vachtsevanos, A., Pilorz, V., Brown, L.A., Hossbach, M., MacLaren, R.E., Halford, S., Gatti, S., Hankins, M.W., Wood, M.J.A., Foster, R.G., Peirson, S.N., 2015. Isoforms of Melanopsin Mediate Different Behavioral Responses to Light. *Curr. Biol.* 25, 2430–2434. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.071>
- Jain, V., Ravindran, E., Dhingra, N.K., 2012. Differential expression of Brn3 transcription factors in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in mouse. *J. Comp. Neurol.* 520, 742–755. <https://doi.org/10.1002/cne.22765>
- Jan, L.Y., Revel, J.P., 1974. Ultrastructural localization of rhodopsin in the vertebrate retina. *J. Cell Biol.* 62, 257–273. <https://doi.org/10.1083/jcb.62.2.257>
- Jeon, C.J., Strettoi, E., Masland, R.H., 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* 18, 8936–8946.
- Jeong, M.J., Kim, H.G., Jeon, C.J., 2018. The organization of melanopsin-immunoreactive cells in microbat retina. *PLoS One* 13, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190435>
- Jiang, Z., Yue, W.W.S., Chen, L., Sheng, Y., 2018. Phototransduction in Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells Phototransduction in Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. *Cell* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.055>
- Jiang, Z.G., Nelson, C.S., Allen, C.N., 1995. Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res.* 687, 125–132. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00478-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00478-9)
- Jilg, A., Bechstein, P., Saade, A., Dick, M., Li, T.X., Tosini, G., Rami, A., Zemmar, A., Stehle, J.H., 2019. Melatonin modulates daytime-dependent synaptic plasticity and learning efficiency. *J. Pineal Res.* 66, 1–17. <https://doi.org/10.1111/jpi.12553>
- Jilg, A., Moek, J., Weaver, D.R., Korf, H.W., Stehle, J.H., Von Gall, C., 2005. Rhythms in clock proteins in the mouse pars tuberalis depend on MT1 melatonin receptor signalling. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2845–2854. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04485.x>

- Jin, N.G., Ribelayga, C.P., 2016. Direct Evidence for Daily Plasticity of Electrical Coupling between Rod Photoreceptors in the Mammalian Retina. *J. Neurosci.* 36, 178–184. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3301-15.2016>
- Jin, X., von Gall, C., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., Stehle, J.H., Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2003. Targeted Disruption of the Mouse Mel1b Melatonin Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1054–1060. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.3.1054-1060.2003>
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J.A., Delagrangé, P., 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: What's new? *Br. J. Pharmacol.* 154, 1182–1195. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.184>
- Johnson, E.N., Westbrook, T., Shayesteh, R., Chen, E.L., Schumacher, J.W., Fitzpatrick, D., Field, G.D., 2019. Distribution and diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in tree shrew. *J. Comp. Neurol.* 527, 328–344. <https://doi.org/10.1002/cne.24377>
- Johnson, E.N., Westbrook, T., Shayesteh, R., Chen, E.L., Schumacher, J.W., Fitzpatrick, D., Field, G.D., 2017. Distribution and diversity of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in tree shrew. <https://doi.org/10.1002/cne>.
- Jones, K.A., Hatori, M., Mure, L.S., Bramley, J.R., Artymyshyn, R., Hong, S.P., Marzabadi, M., Zhong, H., Sprouse, J., Zhu, Q., Hartwick, A.T.E., Sollars, P.J., Pickard, G.E., Panda, S., 2013. Small-molecule antagonists of melanopsin-mediated phototransduction. *Nat. Chem. Biol.* 9, 630–635. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1333>
- Kalsbeek, A., Garidou, M.L., Palm, I.F., Van Vliet, J. Der, Simonneaux, V., Pévet, P., Buijs, R.M., 2000. Melatonin sees the light: Blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur. J. Neurosci.* 12, 3146–3154. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00202.x>
- Kankipati, L., Girkin, C.A., Gamlin, P.D., 2010. Post-illumination pupil response in subjects without ocular disease. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2764–2769. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4717>
- Kawasaki, A., 2017. Melanopsin-Mediated Acute Light Responses Measured in Winter and in Summer : Seasonal Variations in Adults with and without Cataracts 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00464>
- Kawasaki, A., Wisniewski, S., Healey, B., Pattyn, N., Kunz, D., Basner, M., Münch, M., 2018. Impact of long-term daylight deprivation on retinal light sensitivity, circadian rhythms and sleep during the Antarctic winter. *Sci. Rep.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33450-7>
- Kelishadi, R., Qorbani, M., Motlagh, M.E., Heshmat, R., Ardalan, G., Jari, M., 2015. Relationship between leisure time screen activity and aggressive and violent behaviour in Iranian children and adolescents: the CASPIAN-IV Study. *Paediatr. Int. Child Health* 35, 305–311. <https://doi.org/10.1080/20469047.2015.1109221>
- Kell, C.A., Stehle, J.H., 2005. Just the two of us: Melatonin and adenosine in rodent pituitary function. *Ann. Med.* 37, 105–120. <https://doi.org/10.1080/07853890510007296>
- Kerschensteiner, D., Guido, W., 2017. Visual thalamus, “it’s complicated.” *Vis. Neurosci.* 34, E018. <https://doi.org/10.1017/S0952523817000311>
- Khouja, J.N., Munafò, M.R., Tilling, K., Wiles, N.J., Joinson, C., Etchells, P.J., John, A., Hayes, F.M., Gage, S.H., Cornish, R.P., 2019. Is screen time associated with anxiety or depression in young people? Results from a UK birth cohort 11 Medical and Health Sciences 1117 Public Health and Health Services. *BMC Public Health* 19, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-6321-9>



- Kirkwood, A., Zhan, J., Thomsen, M.B., Hattar, S., Lazzerini Ospri, L., Fernandez, D.C., Layne, R.M., Zhao, H., Singer, J.H., Fogerson, P.M., Berson, D.M., Severin, D., 2018. Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell* 175, 71-84.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.004>
- Klante, G., Secci, K., Masson-Pévet, M., Pévet, P., Vivien-Roels, B., Steinlechner, S., Wollnik, F., 1999. Interstrain differences in activity pattern, pineal function, and SCN melatonin receptor density of rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 276. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.4.r1078>
- Klosen, P., Lapmanee, S., Schuster, C., Guardiola, B., Hicks, D., Pevet, P., Felder-Schmittbuhl, M.P., 2019. MT1 and MT2 melatonin receptors are expressed in nonoverlapping neuronal populations. *J. Pineal Res.* 67, 1–19. <https://doi.org/10.1111/jpi.12575>
- Klosen, P., Sébert, M.E., Rasri, K., Laran-Chich, M.P., Simonneaux, V., 2013. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* 27, 2677–2686. <https://doi.org/10.1096/fj.13-229559>
- Ko, C.H., Takahashi, J.S., 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15, 271–277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Kopp, C., 2001. Locomotor activity rhythm in inbred strains of mice: Implications for behavioural studies. *Behav. Brain Res.* 125, 93–96. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00289-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00289-3)
- Kopp, C., Vogel, E., Misslin, R., 1999. Comparative study of emotional behaviour in three inbred strains of mice. *Behav. Processes* 47, 161–174. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(99\)00057-1](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00057-1)
- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Guardiola-Lemaître, B., Misslin, R., 1998. Effects of a daylight cycle reversal on locomotor activity in several inbred strains of mice. *Physiol. Behav.* 63, 577–585. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00491-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00491-5)
- Korf, H.W., 2018. Signaling pathways to and from the hypophysial pars tuberalis, an important center for the control of seasonal rhythms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 258, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.05.011>
- Krieger, B., Qiao, M., Rouso, D.L., Sanes, J.R., Meister, M., 2017. Four alpha ganglion cell types in mouse retina: Function, structure, and molecular signatures. *PLoS One* 12, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180091>
- Krigel, A., Berdugo, M., Picard, E., Levy-Boukris, R., Jaadane, I., Jonet, L., Dernigoghossian, M., Andrieu-Soler, C., Torriglia, A., Behar-Cohen, F., 2016. Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience* 339, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.015>
- Lad, H.V., Liu, L., Paya-Cano, J.L., Parsons, M.J., Kember, R., Fernandes, C., Schalkwyk, L.C., 2010. Behavioural battery testing: Evaluation and behavioural outcomes in 8 inbred mouse strains. *Physiol. Behav.* 99, 301–316. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.11.007>
- Land, M.F., Fernald, R.D., 1992. The Evolution of Eyes. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.15.030192.000245>
- Laurent, V., Sengupta, A., Sánchez-Bretaña, A., Hicks, D., Tosini, G., 2017. Melatonin signaling affects the timing in the daily rhythm of phagocytic activity by the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 165, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.09.007>

- Lavoie, M., Lam, R.W., Bouchard, G., Sasseville, A., Charron, M., Gagné, A., Tremblay, P., Filteau, M., Hébert, M., 2009. Evidence of a Biological Effect of Light Therapy on the Retina of Patients with Seasonal Affective Disorder. *BPS* 66, 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.020>
- Lawrence, P.M., Studholme, K.M., 2014. Retinofugal projections in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 522, 3733–3753. <https://doi.org/10.1002/cne.23635>
- Lazzerini Ospri, L., Prusky, G., Hattar, S., 2017. Mood, the Circadian System, and Melanopsin Retinal Ganglion Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, 539–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031324>
- Lebow, M.A., Chen, A., 2016. Overshadowed by the amygdala: The bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 21, 450–463. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.1>
- Lee, S.K., Sonoda, T., Schmidt, T.M., 2019. M1 Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells Integrate Rod and Melanopsin Inputs to Signal in Low Light. *Cell Rep.* 29, 3349–3355.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.024>
- LeGates, T. a, Altimus, C.M., Wang, H., Lee, H.-K., Yang, S., Zhao, H., Kirkwood, A., Weber, E.T., Hattar, S., 2013. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature* 491, 594–598. <https://doi.org/10.1038/nature11673>
- Legates, T.A., Fernandez, D.C., Hattar, S., 2014. Light as a central modulator of circadian rhythms , sleep and affect. <https://doi.org/10.1038/nrn3743>
- LeGates, T.A., Kvarta, M.D., 2020. Illuminating a path from light to depression. *Nat. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0659-x>
- Leskov, I.B., Klenchin, V.A., Handy, J.W., Whitlock, G.G., Govardovskii, V.I., Bownds, M.D., Lamb, T.D., Pugh, E.N., Arshavsky, V.Y., 2000. The gain of rod phototransduction: Reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements. *Neuron* 27, 525–537. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00063-5)
- Li, J. Da, Hu, W.P., Zhou, Q.Y., 2012. The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei, 1st ed, *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00028-9>
- Li, J.Y., Schmidt, T.M., 2018. Divergent projection patterns of M1 ipRGC subtypes. *J. Comp. Neurol.* 526, 2010–2018. <https://doi.org/10.1002/cne.24469>
- Li, X., Ren, C., Huang, L., Lin, B., Pu, M., Pickard, G.E., So, K.F., 2015. The dorsal raphe nucleus receives afferents from alpha-like retinal ganglion cells and intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the rat. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 8373–8381. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-16614>
- Lissak, G., 2018. Adverse physiological and psychological effects of screen time on children and adolescents: Literature review and case study. *Environ. Res.* 164, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.015>
- Liu, C., Weaver, D.R., Jin, X., Shearman, L.P., Pieschl, R.L., Gribkoff, V.K., Reppert, S.M., 1997. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19, 91–102. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80350-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80350-5)
- Livingstone, M., Hubel, D., 1988. Segregation of form, color, movement, and depth: anatomy, physiology, and perception. *Science* 240, 740–9. <https://doi.org/10.1126/science.3283936>

- Lucas, R.J., Foster, R.G., 1999. Photoentrainment in mammals: A role for cryptochrome? *J. Biol. Rhythms* 14, 4–10. <https://doi.org/10.1177/074873099129000380>
- Lucas, R.J., Freedman, M.S., Muñoz, M., Garcia-Fernández, J.M., Foster, R.G., 1999. Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* (80-. ). 284, 505–507. <https://doi.org/10.1126/science.284.5413.505>
- Lucas, R.J., Peirson, S.N., Berson, D.M., Brown, T.M., Cooper, H.M., Czeisler, C. a., Figueiro, M.G., Gamlin, P.D., Lockley, S.W., O’Hagan, J.B., Price, L.L. a, Provencio, I., Skene, D.J., Brainard, G.C., 2014. Measuring and using light in the melanopsin age. *Trends Neurosci.* 37, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.10.004>
- Lundkvist, G.B., Block, G.D., 2005. Role of neuronal membrane events in circadian rhythm generation. *Methods Enzymol.* 393, 623–642. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)93033-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)93033-4)
- Madigan, S., Browne, D., Racine, N., Mori, C., Tough, S., 2019. Association between Screen Time and Children’s Performance on a Developmental Screening Test. *JAMA Pediatr.* 173, 244–250. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.5056>
- Malpaux, B., Thiéry, J.C., Chemineau, P., 1999. Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 39, 355–66. <https://doi.org/10.1051/rnd:19990308>
- Maras, D., Flament, M.F., Murray, M., Buchholz, A., Henderson, K.A., Obeid, N., Goldfield, G.S., 2015. Screen time is associated with depression and anxiety in Canadian youth. *Prev. Med. (Baltim).* 73, 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2015.01.029>
- Marc, R.E., Sigulinsky, C.L., Pfeiffer, R.L., Emrich, D., Anderson, J.R., Jones, B.W., 2018. Heterocellular coupling between amacrine cells and ganglion cells. *Front. Neural Circuits* 12, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00090>
- Martin, P.R., 2004. Colour through the thalamus. *Clin. Exp. Optom.* 87, 249–257. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2004.tb05055.x>
- Masana, M.I., Benloucif, S., Dubocovich, M.L., 1996. Light-induced c-fos mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus and the retina of C3H/HeN mice. *Mol. Brain Res.* 42, 193–201. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(96\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(96)00031-9)
- Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 2001. Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci. STKE* 2001, 1–6. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.107.pe39>
- Masland, R.H., 2012. The tasks of amacrine cells. *Vis. Neurosci.* 29, 3–9. <https://doi.org/10.1017/S0952523811000344>
- Masland, R.H., 2005. The many roles of starburst amacrine cells. *Trends Neurosci.* 28, 395–396. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.06.002>
- Masland, R.H., Rizzo, J.F., Sandell, J.H., 1993. Developmental variation in the structure of the retina. *J. Neurosci.* 13, 5194–5202. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-12-05194.1993>
- Masumoto, K.H., Ukai-Tadenuma, M., Kasukawa, T., Nagano, M., Uno, K.D., Tsujino, K., Horikawa, K., Shigeyoshi, Y., Ueda, H.R., 2010. Acute induction of Eya3 by late-night light stimulation triggers TSH $\beta$  expression in photoperiodism. *Curr. Biol.* 20, 2199–2206. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.038>
- Mathes, A., Engel, L., Holthues, H., Wolloscheck, T., Spessert, R., 2007. Daily Profile in Melanopsin Transcripts Depends on Seasonal Lighting Conditions in the Rat Retina *Neuroendocrinology* 952–957. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01608.x>

- May, P.J., 2006. The mammalian superior colliculus: Laminar structure and connections. *Prog. Brain Res.* 151, 321–378. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(05\)51011-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(05)51011-2)
- Meesters, Y., Gordijn, M.C.M., 2016. Seasonal affective disorder, winter type: Current insights and treatment options. *Psychol. Res. Behav. Manag.* 9, 317–327. <https://doi.org/10.2147/PRBM.S114906>
- Mendoza-Viveros, L., Chiang, C.K., Ong, J.L.K., Hegazi, S., Cheng, A.H., Bouchard-Cannon, P., Fana, M., Lowden, C., Zhang, P., Bothorel, B., Michniewicz, M.G., Magill, S.T., Holmes, M.M., Goodman, R.H., Simonneaux, V., Figeys, D., Cheng, H.Y.M., 2017. miR-132/212 Modulates Seasonal Adaptation and Dendritic Morphology of the Central Circadian Clock. *Cell Rep.* 19, 505–520. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.057>
- Metzger, J., Wicht, H., Korf, H.W., Pfeffer, M., 2019. Seasonal Variations of Locomotor Activity Rhythms in Melatonin-Proficient and -Deficient Mice under Seminatural Outdoor Conditions. *J. Biol. Rhythms* 1–14. <https://doi.org/10.1177/0748730419881922>
- Min, J. young, Min, K. bok, 2018. Outdoor light at night and the prevalence of depressive symptoms and suicidal behaviors: A cross-sectional study in a nationally representative sample of Korean adults. *J. Affect. Disord.* 227, 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2017.10.039>
- Mitrofanis, J., 2005. Some certainty for the “zone of uncertainty”? Exploring the function of the zona incerta. *Neuroscience* 130, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.017>
- Moore, R.Y., 2013. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system, 1st ed, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00001-4>
- Moore, R.Y., Speh, J.C., Patrick Card, J., 1995. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 352, 351–366. <https://doi.org/10.1002/cne.903520304>
- Morin, L.P., Blanchard, J.H., Provencio, I., 2003. Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: Bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 465, 401–416. <https://doi.org/10.1002/cne.10881>
- Morin, L.P., Studholme, K.M., 2011. Separation of function for classical and ganglion cell photoreceptors with respect to circadian rhythm entrainment and induction of photosomnolence. *Neuroscience* 199, 213–224. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.057>
- Mouland, J.W., Martial, F., Watson, A., Lucas, R.J., Brown, T.M., 2019. Cones Support Alignment to an Inconsistent World by Suppressing Mouse Circadian Responses to the Blue Colors Associated with Twilight. *Curr. Biol.* 29, 4260–4267.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.028>
- Muindi, F., Zeitzer, J.M., Heller, H.C., 2014. Retino-hypothalamic regulation of light-induced murine sleep. *Front. Syst. Neurosci.* 8, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2014.00135>
- Munch, M., 2005. Wavelength-dependent effects of evening light exposure on sleep architecture and sleep EEG power density in men. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1421–R1428. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00478.2005>
- Münch, M., Nowozin, C., Regente, J., Bes, F., De Zeeuw, J., Hädel, S., Wahnschaffe, A., Kunz, D., 2017. Blue-Enriched Morning Light as a Countermeasure to Light at the Wrong Time: Effects on Cognition, Sleepiness, Sleep, and Circadian Phase. *Neuropsychobiology* 74, 207–218. <https://doi.org/10.1159/000477093>

- Mure, L.S., Rieux, C., Hattar, S., Cooper, H.M., 2007. Melanopsin-dependent nonvisual responses: Evidence for photopigment bistability in vivo. *J. Biol. Rhythms* 22, 411–424. <https://doi.org/10.1177/0748730407306043>
- Muscat, L., Tischler, R.C., Morin, L.P., 2005. Functional analysis of the role of the median raphe as a regulator of hamster circadian system sensitivity to light. *Brain Res.* 1044, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.02.083>
- Musshoff, U., Riewenherm, D., Berger, E., Fauteck, J.D., Speckmann, E.J., 2002. Melatonin receptors in rat hippocampus: Molecular and functional investigations. *Hippocampus* 12, 165–173. <https://doi.org/10.1002/hipo.1105>
- Myung, J., Hong, S., DeWoskin, D., De Schutter, E., Forger, D.B., Takumi, T., 2015. GABA-mediated repulsive coupling between circadian clock neurons in the SCN encodes seasonal time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E3920–E3929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421200112>
- Nassi, J.J., Callaway, E.M., 2009. Parallel processing strategies of the primate visual system. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 360–372. <https://doi.org/10.1038/nrn2619>
- Nelson, R., Famiglietti, E. V., Kolb, H., 1978. Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J. Neurophysiol.* 41, 472–483. <https://doi.org/10.1152/jn.1978.41.2.472>
- Nelson, R.J., Trainor, B.C., 2007. Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 536–546. <https://doi.org/10.1038/nrn2174>
- Niranjan, A., Christie, I.N., Solomon, S.G., Wells, J.A., Lythgoe, M.F., 2016. fMRI mapping of the visual system in the mouse brain with interleaved snapshot GE-EPI. *Neuroimage* 139, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2016.06.015>
- Nosjean, O., Nicolas, J.P., Klupsch, F., Delagrangé, P., Canet, E., Boutin, J.A., 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1369–1379. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00615-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00615-3)
- Ono, H., Hoshino, Y., Yasuo, S., Watanabe, M., Nakane, Y., Murai, A., 2008. 2008 - Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.pdf 2–6.
- Organisciak, D.T., Vaughan, D.K., 2010. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 113–134. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.11.004>
- Organisciak, D.T., Winkler, B.S., 1994. Retinal light damage: Practical and theoretical considerations. *Prog. Retin. Eye Res.* 13, 1–29. [https://doi.org/10.1016/1350-9462\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/1350-9462(94)90003-5)
- Ortiñ-Martínez, A., Nadal-Nicolás, F.M., Jiménez-López, M., Alburquerque-Béjar, J.J., Nieto-López, L., García-Ayuso, D., Villegas-Pérez, M.P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2014. Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: Differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain. *PLoS One* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102392>
- Pack, W., Hill, D.D., Wong, K.Y., 2015. Melatonin modulates M4-type ganglion-cell photoreceptors. *Neuroscience* 303, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.046>
- Pack, W., Hill, D.D., Wong, K.Y., 2015. Melatonin modulates M4-type ganglion-cell photoreceptors. *Neuroscience* 303, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.046>

- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., Kay, S.A., 2002. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* (80-. ). 298, 2213–2216. <https://doi.org/10.1126/science.1076848>
- Pandi-Perumal, S.R., Trakht, I., Srinivasan, V., Spence, D.W., Maestroni, G.J.M., Zisapel, N., Cardinali, D.P., 2008. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog. Neurobiol.* 85, 335–353. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.04.001>
- Pardue, M.T., Peachey, N.S., 2014. Mouse b-wave mutants 77–89. <https://doi.org/10.1007/s10633-013-9424-8>
- Peachey, N.S., Hasan, N., Fitzmaurice, B., Burrill, S., Pageni, G., Karst, S.Y., Reinholdt, L., Berry, M.L., Strobel, M., Gregg, R.G., McCall, M.A., Chang, B., 2017. A missense mutation in *Grm6* reduces but does not eliminate mGluR6 expression or rod depolarizing bipolar cell function. *J. Neurophysiol.* 118, 845–854. <https://doi.org/10.1152/jn.00888.2016>
- Pendergast, J.S., Yamazaki, S., 2011. Masking responses to light in period mutant mice. *Chronobiol. Int.* 28, 657–663. <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.596296>
- Peng, Z.C., Bentivoglio, M., 2004. The thalamic paraventricular nucleus relays information from the suprachiasmatic nucleus to the amygdala: A combined anterograde and retrograde tracing study in the rat at the light and electron microscopic levels. *J. Neurocytol.* 33, 101–116. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000029651.51195.f9>
- Pérez De Sevilla Müller, L., Do, M.T.H., Yau, K.W., He, S., Baldrige, W.H., 2010. Tracer coupling of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells to amacrine cells in the mouse retina. *J. Comp. Neurol.* 518, 4813–4824. <https://doi.org/10.1002/cne.22490>
- Perreau-Lenz, S., Kalsbeek, A., Garidou, M.L., Wortel, J., Van Der Vliet, J., Van Heijningen, C., Simonneaux, V., Pévet, P., Buijs, R.M., 2003. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: Inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 17, 221–228. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02442.x>
- Petit, L., Lacroix, I., De Coppet, P., Strosberg, A.D., Jockers, R., 1999. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem. Pharmacol.* 58, 633–639. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00134-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00134-3)
- Pfeffer, M., Korf, H.W., Wicht, H., 2017. The role of the melatonergic system in light-entrained behavior of mice. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030530>
- Pfeffer, M., Rauch, A., Korf, H.W., Von Gall, C., 2012. The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiol. Int.* 29, 415–429. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.667859>
- Pierce, M.E., Besharse, J.C., 1988. Circadian regulation of retinomotor movements: II. The role of gaba in the regulation of cone position. *J. Comp. Neurol.* 270, 279–287. <https://doi.org/10.1002/cne.902700208>
- Pilorz, V., Tam, S.K.E., Hughes, S., Potheary, C.A., Jagannath, A., Hankins, M.W., Bannerman, D.M., Lightman, S.L., Vyazovskiy, V. V., Nolan, P.M., Foster, R.G., Peirson, S.N., 2016. Melanopsin Regulates Both Sleep-Promoting and Arousal-Promoting Responses to Light. *PLoS Biol.* 14, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002482>

- Pires, S.S., Hughes, S., Turton, M., Melyan, Z., Peirson, S.N., Zheng, L., Kosmaoglou, M., Bellingham, J., Cheetham, M.E., Lucas, R.J., Foster, R.G., Hankins, M.W., Halford, S., 2009. Differential expression of two distinct functional isoforms of melanopsin (Opn4) in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 29, 12332–12342. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2036-09.2009>
- Poeggeler, B., Rj, R., D-x, T., L-d, C., Lc, M., Chen, L., 1993. damage , and aging : A hypothesis.
- Porcu, A., Riddle, M., Dulcis, D., Welsh, D.K., 2018. Photoperiod-induced neuroplasticity in the circadian system. *Neural Plast.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5147585>
- Prayag, A.S., Jost, S., Avouac, P., Dumortier, D., Gronfier, C., 2019a. Dynamics of Non-visual Responses in Humans: As Fast as Lightning? *Front. Neurosci.* 13, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00126>
- Prayag, A.S., Najjar, R.P., Gronfier, C., 2019b. Melatonin suppression is exquisitely sensitive to light and primarily driven by melanopsin in humans. *J. Pineal Res.* 66, 1–8. <https://doi.org/10.1111/jpi.12562>
- Prigge, C.L., Yeh, P.-T., Liou, N.-F., Lee, C.-C., You, S.-F., Liu, L.-L., McNeill, D.S., Chew, K.S., Hattar, S., Chen, S.-K., Zhang, D.-Q., 2016. M1 ipRGCs Influence Visual Function through Retrograde Signaling in the Retina. *J. Neurosci.* 36, 7184–97. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3500-15.2016>
- Proietti, S., Cucina, A., Minini, M., Bizzarri, M., 2017. Melatonin, mitochondria, and the cancer cell. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 4015–4025. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2612-z>
- Prosser, R.A., Macdonald, E.S., Heller, H.C., 1994. Rhythm and Responds To a Serotonergic Agonist 25, 151–156.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P., Rollag, M.D., 1998. Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 340–5.
- Provencio, I., Rodriguez, I.R., Jiang, G., Hayes, W.P., Moreira, E.F., Rollag, M.D., 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20, 600–605. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-02-00600.2000>
- Purrier, N., Engeland, W.C., Kofuji, P., 2014. Mice deficient of glutamatergic signaling from intrinsically photosensitive retinal ganglion cells exhibit abnormal circadian photoentrainment. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111449>
- Quattrochi, L.E., Stabio, M.E., Kim, I., Ilardi, M.C., Michelle Fogerson, P., Leyrer, M.L., Berson, D.M., 2019. The M6 cell: A small-field bistratified photosensitive retinal ganglion cell. *J. Comp. Neurol.* 527, 297–311. <https://doi.org/10.1002/cne.24556>
- Redlin, U., 2001. Neural basis and biological function of masking by light in mammals: Suppression of melatonin and locomotor activity. *Chronobiol. Int.* 18, 737–758. <https://doi.org/10.1081/CBI-100107511>
- Redman, J.R., Armstrong, S.M., 1988. Reentrainment of rat circadian activity rhythms: effects of melatonin. *J.Pineal Res.* 5, 203–215.
- Refinetti, R., 2015. Comparison of light, food, and temperature as environmental synchronizers of the circadian rhythm of activity in mice. *J. Physiol. Sci.* 65, 359–366. <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0374-7>

- Reifler, A.N., Chervenak, A.P., Dolikian, M.E., Benenati, B. a, Meyers, B.S., Demertzis, Z.D., Lynch, A.M., Li, B.Y., Wachter, R.D., Abufarha, F.S., Dulka, E. a, Pack, W., Zhao, X., Wong, K.Y., 2015. The rat retina has five types of ganglion-cell photoreceptors. *Exp. Eye Res.* 130, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.11.010>
- Reppert, S.M., Weaver, D.R., 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 647–676. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.647>
- Revell, V.L., Molina, T.A., Eastman, C.I., 2012. Human phase response curve to intermittent blue light using a commercially available device. *J. Physiol.* 590, 4859–4868. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235416>
- Ribelayga, C., Cao, Y., Mangel, S.C., 2008. The Circadian Clock in the Retina Controls Rod-Cone Coupling. *Neuron* 59, 790–801. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.07.017>
- Roecklein, K., Wong, P., Ernecoff, N., Miller, M., Donofry, S., Kamarck, M., Wood-Vasey, W.M., Franzen, P., 2013. The post illumination pupil response is reduced in seasonal affective disorder. *Psychiatry Res.* 210, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.05.023>
- Roecklein, K.A., Rohan, K.J., Duncan, W.C., Rollag, M.D., Rosenthal, N.E., Lipsky, R.H., Provencio, I., 2009. A missense variant (P10L) of the melanopsin (OPN4) gene in seasonal affective disorder. *J. Affect. Disord.* 114, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.08.005>
- Rohling, J., Meijer, J.H., VanderLeest, H.T., Admiraal, J., 2006. Phase differences between SCN neurons and their role in photoperiodic encoding; a simulation of ensemble patterns using recorded single unit electrical activity patterns. *J. Physiol. Paris* 100, 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2007.05.005>
- Ruan, G.X., Allen, G.C., Yamazaki, S., McMahan, D.G., 2008. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol.* 6, 2248–2265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060249>
- Ruda, K., Hatori, M., Benegiamo, G., Panda, S., Mure, L.S., Demas, J., 2018. Sustained Melanopsin Photoresponse Is Supported by Specific Roles of  $\beta$ -Arrestin 1 and 2 in Deactivation and Regeneration of Photopigment. *Cell Rep.* 25, 2497-2509.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.008>
- Rusak, B., Groos, G., 1982. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* (80-. ). 215, 1407–1409. <https://doi.org/10.1126/science.7063851>
- Sakamoto, K., Liu, C., Kasamatsu, M., Pozdeyev, N. V., Iuvone, P.M., Tosini, G., 2005. Dopamine regulates melanopsin mRNA expression in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 3129–3136. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04512.x>
- Sakamoto, K., Liu, C., Tosini, G., 2004. Classical photoreceptors regulate Melanopsin mRNA levels in the rat retina. *J. Neurosci.* 24, 9693–9697. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2556-04.2004>
- Sanes, J.R., Masland, R.H., 2015. The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annu. Rev. Neurosci.* 38, 221–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-034120>
- Scher, J., Wankiewicz, E., Brown, G.M., Fujieda, H., 2002. MT1 melatonin receptor in the human retina: Expression and localization. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 889–897.
- Schmidt, C., Xhrouet, M., Hamacher, M., Delloye, E., Legoff, C., Cavalier, E., Collette, F., Vandewalle, G., 2018. Light exposure via a head-mounted device suppresses melatonin and improves vigilant attention without affecting cortisol and comfort. *PsyCh J.* 1–13. <https://doi.org/10.1002/pchj.215>



- Schmidt, T.M., Kofuji, P., 2011. Structure and function of bistratified intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 519, 1492–1504. <https://doi.org/10.1002/cne.22579>
- Schmidt, T.M., Kofuji, P., 2010. Differential Cone Pathway Influence on Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell Subtypes. *J. Neurosci.* 30, 16262–16271. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3656-10.2010>
- Schmidt, T.M., Kofuji, P., 2009. Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 29, 476–482. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4117-08.2009>
- Schwartz, G.W., Okawa, H., Dunn, F.A., Morgan, J.L., Kerschensteiner, D., Wong, R.O., Rieke, F., 2012. The spatial structure of a nonlinear receptive field. *Nat. Neurosci.* 15, 1572–1580. <https://doi.org/10.1038/nn.3225>
- Scott, A.L., Bortolato, M., Chen, K., Shih, J.C., 2008. Novel monoamine oxidase A knock out mice with human-like spontaneous mutation. *Neuroreport* 19, 739–743. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3282fd6e88>
- Sengupta, A., Baba, K., Mazzoni, F., Pozdeyev, N. V., Strettoi, E., Iuvone, P.M., Tosini, G., 2011. Localization of Melatonin receptor 1 in mouse retina and its role in the circadian regulation of the electroretinogram and dopamine levels. *PLoS One* 6, 11–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024483>
- Sheehan, T.P., Chambers, R.A., Russell, D.S., 2004. Regulation of affect by the lateral septum: Implications for neuropsychiatry. *Brain Res. Rev.* 46, 71–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.009>
- Sheng, W.L., Chen, W.Y., Yang, X.L., Zhong, Y.M., Weng, S.J., 2015. Co-expression of two subtypes of melatonin receptor on rat m1-type intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117967>
- Simonneaux, V., Ribelayga, C., 2003. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters 55, 325–395. <https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2.325>
- Singh, K., Jha, N.K., Thakur, A., 2019. Spatiotemporal chromatin dynamics - A telltale of circadian epigenetic gene regulation. *Life Sci.* 221, 377–391. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.02.006>
- Slominski, R.M., Reiter, R.J., Schlabritz-Loutsevitch, N., Ostrom, R.S., Slominski, A.T., 2012. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.01.004>
- Smeijers, D., Bulten, E., Franke, B., Buitelaar, J., Verkes, R.J., 2017. Associations of multiple trauma types and MAOA with severe aggressive behavior and MAOA effects on training outcome. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 30, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.06.016>
- Sollars, P.J., Smeraski, C.A., Kaufman, J.D., Ogilvie, M.D., Provencio, I., Pickard, G.E., 2003. Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus 601–610.
- Somasundaram, P., Wyrick, G.R., Fernandez, D.C., Ghahari, A., Pinhal, C.M., Richardson, M.S., Rupp, A.C., Cui, L., Wu, Z., Brown, R.L., Badea, T.C., Hattar, S., Robinson, P.R., 2017. C-terminal phosphorylation regulates the kinetics of a subset of melanopsin-mediated behaviors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 2741–2746. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611893114>

- Sommer, M.E., Smith, W.C., Farrens, D.L., 2005. Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: Arrestin and retinal release are directly linked events. *J. Biol. Chem.* 280, 6861–6871. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411341200>
- Sondereker, K.B., Stabio, M.E., Renna, J.M., 2020. Crosstalk: The diversity of melanopsin ganglion cell types has begun to challenge the canonical divide between image-forming and non-image-forming vision. *J. Comp. Neurol.* 528, 2044–2067. <https://doi.org/10.1002/cne.24873>
- Sonoda, T., Lee, S.K., Birnbaumer, L., Schmidt, T.M., 2018. Melanopsin Phototransduction Is Repurposed by ipRGC Subtypes to Shape the Function of Distinct Visual Circuits. *Neuron* 99, 754–767.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.032>
- Sonoda, T., Li, J.Y., Hayes, N.W., Chan, J.C., Okabe, Y., Belin, S., Nawabi, H., Schmidt, T.M., 2020a. A noncanonical inhibitory circuit dampens behavioral sensitivity to light. *Science* (80-. ). 368, 527–531. <https://doi.org/10.1126/science.aay3152>
- Sonoda, T., Okabe, Y., Schmidt, T.M., 2020b. Overlapping morphological and functional properties between M4 and M5 intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 528, 1028–1040. <https://doi.org/10.1002/cne.24806>
- Spitschan, M., Lazar, R., Yetik, E., Cajochen, C., 2019. No evidence for an S cone contribution to acute neuroendocrine and alerting responses to light. *Curr. Biol.* 29, R1297–R1298. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.031>
- Stabio, M.E., Sabbah, S., Quattrochi, L.E., Ilardi, M.C., Fogerson, P.M., Leyrer, M.L., Kim, M.T., Kim, I., Schiel, M., Renna, J.M., Briggman, K.L., Berson, D.M., 2018. The M5 Cell: A Color-Opponent Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell. *Neuron* 97, 251. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.030>
- Stachurska, A., Sarna, T., 2019. Regulation of Melanopsin Signaling: Key Interactions of the Nonvisual Photopigment. *Photochem. Photobiol.* 95, 83–94. <https://doi.org/10.1111/php.12995>
- Stehle, J.H., von Gall, C., Korf, H.W., 2003. Melatonin: A clock-output, a clock-input. *J. Neuroendocrinol.* 15, 383–389. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01001.x>
- Stehle, J.H., Von Gall, C., Korf, H.W., 2002. Organisation of the circadian system in melatonin-proficient C3H and melatonin-deficient C57BL mice: A comparative investigation. *Cell Tissue Res.* 309, 173–182. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0583-2>
- Stephan, F.K., Zucker, I., 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1583–1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.6.1583>
- Stephenson, K.M., Schroder, C.M., Bertschy, G., Bourgin, P., 2012. Complex interaction of circadian and non-circadian effects of light on mood : Shedding new light on an old story. *Sleep Med. Rev.* 16, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2011.09.002>
- Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- Sun, Y., Liu, Chao, Huang, M., Huang, J., Liu, Changhong, Zhang, J., Postlethwait, J.H., Wang, H., 2019. The molecular evolution of circadian clock genes in spotted gar (*Lepisosteus oculatus*). *Genes* (Basel). 10. <https://doi.org/10.3390/genes10080622>
- Sylvester, C.M., Krout, K.E., Loewy, A.D., 2002. Suprachiasmatic nucleus projection to the medial prefrontal cortex: A viral transneuronal tracing study. *Neuroscience* 114, 1071–1080. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00361-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00361-5)

- Tackenberg, M.C., McMahon, D.G., 2018. Photoperiodic Programming of the SCN and Its Role in Photoperiodic Output. *Neural Plast.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8217345>
- Takahashi, A., Miczek, K.A., 2014. Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 17, 3–44. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2013\\_263](https://doi.org/10.1007/7854_2013_263)
- Takahashi, J.S., Hong, H.K., Ko, C.H., McDearmon, E.L., 2008. The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 764–775. <https://doi.org/10.1038/nrg2430>
- Thompson, S., Recober, A., Vogel, T.W., Kuburas, A., Owens, J.A., Sheffield, V.C., Russo, A.F., Stone, E.M., 2010. Light aversion in mice depends on nonimage-forming irradiance detection. *Behav. Neurosci.* 124, 821–7. <https://doi.org/10.1037/a0021568>
- Thoreson, W.B., Dacey, D.M., 2019. Diverse Cell Types, Circuits, and Mechanisms for Color Vision in the Vertebrate Retina. *Physiol. Rev.* 99, 1527–1573. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2018>
- Thorne, H.C., Jones, K.H., Peters, S.P., Archer, S.N., Dijk, D.J., 2009. Daily and seasonal variation in the spectral composition of light exposure in humans. *Chronobiol. Int.* 26, 854–866. <https://doi.org/10.1080/07420520903044315>
- Tian, L., Kammermeier, P.J., 2006. G protein coupling profile of mGluR6 and expression of G $\alpha$  proteins in retinal ON bipolar cells. *Vis. Neurosci.* 23, 909–916. <https://doi.org/10.1017/S0952523806230268>
- Todd, W.D., Fenselau, H., Wang, J.L., Zhang, R., Machado, N.L., Venner, A., Broadhurst, R.Y., Kaur, S., Lynagh, T., Olson, D.P., Lowell, B.B., Fuller, P.M., Saper, C.B., 2018. A hypothalamic circuit for the circadian control of aggression. *Nat. Neurosci.* 21, 717–724. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0126-0>
- Todd, W.D., Machado, N.L., 2019. A time to fight: Circadian control of aggression and associated autonomic support. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 217, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2018.12.008>
- Tosini, G., Ferguson, I., Tsubota, K., 2016. Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. *Mol. Vis.* 22, 61–72.
- Tosini, G., Fukuhara, C., 2003. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J. Neuroendocrinol.* 15, 364–369. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.00973.x>
- Tosini, G., Menaker, M., 1996. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science (80-. )*. 272, 419–421. <https://doi.org/10.1126/science.272.5260.419>
- Touitou, Y., Touitou, D., Reinberg, A., 2016. Disruption of adolescents' circadian clock: The vicious circle of media use, exposure to light at night, sleep loss and risk behaviors. *J. Physiol. Paris* 110, 467–479. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2017.05.001>
- Tournier, B.B., Birkenstock, J., Pévet, P., Vuillez, P., 2009. Gene expression in the suprachiasmatic nuclei and the photoperiodic time integration. *Neuroscience* 160, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.002>
- Travis, A.M., Heflin, S.J., Hirano, A.A., Brecha, N.C., Arshavsky, V.Y., 2018. Dopamine-dependent sensitization of rod bipolar cells by GABA is conveyed through wide-field amacrine cells. *J. Neurosci.* 38, 723–732. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1994-17.2017>

- Triqueneaux, G., Thenot, S., Kakizawa, T., Antoch, M.P., Safi, R., Takahashi, J.S., Delaunay, F., Laudet, V., 2004. The orphan receptor Rev-erb $\alpha$  gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 585–608. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01554>
- Tsukamoto, Y., Morigiwa, K., Ueda, M., Sterling, P., 2001. Microcircuits for night vision in mouse retina. *J. Neurosci.* 21, 8616–8623. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-21-08616.2001>
- Unfried, C., Ansari, N., Yasuo, S., Korf, H.W., Von Gall, C., 2009. Impact of melatonin and molecular clockwork components on the expression of thyrotropin  $\beta$ -chain (Tshb) and the Tsh receptor in the mouse pars tuberalis. *Endocrinology* 150, 4653–4662. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0609>
- Valiente-Soriano, F.J., García-Ayuso, D., Ortín-Martínez, A., Jiménez-López, M., Galindo-Romero, C., Villegas-Pérez, M.P., Agudo-Barriuso, M., Vugler, A.A., Vidal-Sanz, M., 2014. Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front. Neuroanat.* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00131>
- Van Diepen, H.C., Ramkisoensing, A., Peirson, S.N., Foster, R.G., Meijer, J.H., 2013. Irradiance encoding in the suprachiasmatic nuclei by rod and cone photoreceptors. *FASEB J.* 27, 4204–4212. <https://doi.org/10.1096/fj.13-233098>
- Van Gelder, R.N., Buhr, E.D., 2016. Melanopsin: The Tale of the Tail. *Neuron* 90, 909–911. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.033>
- Van Hook, M.J., Wong, K.Y., Berson, D.M., 2012. Dopaminergic modulation of ganglion-cell photoreceptors in rat. *Eur. J. Neurosci.* 35, 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07975.x>
- VanderLeest, H.T., Rohling, J.H.T., Michel, S., Meijer, J.H., 2009. Phase shifting capacity of the circadian pacemaker determined by the SCN neuronal network organization. *PLoS One* 4, 2–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004976>
- Vandewalle, G., Balteau, E., Phillips, C., Degueldre, C., Moreau, V., Sterpenich, V., Albouy, G., Darsaud, A., Desseilles, M., Dang-Vu, T.T., Peigneux, P., Luxen, A., Dijk, D.J., Maquet, P., 2006. Daytime Light Exposure Dynamically Enhances Brain Responses. *Curr. Biol.* 16, 1616–1621. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.031>
- Vandewalle, G., Collignon, O., Hull, J.T., Daneault, V., Albouy, G., Lepore, F., Phillips, C., Doyon, J., Czeisler, C.A., Dumont, M., Lockley, S.W., Carrier, J., 2013. Blue Light Stimulates Cognitive Brain Activity in Visually Blind Individuals. *J. Cogn. Neurosci.* 25, 2072–2085. [https://doi.org/10.1162/jocn\\_a\\_00450](https://doi.org/10.1162/jocn_a_00450)
- Vandewalle, G., Hébert, M., Beaulieu, C., Richard, L., Daneault, V., Garon, M., Lou, Leblanc, J., Grandjean, D., Maquet, P., Schwartz, S., Dumont, M., Doyon, J., Carrier, J., 2011. Abnormal hypothalamic response to light in seasonal affective disorder. *Biol. Psychiatry* 70, 954–961. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.06.022>
- Vandewalle, G., Schmidt, C., Albouy, G., Sterpenich, V., Darsaud, A., Rauchs, G., Berken, P.Y., Balteau, E., Dagueldre, C., Luxen, A., Maquet, P., Dijk, D.J., 2007. Brain responses to violet, blue, and green monochromatic light exposures in humans: Prominent role of blue light and the brainstem. *PLoS One* 2, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001247>
- Vanselow, K., Kramer, A., 2007. Role of phosphorylation in the mammalian circadian clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 167–176. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.036>

- Varedi, M.K.S., Ventura, A.C., Merajver, S.D., Lin, X.N., 2010. Multisite phosphorylation provides an effective and flexible mechanism for switch-like protein degradation. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014029>
- von Gall, C., Duffield, G.E., Hastings, M.H., Kopp, M.D., Dehghani, F., Korf, H.W., Stehle, J.H., 1998. CREB in the mouse SCN: a molecular interface coding the phase-adjusting stimuli light, glutamate, PACAP, and melatonin for clockwork access. *J. Neurosci.* 18, 10389–10397.
- Von Gall, C., Weaver, D.R., Kock, M., Korf, H.W., Stehle, J.H., 2000. Melatonin limits transcriptional impact of phosphoCREB in the mouse SCN via the Mel(1a) receptor. *Neuroreport* 11, 1803–1807. <https://doi.org/10.1097/00001756-200006260-00002>
- Von Gall, C., Weaver, D.R., Moek, J., Jilg, A., Stehle, J.H., Korf, H.W., 2005. Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse pars tuberalis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 508–511. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.105>
- Wahl, S., Engelhardt, M., Schaupp, P., Lappe, C., Ivanov, I. V., 2019. The inner clock—Blue light sets the human rhythm. *J. Biophotonics* 12, 1–14. <https://doi.org/10.1002/jbio.201900102>
- Walmsley, L., Hanna, L., Mouland, J., Martial, F., West, A., Smedley, A.R., Bechtold, D.A., Webb, A.R., Lucas, R.J., Brown, T.M., 2015. Colour As a Signal for Entraining the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol.* 13, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002127>
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., Kay, S.A., 2010. Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties SCN: suprachiasmatic nucleus. *Annu. Rev. Physiol* 72, 551–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Weng, S., Wong, K.Y., Berson, D.M., 2009. Circadian modulation of melanopsin-driven light response in rat ganglion-cell photoreceptors. *J. Biol. Rhythms* 24, 391–402. <https://doi.org/10.1177/0748730409343767>
- Weng, S.J., Renna, J.M., Chen, W.Y., Yang, X.L., 2018. Functional assessment of melanopsin-driven light responses in the mouse: Multielectrode array recordings. *Methods Mol. Biol.* 1753, 289–303. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7720-8\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7720-8_20)
- Wernet, M.F., Perry, M.W., Desplan, C., 2015. The evolutionary diversity of insect retinal mosaics: common design principles and emerging molecular logic. *Trends Genet.* 31, 316–28. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.04.006>
- Wiechmann, A.F., Sherry, D.M., 2013. Role of Melatonin and its Receptors in the Vertebrate Retina, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405210-9.00006-0>
- Witkovsky, P., 2004. Dopamine and retinal function. *Doc. Ophthalmol.* 108, 17–39. <https://doi.org/10.1023/B:DOOP.0000019487.88486.0a>
- Witt-Enderby, P.A., Masana, M.I., Dubocovich, M.L., 1998. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mt1 melatonin receptor. *Endocrinology* 139, 3064–3071. <https://doi.org/10.1210/endo.139.7.6102>
- Wittkowski, W., Bergmann, M., Hoffmann, K., Pera, F., 1988. Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res.* 251, 183–187. <https://doi.org/10.1007/BF00215463>
- Wolf, G., 2003. Lipofuscin and Macular Degeneration. *Nutr. Rev.* 61, 342–346. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.oct.342-346>

- Wong, K.Y., Dunn, F.A., Graham, D.M., Berson, D.M., 2007. Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J. Physiol.* 582, 279–296. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.133751>
- Wong, L.C., Wang, L., D'Amour, J.A., Yumita, T., Chen, G., Yamaguchi, T., Chang, B.C., Bernstein, H., You, X., Feng, J.E., Froemke, R.C., Lin, D., 2016. Effective Modulation of Male Aggression through Lateral Septum to Medial Hypothalamus Projection. *Curr. Biol.* 26, 593–604. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.065>
- Wood, S.H., Hindle, M.M., Mizoro, Y., Cheng, Y., Saer, B.R.C., Miedzinska, K., Christian, H.C., Begley, N., McNeilly, J., McNeilly, A.S., Meddle, S.L., Burt, D.W., Loudon, A.S.I., 2020. Circadian clock mechanism driving mammalian photoperiodism. *Nat. Commun.* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18061-z>
- Xiang, M., Zhou, H., Nathans, J., 1996. Molecular biology of retinal ganglion cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 596–601. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.596>
- Xu, X., Ichida, J.M., Allison, J.D., Boyd, J.D., Bonds, A.B., Casagrande, V.A., 2001. A comparison of koniocellular, magnocellular and parvocellular receptive field properties in the lateral geniculate nucleus of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *J. Physiol.* 531, 203–218. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0203j.x>
- Xue, T., Do, M.T.H., Riccio, A., Jiang, Z., Hsieh, J., Wang, H.C., Merbs, S.L., Welsbie, D.S., Yoshioka, T., Weissgerber, P., Stolz, S., Flockerzi, V., Freichel, M., Simon, M.I., Clapham, D.E., Yau, K.W., 2011. Melanopsin signalling in mammalian iris and retina. *Nature* 479, 67–72. <https://doi.org/10.1038/nature10567>
- Yan, W., Laboulaye, M.A., Tran, N.M., Whitney, I.E., Benhar, I., Sanes, J.R., 2020. Mouse Retinal Cell Atlas: Molecular Identification of over Sixty Amacrine Cell Types. *J. Neurosci.* 40, 5177–5195. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0471-20.2020>
- Yang, G.Y., Huang, L.H., Schmid, K.L., Li, C.G., Chen, J.Y., He, G.H., Liu, L., Ruan, Z.L., Chen, W.Q., 2020. Associations between screen exposure in early life and myopia amongst Chinese preschoolers. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031056>
- Yao, F., Zhang, E., Gao, Z., Ji, H., Marmouri, M., Xia, X., 2018. Did you choose appropriate tracer for retrograde tracing of retinal ganglion cells. the differences between cholera toxin subunit B and Fluorogold. *PLoS One* 13, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205133>
- Yau, K.W., Hardie, R.C., 2009. Phototransduction Motifs and Variations. *Cell* 139, 246–264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.029>
- Young, R.W., 1967. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell Biol.* 33, 61–72. <https://doi.org/10.1083/jcb.33.1.61>
- Yu, H.S., 1981. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. *J. Endocrinol.*
- Zeitzer, J.M., Dijk, D.J., Kronauer, R., Brown, E., Czeisler, C., 2000. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *J. Physiol.* 526 Pt 3, 695–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00695.x>
- Zhang, J., Wang, H., Wu, S., Liu, Q., Wang, N., 2017. Regulation of reentrainment function is dependent on a certain minimal number of intact functional ipRGCs in rd mice. *J. Ophthalmol.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6804853>

- Zhang, T., Huang, L., Zhang, L., Tan, M., Pu, M., Pickard, G.E., So, K.F., Ren, C., 2016. ON and off retinal ganglion cells differentially regulate serotonergic and GABAergic activity in the dorsal raphe nucleus. *Sci. Rep.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26060>
- Zhang, Z., Silveyra, E., Jin, N., Ribelayga, C.P., 2018. A Congenic Line of the C57BL/6J Mouse Strain that is Proficient in Melatonin Synthesis. *J. Pineal Res.* e12509. <https://doi.org/10.1111/jpi.12509>
- Zhao, X., Stafford, B.K., Godin, A.L., King, W.M., Wong, K.Y., 2014. Photoresponse diversity among the five types of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Physiol.* 592, 1619–1636. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.262782>
- Zisapel, N., Egozi, Y., Laudon, M., 1982. Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res.* 246, 161–163. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90157-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90157-3)





Bastien LECLERCQ

## Rôle de la rétine dans les fonctions non-visuelles : traitement des informations relatives à la photopériode et impact de la lumière bleue sur le comportement

### Résumé

Les cellules ganglionnaires intrinsèquement photosensibles (ipRGCs) constituent une interface majeure dans la régulation de notre physiologie et de nos comportements par la lumière. Ces travaux de thèse démontrent que la seule présence de ces cellules dans la rétine est suffisante pour permettre à des souris d'intégrer les variations saisonnières de la photopériode au niveau physiologique et comportemental. De plus, nous décrivons des modifications dépendantes de la photopériode au sein des ipRGCs. Ces résultats suggèrent que la rétine pourrait intégrer les variations de la photopériode, afin d'assurer au mieux les fonctions visuelles et non-visuelles à travers les saisons. Dans un deuxième temps, ces travaux ont exploré les effets de la surexposition aux écrans et notamment à un enrichissement en lumière bleue sur le comportement de type anxieux/agressif. Les ipRGCs, particulièrement sensibles à la lumière bleue (460-480nm), sont connectées avec de nombreuses structures cérébrales impliquées dans la régulation des comportements. Nos résultats montrent qu'une exposition prolongée à un environnement enrichi en lumière bleue peut modifier les comportements de type agressif. Ces travaux permettront à terme de mieux comprendre comment la lumière naturelle et artificielle impactent notre physiologie et nos comportements.

### Abstract

The intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs) constitute a key interface in the regulation of our physiology and behaviours by light. First, this thesis demonstrates that the ipRGCs are sufficient to ensure a normal photoperiod integration. Mice without rods nor cones still encode photoperiod variation through melatonin secretion and display photoperiod-dependent locomotor activity changes. This is the first time we describe photoperiod-dependent changes of the ipRGCs. These data suggest that the retina itself could integrate the photoperiod locally, and thus constitute an adaptive mechanism to regulate both visual and non-visual functions depending on the seasons. Secondly, this thesis assessed the effects of screen overexposure and notably to blue light enrichment on aggressive/anxious behaviour. ipRGCs are particularly sensitive to blue light (460-480nm) and are connected to various brain structures involved in behaviour regulation. We show that exposure to a blue light-enriched environment can modify behaviour such as aggressiveness. These findings will allow us to better understand how natural and artificial light impact our physiology and behaviour.