



**HAL**  
open science

# Rôle de photorécepteurs atypiques dans la transmission des effets directs et circadiens de la lumière chez un vertébré diurne

Clair Chaigne

► **To cite this version:**

Clair Chaigne. Rôle de photorécepteurs atypiques dans la transmission des effets directs et circadiens de la lumière chez un vertébré diurne. Neurosciences. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30085 . tel-03765400

**HAL Id: tel-03765400**

**<https://theses.hal.science/tel-03765400v1>**

Submitted on 31 Aug 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.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Clair CHAIGNE**

Le 14 janvier 2022

**Rôle de photorécepteurs atypiques dans la transmission des effets directs et circadiens de la lumière chez un vertébré diurne**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **NEUROSCIENCES**

Unité de recherche :

**MCD - Molecular, Cellular and Developmental Biology Unit**

Thèse dirigée par

**Elise CAU et Patrick BLADER**

Jury

M. François ROUYER, Rapporteur

M. Georges DEBREGAS, Rapporteur

Mme Marie-Paule FELDER-SCHMITTBUHL, Rapporteur

Mme Claire RAMPON, Examinatrice

M. Owen RANDLETT, Examinateur

Mme Elise CAU, Directrice de thèse

M. Patrick BLADER, Co-directeur de thèse









Pour plus d'informations :

<https://github.com/cchaigne/these2022>



# REMERCIEMENTS / GREETINGS

Les personnes les plus proches savent combien je suis à l'aise avec les émotions et ont pu faire l'expérience de ma maîtrise parfaite de l'art des remerciements. Mais comme le dit si bien l'auteur anonyme de l'article « Rédiger des remerciements dans le cadre d'une thèse » du site de la corep (corep.fr) : « Comme la réalisation d'une thèse est le fruit d'un travail de longue haleine qui a nécessité l'aide et la collaboration de plusieurs personnes, il est normal que l'impétrant exprime sa reconnaissance envers toutes les personnes qui ont collaboré aussi bien à la rédaction qu'aux travaux de recherche ».

Je tiens donc premièrement à remercier mon équipe d'accueil LGBT (Les Gens de la Blader Team) : Elise, qui m'a accueilli au sein de son projet de recherche et a endossé la lourde tâche de m'encadrer lors de ma thèse ; Patrick, qui m'a accueilli au sein de son équipe même après lui avoir demandé conseil sur un bon gynécologue (question qui est restée sans réponse) et qui a endossé la lourde tâche de subir mes blagues, l'écorchage de son nom de famille ainsi que ma bonne humeur ; Pascale, pleine de bonne volonté et qui m'a rendu cuniculophobe (cherche sur Google Pascale) ; Julie Batut, que je remercierai encore et toujours mais jamais assez ; Marie, le soleil de ma forêt sans qui le bureau serait fade ; Sophie, un cadeau tombé du ciel ; les ancien.ne.s de l'équipe : Myriam, merci pour ton attention et tes conseils, petit Lu, Caro, Raphaël נשיקות, Amir et sa serrure précieuse, Aurore mon petit cul, merci pour nos discussions philosophiques et d'avoir gardé mon pot à caca très longtemps, et Aurélie (et Séverine et Raphaël qui font partie de l'équipe de nos cœurs) aux multiples talents, chanteuse, mime, dessinatrice, sexologue...

Merci également à tout le personnel du laboratoire, le CBIT (Centre de Biologie Intégrative de Toulouse), l'ancien CBD et l'actuel MCD pour leurs conseils (généralement) très précieux dans les cadres professionnels et personnels et les bons moments passés ensemble. Merci à la plateforme aquatique, sans qui mes braves poissons n'auraient pas pondus, l'atelier (avec un merci spécial pour Christian) pour leur bonne humeur et leur aide, et merci à l'administration du laboratoire et de l'université qui réussit à rendre la vie plus facile. Un merci spécial à Fabienne dont les « bonjours la jeunesse » vont me manquer, Denis notre nouveau voisin qui illumine le couloir de son sourire, nos anciens voisins les Haenlin dont Douaa Lipa et nos discussions nocturnes, les Payre et autres drosophilistes bizarres (et très amusant.e.s) croisé.e.s ou non dans la pièce à mouche.

Un grand merci à mon comité de thèse, Jason et Lionel grâce à qui un comité de thèse aura pu être vraiment très utile au moins une fois. Merci au jury pour leurs retours et la discussion, et merci Claire d'avoir accepté d'être présidente avec un si grand entrain.

Passons maintenant aux remerciements encore plus personnels. Tout d'abord merci Colette, ma mentore avec qui j'espère garder contact encore pour longtemps. Merci merci merci encore Julie Batut. Merci aussi à l'équipe de MT180s pour cette belle expérience. Merci la famille Chaigne et Crisci qui sont à priori les personnes qui me connaissent depuis le plus longtemps et que je connais depuis le plus longtemps également, avec qui on passe toujours de bon moments et qui sont de bon soutien, je les recommande sans soucis (merci Lucas Chaigne de m'avoir nourri, entraîné à Slam, aidé à faire un cv d'ingénieur et surtout participé et participe encore activement à avoir une vie ma foi fort agréable, merci les parents et Pascale de ne pas vous être endormis pendant les questions, pour votre amour et soutien inébranlable

à travers toutes les épreuves, et merci la petite Pelote d'avoir attendu que je sois là et qui plus est à une heure raisonnable). Merci aux ami.e.s, qui sont nombreux.ses et précieux.ses : le gang (Olivia, Ingrid, Alyann, Vincent, Jorge, Marie, Djamaa, Jean) pour nos nombreux apéros et rigolades, je vous fait des bisous sur le bout ; le festival du film (Vincent, Jorge, Djamaa, Jean) pour nous rappeler que la rigueur scientifique est importante et qu'un mot inapproprié peut avoir de grandes conséquences ; les sirènes plus ou moins habiles Vincent et Jorge ; les M2 GCD, et plus particulièrement Marianne, Ali, Marie K, la hantise Romain, Eve, les bruxellois et RX984FD5413 qui nous a contacté lors du Ouija (j'attends toujours qu'on aille à Marrakech) ; ceux qui ne liront pas ces remerciements et que j'ai la chance d'avoir dans ma vie : Nic, la famille Jimenez, Angie et Lily ; les mulets avec mention spéciale à Maleaume et les soirées endiablées au Black Lion ; les apéros clandestins (Marie encore merci merci merci pour les paillettes dans la vie, les taties Claudie et Alix, Nathalie Bastié la seule Nathalie, le beau Côme, l'encore plus beau Cyril, Ahmed le merveilleux, Yassin, Dylan, Luis, et encore plus) qui ruinent le sol de leur amour et pas que, ne doutez jamais ; la petite famille de l'upsi et les boyzss (Vivignou um beijo et um queijo, Sulovito donobut toke, Daminouminouminou raaawwwrrrr, کتیر بوسات Shawarmaha ) avec qui j'espère faire des tachaïnes à foison et qui me remplissent de bonheur (et de nourriture dont des mugcakes orgasmiques) ; les Ayala Banda et leur maîtrise de la fête et du beer pong ; Jorge, nos soirées à deux et le Shangai (sans oublier le coup d'état où nous avons passés de nombreuses heures) ; ma belle Ingrid qui me brise le cœur à chaque fois qu'elle rompt avec moi mais que j'aime d'amour ; Djamaa discrète comme tout et un peu trop d'ailleurs qu'est-ce qu'on ferait sans une femme Lacazette Atamena, la meilleure de toute.

Merci aussi à Alexandra Elbakyan et sci-hub pour avoir été là quand bib-cnrs nous faisait défaut.

Je souhaitais également dire pardon aux poissons qui n'avaient rien demandé et qui ont pourtant beaucoup subi.

# SOMMAIRE

Résumé des travaux de thèse .....	1
Abstract .....	3
Introduction.....	7
I.    A la découverte des rythmes circadiens .....	9
II.   Les rythmes circadiens chez la drosophile <i>D.melanogaster</i> .....	19
III.  Les rythmes circadiens chez les mammifères .....	25
IV.  Les rythmes circadiens chez les vertébrés non mammifères (et non téléostéens).....	51
V.   Les rythmes circadiens chez les téléostéens, et plus particulièrement le poisson zèbre	65
Resultats .....	91
I.    La mélanopsine <i>opn4xa</i> définit une nouvelle population de neurones de projection de la glande pinéale .....	93
II.   A la recherche de la fonction de la mélanopsine <i>opn4xa</i> et des cellules qui l'expriment	103
Discussion.....	177
I.    Caractérisation de deux mélanopsines exprimées dans les RGCs chez la larve de poisson zèbre : <i>opn4xa</i> et <i>opn4b</i> .....	181
II.   Modèles génétiques pour étudier le rôle des cellules à mélanopsine et de la mélanopsine <i>opn4xa</i> .....	183
III.  Implication de l'œil et de la mélanopsine <i>opn4xa</i> dans les effets directs de la lumière	187
IV.  Implication de l'œil et de la mélanopsine <i>opn4xa</i> dans les effets circadiens de la lumière .....	189
V.   Quels sont les autres rôles possibles des cellules à mélanopsine chez le poisson zèbre ?	193
VI.  Quelles sont les structures impliquées dans le photoentrainement chez le poisson zèbre ? .....	195
VII.  Une robustesse de la photodétection spécifique au poisson zèbre ou étendue aux vertébrés non mammifères ? .....	199



# RESUME DES TRAVAUX DE THESE

## Résumé tout public

La lumière a une profonde influence sur le comportement de la plupart des organismes. En particulier, elle agit sur notre horloge interne qui impose une rythmicité d'environ 24 heures à presque toutes les fonctions de l'organisme, telle que l'alternance veille/sommeil. De façon autonome cette horloge a un rythme qui n'est pas d'exactly 24 heures. Ainsi la lumière permet de la resynchroniser au rythme de 24 heures imposé par l'alternance jour/nuit comme on viendrait remonter une vieille horloge chaque matin. Ce processus est très étudié et on sait qu'il implique des cellules particulières dans l'œil des mammifères, qui sont différentes de celles impliquées dans la vision (cônes et bâtonnets). Ces cellules sont très étudiées chez les mammifères mais on ne sait pas si leur rôle est conservé chez d'autres vertébrés. Lors de ma thèse, j'ai ainsi étudié le rôle de ces cellules chez un petit vertébré diurne, la larve de poisson zèbre, un modèle qui offre de nombreux avantages en biologie.

## Résumé scientifique

La lumière exerce une influence majeure sur la physiologie et le comportement de la plupart des organismes. En particulier, elle synchronise les rythmes circadiens par un processus appelé photoentrainement. Chez les mammifères, le photoentrainement dépend de la rétine, et plus particulièrement d'une classe de cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs) exprimant le photopigment mélanopsine (*opn4*). Ces RGCs sont intrinsèquement sensibles à la lumière bleue et sont appelés ipRGCs pour « intrinsically photosensitive RGCs ». Les ipRGCs intègrent l'information lumineuse médiée par la mélanopsine avec celle provenant des photorécepteurs classiques pour contrôler le photoentrainement mais aussi le masking, un effet direct de suppression ou d'élévation de l'activité locomotrice par la lumière. Bien que les ipRGCs soient les médiateurs des effets circadiens et directs de la lumière sur le comportement des mammifères, leurs rôles chez les vertébrés non mammifères ne sont pas élucidés.

Grâce à son développement externe rapide, à sa transparence et à sa capacité de manipulation génétique facile et d'analyse comportementale à haut débit, le poisson zèbre (PZ) est apparu comme un puissant modèle de vertébré diurne non mammifère pour la chronobiologie. Contrairement aux mammifères, la rétine n'est pas la seule structure



photosensible chez le PZ. En particulier chez cette espèce, la glande pinéale contient des photorécepteurs et des neurones de projection (PNs, équivalent des RGCs) et peut donc recevoir une information lumineuse et la transmettre au cerveau. De plus, tous les organes adultes du PZ testés, y compris la glande pinéale, sont directement photoentraînaibles lorsqu'ils sont placés en culture. Il reste donc à déterminer quels sont les rôles respectifs de la photodétection périphérique (au niveau de tous les organes) et de la photodétection centrale (au niveau de structures spécialisées telles que la rétine et la glande pinéale) dans le photoentraînement. Nous nous sommes intéressé.e.s aux rôles des gènes de mélanopsine et des cellules les exprimant chez le PZ. Parmi les 5 gènes de mélanopsine présents chez cette espèce, *opn4xa* et *opn4b* sont exprimés dans les RGCs larvaires. De plus, nous avons montré qu'*opn4xa* est exprimé dans une sous-population de PNs. Ainsi, *opn4xa* définit une nouvelle population de PNs présentant une photosensibilité à la lumière bleue et verte dépendante d'*opn4xa* et qui fonctionne en mode LIGHT ON (Publications 1,2). Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre la fonction des RGCs (*opn4xa+* et *opn4xa-* ; mutant *lakritz*) et de la photosensibilité intrinsèque des RGCs et PN *opn4xa+* (mutant *opn4xa*) dans l'influence directe et circadienne de la lumière sur l'activité locomotrice chez la larve de PZ. Nous avons trouvé que les RGCs sont impliqués dans le masking et la réponse locomotrice aux transitions lumineuses, mais indépendamment de la photosensibilité pilotée par *opn4xa*. Enfin, les mutants *opn4xa-/-*, *lakritz* et *opn4xa-/-;lakritz* n'ont montré aucun défaut de photoentraînement à un pulse de lumière blanche administré au début de la nuit suggérant que la photodétection de la rétine (y compris celle des ipRGCs) et la photodétection pilotée par la mélanopsine *opn4xa* ne sont pas nécessaires au photoentraînement chez la larve de PZ (Publication 2). Ces résultats soulèvent des différences majeures dans le photoentraînement circadien chez les mammifères et le poisson zèbre.

# ABSTRACT

## General abstract

Light has a profound influence on the behavior of most organisms. In particular, it acts on our internal clock which imposes a rhythm of about 24 hours on almost all the functions of the organism, such as the sleep/wake cycle. This clock has an autonomous rhythm that is not exactly 24 hours. Thus, light acts to resynchronize it to the 24-hour rhythm imposed by the day/night alternation, just as it would wind up an old clock each morning. This process is very well studied and is known to involve particular cells in the mammalian eye. These cells are different from those involved in vision (cones and rods) and are well studied in mammals. However, it is not known if their role is conserved in other vertebrates. During my thesis, I studied the role of these cells in a small diurnal vertebrate, the zebrafish larva, a model that offers many advantages in biology.

## Scientific abstract

Light has a profound influence on the physiology and behaviour of living organisms. In particular, light synchronizes circadian rhythms through a process referred to as photoentrainment. In mammals, photoentrainment depends on the retina, and more particularly on a specific subtype of Retinal Ganglion Cells (RGCs) expressing the photopigment melanopsin (*opn4*). These RGCs are intrinsically sensitive to blue light and are hence referred to as ipRGCs for “intrinsically photosensitive RGCs”. ipRGCs function as a hub which integrates photic information from melanopsin-evoked responses with rod and cone photoreceptor influences to control, among other things, photoentrainment and masking, a direct suppressive or elevating effect of light on locomotor activity. While ipRGCs mediate circadian and direct effects of light on behaviour in mammals, it is unclear if these roles are conserved in non-mammalian species.

Due to its fast external development, transparency and capacity for easy genetic manipulation and high-throughput behavioural analysis, the zebrafish has emerged as a powerful non-mammalian diurnal vertebrate model for chronobiology. In contrast to mammals, the retina is not the only photosensitive structure: in particular, the zebrafish pineal gland contains photoreceptors and projection neurons (PNs, equivalent of RGCs) and thus can receive and transmit light information. In addition, all zebrafish adult organs tested, including the pineal gland, are directly photoentrainable when placed in culture. It therefore remains

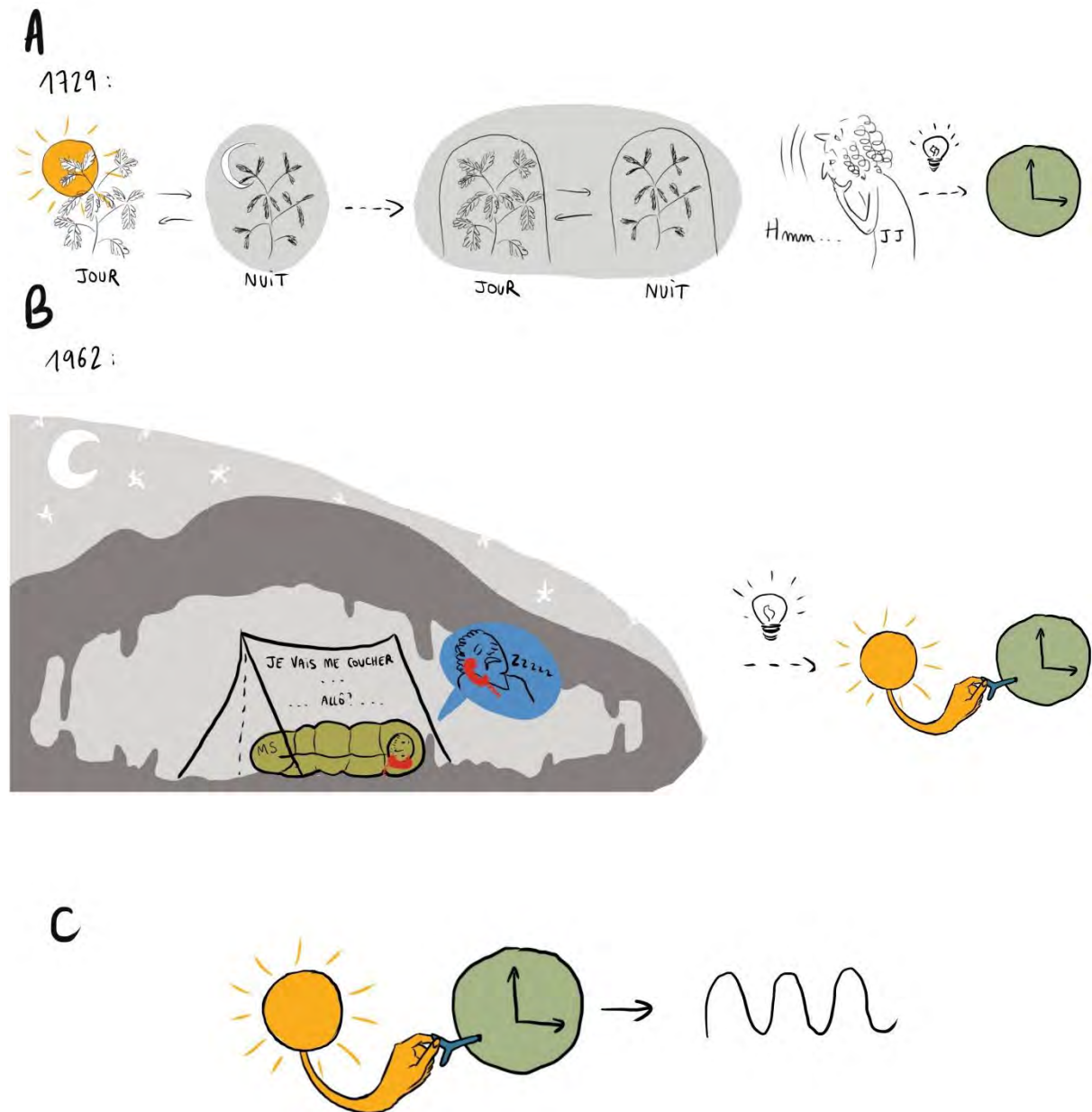
to be determined what are the respective roles of peripheral (at the organ level) versus central photodetection (from specialized structures such as the retina and pineal gland) for photoentrainment.

We thus ought to determine the function of melanopsin genes and melanopsin expressing cells in the zebrafish. Among the 5 zebrafish melanopsin genes, *opn4xa* and *opn4b* are expressed in larval RGCs. We furthermore showed that *opn4xa* is expressed in a subpopulation of PNs. Therefore, *opn4xa* defines a novel population of PN exhibiting an *opn4xa*-dependant photosensitivity to blue and green light in a LIGHT ON mode (Publications 1,2). With different mutant lines, we then tested the role of RGCs (*opn4xa+* and *opn4xa-* RGCs; *lakritz* mutant) and of the intrinsic photosensibility of *opn4xa+* RGCs and PN (*opn4xa* mutant) in the direct and circadian influence of light on locomotor activity in zebrafish larvae. We found RGCs to be involved in masking and the locomotor response to light transitions, but regardless of their *opn4xa+* driven photosensibility. Finally, both *opn4xa-/-*, *lakritz* and *opn4xa-/-;lakritz* mutants did not show any defect of photoentrainment to a white pulse of light administered at the beginning of the night (Publication 2). Thus both the photodetection from the retina, (including ipRGCs) and the photodetection driven by the melanopsin *opn4xa* seem dispensable for circadian photoentrainment in zebrafish larvae. This highlights further differences between the organization of the mammalian and zebrafish circadian system and more particularly on the structure(s) involved in photoentrainment.





# INTRODUCTION



**Figure 1 : Schématisation des expériences de Jean-Jacques Dortous de Mairan et de Michel Siffre illustrant les concepts clés associés aux rythmes circadiens**

**A.** Illustration de l'expérience de Jean-Jacques Dortous de Mairan sur la sensitive *mimosa pudica* publiée en 1729 : Jean-Jacques (JJ) observe que les feuilles de la sensitive s'ouvrent le jour et se replient la nuit. Il place la plante dans l'obscurité constante, et observe que le rythme d'ouverture/repliement des feuilles persiste en l'absence de repère de temps extérieur. Cette expérience illustre l'existence d'un mécanisme interne de mesure du temps, l'horloge circadienne, schématisée ici par une horloge verte, dont l'existence sera confirmée par d'autres scientifiques, dont Erwin Bünning. **B.** Expérience de Michel Siffre de 1962, qui illustre la nécessité de signaux extérieurs pour que l'horloge circadienne et les rythmes qu'elle génère restent en phase avec l'environnement : en 1962, Michel (MS) s'isole dans un gouffre et signale son réveil et coucher par une ligne téléphonique. En l'absence de repère de temps extérieur, les rythmes biologiques de Michel persistent, mais cependant avec une période de 24 heures et 30 minutes. **C.** Schéma général des concepts clés associés aux rythmes circadiens : l'horloge circadienne génère des rythmes circadiens de façon autonome. Des signaux extérieurs, comme la lumière, agissent sur l'horloge pour qu'elle reste en phase avec l'environnement. La clef pour remonter l'horloge représente l'organe et/ou les cellules médiatrices des effets de la lumière sur l'horloge.

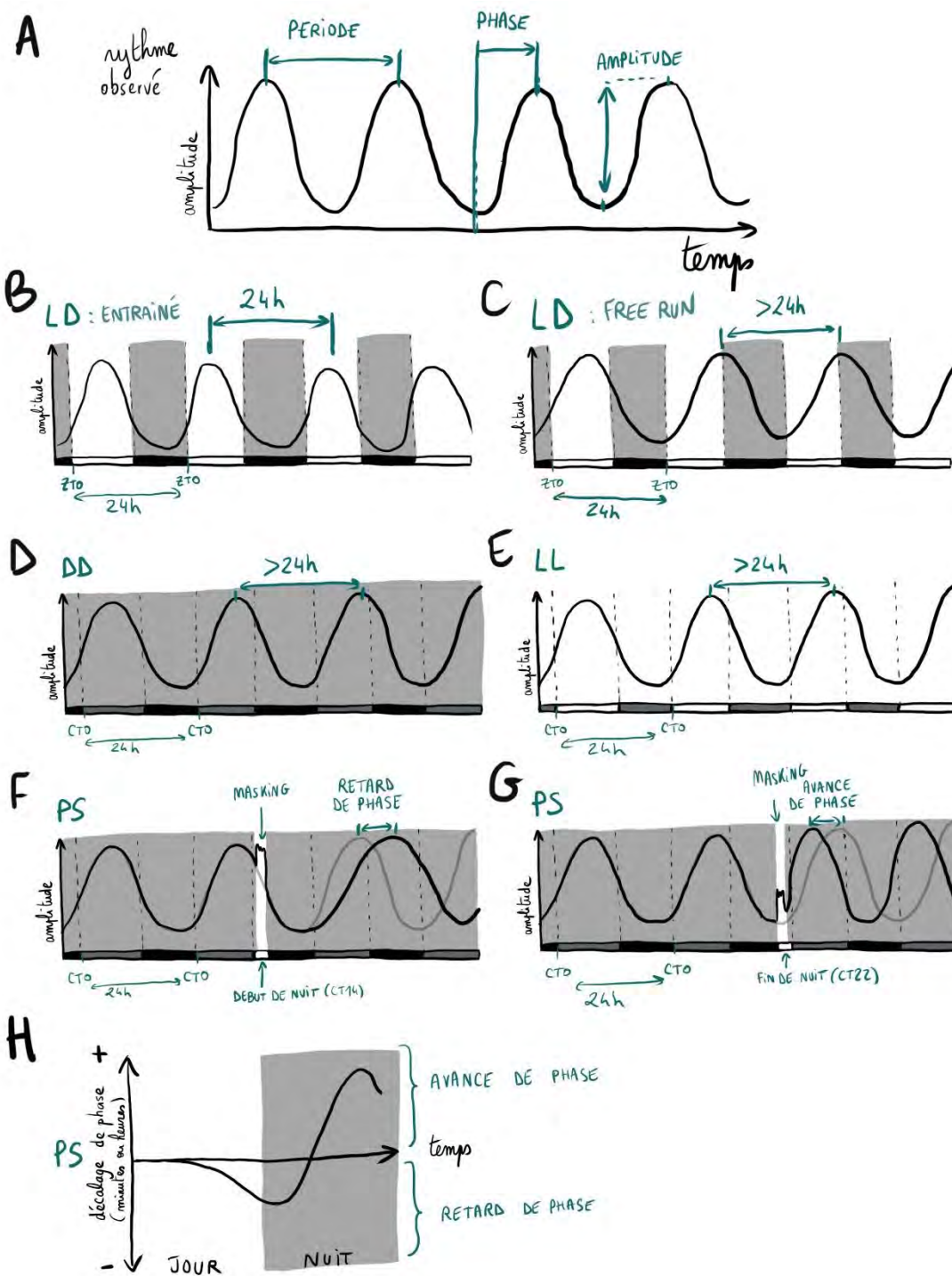
# I. A la découverte des rythmes circadiens

## A. L'histoire des rythmes circadiens

Si l'on devait dater le début de l'histoire des rythmes circadiens, beaucoup citeraient Jean-Jacques Dortous de Mairan et son expérience sur la sensitive *mimosa pudica*. Ce mathématicien, astronome, géophysicien, et chronobiologiste (scientifique qui étudie les rythmes biologiques) qui s'ignore avait observé que les feuilles de la sensitive s'épanouissent pendant le jour et se « replient et se contractent vers le coucher du Soleil ». Il eut l'idée de tester si ce mouvement de feuilles était une simple réponse au Soleil et isola une sensitive de la lumière pour la placer dans l'obscurité constante. A son étonnement, il observa que le rythme de repliement et d'épanouissement des feuilles persiste dans ces conditions (Fig 1.A). Il en conclut dans sa courte publication « Observation botanique » de 1729 : « la sensitive sent donc le soleil sans le voir en aucune manière ». Presque ! Sans le savoir, Jean-Jacques venait de mettre en évidence l'existence d'un mécanisme interne de mesure du temps, l'horloge circadienne (du latin « *circa* » pour environ et « *dies* » pour jour, terme défini par Franz Halberg dans les années 1950), qui génère des rythmes circadiens, comme ici le rythme d'épanouissement/repliement des feuilles. D'autres scientifiques ont ensuite démontré l'existence de cette horloge circadienne, dont Erwin Bünning dans les années 1930 (Saunders, 2016), mais l'engouement autour de l'étude des rythmes circadiens ne débuta réellement que dans les années 1950-60.

C'est ainsi que fut démontré que cette horloge circadienne était présente dans la plupart des espèces étudiées, et qu'elle présente de façon autonome une rythmicité proche mais pas exactement de 24 heures selon les organismes et les individus, comme illustré dans une expérience particulière : le 17 juillet 1962, Michel Siffre, alors âgé de 23 ans, a l'idée saugrenue de s'isoler au fond du gouffre de Scarasson sans aucun repère temporel. Une ligne téléphonique lui permet de signaler son réveil, coucher et moment du repas afin de mesurer son rythme de vie. Michel ressort deux mois plus tard un peu déboussolé, pensant n'être que le 20 août alors qu'il était le 4 septembre. Les informations collectées révèlent que même écarté de tout repère temporel, le spéléologue possède toujours un rythme veille/sommeil, mais qui se décalait chaque jour d'environ 30 minutes : son l'horloge biologique possède donc de façon autonome une périodicité de 24 heures et 30 minutes. Ceci appuie le caractère endogène de l'horloge circadienne, mais reflète surtout la nécessité de signaux extérieurs appelés « Zeitgebers » (terme proposé par le chronobiologiste Jürgen Aschoff en 1960, de





**Figure 2 : Paramètres et conditions expérimentales utilisés pour étudier les rythmes circadiens**

**A.** Schématisation d'un rythme biologique observé au cours du temps et des différents paramètres étudiés (période, amplitude et phase du rythme par rapport à une référence externe). **(B-G)** ZT : « Zeitgeber Time » ; CT : « Circadian Time ». **B.** Rythme biologique en conditions LD (« Light/Dark ») et en phase ou entraîné au cycle LD. Les barres blanches représentent les conditions « Light » et les barres noires les conditions « Dark ». **C.** Rythme biologique en conditions LD et non entraîné ou en « free run » par rapport au cycle LD. **D.** Rythme circadien en conditions DD (« Dark Dark »). Les barres grises correspondent au jour subjectif et les barres noires à la nuit subjective. **E.** Rythme circadien en conditions LL (« Light Light »). Les barres blanches représentent le jour subjectif et les barres grises la nuit subjective. **F.** Expérience de phase shift avec un pulse en début de nuit subjective induisant un retard de phase. Le masking (ici, élévation du niveau du rythme observé), un effet direct de la lumière, peut être observé lors du pulse. La courbe grise indique le rythme non soumis au pulse. **G.** Expérience de phase shift avec un pulse en début de nuit subjective induisant une avance de phase. Le masking (ici, élévation du niveau du rythme observé), un effet direct de la lumière, peut être observé lors du pulse. La courbe grise indique le rythme non soumis au pulse. **H.** Courbe de réponse de phase. Une avance de phase correspond à un phase shift positif et un retard de phase à un phase shift négatif. La partie blanche correspond au jour ou au jour subjectif et la partie grise à la nuit ou à la nuit subjective.

l'allemand « donneur de temps »), comme la lumière, pour que l'horloge et les rythmes qu'elle génère restent appropriés et en phase avec l'environnement dans lequel se trouve l'individu (Fig 1.B).

Pour résumer, on qualifie de rythme circadien tout rythme biologique qui oscille sur une période d'environ 24 heures, qui persiste en l'absence de repère de temps extérieur (généré par une horloge circadienne endogène) et qui est influencé par des éléments extérieurs, comme la lumière (Fig 1.C). Ces rythmes ont depuis été décrits dans la plupart des organismes, des cyanobactéries à l'humain, et concernent de nombreux processus biologiques, allant du moléculaire au comportemental (Bhadra et al., 2017).

## B. Paramètres et conditions expérimentales d'étude des rythmes circadiens

### 1. Paramètres étudiés

Afin de pouvoir étudier et caractériser les rythmes circadiens plus en détails de façon objective, ils sont souvent assimilés à une fonction périodique simple. Ceci permet de quantifier et comparer plusieurs paramètres, comme (Fig 2.A) :

- l'amplitude : différence entre le pic et le creux au cours d'une oscillation
- la période : intervalle de temps qui sépare deux phénomènes identiques (deux pics successifs par exemple)
- la phase : position d'une variable du cycle (pic du cycle par exemple) de façon relative à un point de référence externe (début de la journée ou heure fixe par exemple)

### 2. Conditions expérimentales utilisées

De façon à comparer l'horloge circadienne de différents individus (présence d'une horloge, période de cette horloge, etc...) et mesurer l'influence de signaux extérieurs sur ce.lles.ux-ci, les différents paramètres précédemment décrits peuvent être mesurés dans différentes conditions expérimentales. La lumière étant l'élément extérieur possédant l'influence la plus évidente, ses effets et mécanismes d'actions sur l'horloge circadienne et les rythmes qu'elle génère sont les plus étudiés, et on parle dans ce cas de photoentrainement du rythme ou de l'horloge circadienne. Différentes conditions d'illumination sont classiquement utilisées (Fig 2. (B-H)) :

- Light/Dark (LD) : alternance de lumière et d'obscurité sur une période de 24 heures. Dans cette condition, les unités de temps sont mesurées en ZT (« Zeitgeber Time »), allant de ZT0 (correspondant au début de la période de lumière) jusqu'à ZT24. En LD, on peut alors observer si le rythme étudié concorde avec le cycle LD. On dira qu'il est

entraîné au cycle LD s'il est en concordance, et si au contraire le rythme oscille indépendamment de l'illumination, on dit alors qu'il est en « free-run » et qu'il n'est pas photoentraîné. Il est important de noter qu'en conditions LD, la lumière exerce également des effets directs sur de nombreux processus indépendamment de l'horloge circadienne qui masquent les effets de l'horloge circadienne, ce qu'on nomme donc masking. De ce fait si un rythme semble photoentraîné en LD, il n'est pas forcément la résultante de l'horloge circadienne, et il faudra étudier ce même rythme sans influence de la lumière pour observer l'influence de l'horloge circadienne sur ce rythme.

- Dark/Dark (DD) : condition de noir constant, souvent après un entraînement avec plusieurs cycles LD. Dans cette condition, les unités de temps sont mesurées en CT (« Circadian Time »), allant de CT0 (correspondant au début du jour subjectif, soit la période d'illumination de l'individu s'il était resté en LD) jusqu'à CT24. En DD, on peut alors étudier si le rythme étudié persiste sans repère de temps extérieur et mesurer sa période, reflet de la période endogène de l'horloge circadienne de l'organisme. La période endogène de l'horloge est de généralement plus de 24h pour les espèces diurnes et de moins de 24h pour les espèces nocturnes en DD (Aschoff, 1979).
- Light/Light (LL) : condition de lumière constante, souvent après un entraînement avec plusieurs cycles LD. Dans cette condition, les unités de temps sont mesurées en CT (« Circadian Time »), allant de CT0 jusqu'à CT24. La condition LL, comme la condition DD, permet d'observer si le rythme persiste en conditions constantes, mais également de mesurer la capacité de la lumière à influencer l'horloge et le rythme. En effet dans la plupart des espèces étudiées, la période du rythme en condition LL diffère de celle en condition DD et est fonction de l'intensité de la lumière. Elle est généralement inférieure à celle en DD pour les espèces diurnes et supérieure à celle en DD pour les espèces nocturnes (Aschoff, 1979).
- Phase Shift (PS) : administration d'un pulse de lumière en DD, souvent après un entraînement avec plusieurs cycles LD. Selon le moment où est administré ce pulse de lumière, il n'aura pas le même impact sur le rythme circadien et va provoquer soit une avance soit un retard de phase. En administrant un pulse de lumière à différent CT, on peut ainsi construire une courbe de réponse de phase du rythme circadien. Par exemple, un pulse de lumière administré à CT14, c'est à dire en début de nuit subjective (période « D » du précédent cycle LD) va induire un délai de phase de

l'activité locomotrice des souris, tandis qu'un pulse administré à CT22, c'est-à-dire en fin de nuit subjective, va induire un retard de phase de l'activité locomotrice chez cette même espèce. Il existe également des moments de la journée où un pulse de lumière n'induit pas ou un très léger décalage de phase, qu'on appelle dead zone : ces zones se trouvent lors la journée subjective et au milieu de la nuit subjective, entre le moment où le pulse de lumière vient à provoquer une avance et un retard de phase. Chez les mammifères, la courbe de réponse de phase est assez similaire entre les espèces nocturnes et diurnes, avec un retard de phase induit par un pulse de lumière administré en début de nuit subjective et une avance de phase induite par un pulse de lumière administré en fin de nuit subjective (Daan, 2000; Vitaterna et al., 2001).

## C. Echelles d'étude des rythmes circadiens

Les rythmes circadiens concernant de nombreux processus biologiques, on peut donc les étudier à plusieurs échelles au sein d'un individu/organe/cellule.

### 1. Echelle comportementale

Les études pionnières ayant permis de mettre en avant l'organisation de l'horloge circadienne au niveau moléculaire et qui ont conduit à un prix Nobel en 2017 se sont ainsi basées sur l'étude d'un rythme circadien au niveau comportemental : le rythme d'éclosion des drosophiles. En effet la plupart des drosophiles non génétiquement modifiées émergent de leur puppe 1 à 2h avant que la lumière s'allume. Le rythme d'éclosion peut ainsi être mesuré puis comparé selon le génotype de manière manuelle ou automatisée (les puppes sont alors collées sur un disque de plastique placé au-dessus d'un tube traversé par un détecteur infrarouge ; le disque est tapé à des intervalles de temps régulier, ce qui fait tomber les drosophiles en train d'émerger de leur puppe, qui passent à travers le détecteur infrarouge pour être comptabilisées). D'autres types d'expériences utilisant le suivi du rythme de l'activité locomotrice ont ensuite été développées, permettant de procéder à des analyses à plus grande échelle. Dans ces expériences, les drosophiles sont placées de manière individuelle dans des tubes traversés par un détecteur infrarouge qui va mesurer le nombre de fois où la mouche sera passée devant ce détecteur par intervalle de temps donné (Klarsfeld et al., 2003). Le rythme de l'activité locomotrice est ainsi un des rythmes circadiens le plus étudié chez les animaux. Chez l'humain, on peut le mesurer à l'aide d'accéléromètres portés au poignet, et chez les autres mammifères à l'aide de détecteurs infrarouges ou plus généralement avec des roues connectées à un système de détection placées dans la cage

(Brown et al., 2019). L'activité de reptiles et d'oiseaux placés de façon individuelle dans des cages peuvent aussi être mesurées par un système similaire de détecteurs infrarouges (Molina-Borja, 1996), ou en utilisant des perchoirs connectés dans le cas d'oiseaux (Gaston and Menaker, 1968). Chez le poisson-zèbre, qui est le principal modèle de poisson étudié en chronobiologie, la mesure de l'activité locomotrice est plus robuste chez la larve (de 5 à 20 jours après fécondation) que chez l'adulte, chez lequel il existe un fort taux de variabilité interindividuelle (Vatine et al., 2011). On préférera alors étudier l'activité locomotrice de la larve, qui permet également de s'affranchir d'un effet de la nourriture sur le comportement (les larves possèdent un vitellus pour se nourrir) et d'effectuer des études automatisées à grande échelle : les larves sont placées de façon individuelle dans des plaques pouvant aller jusqu'à 96 puits et leur activité est suivie grâce à un logiciel de tracking, donnant la distance parcourue ou l'activité de la larve par unité de temps. Un autre paramètre comportemental pouvant être utilisé chez le poisson zèbre est la préférence de place dans une colonne d'eau : les larves se placent ainsi préférentiellement dans le tiers supérieur de la colonne d'eau lors de leur période d'activité et vont au fond de la colonne lorsque la lumière s'éteint ou qu'elles sont dans une période d'inactivité (Ben-Moshe Livne et al., 2016).

## 2. Echelle physiologique

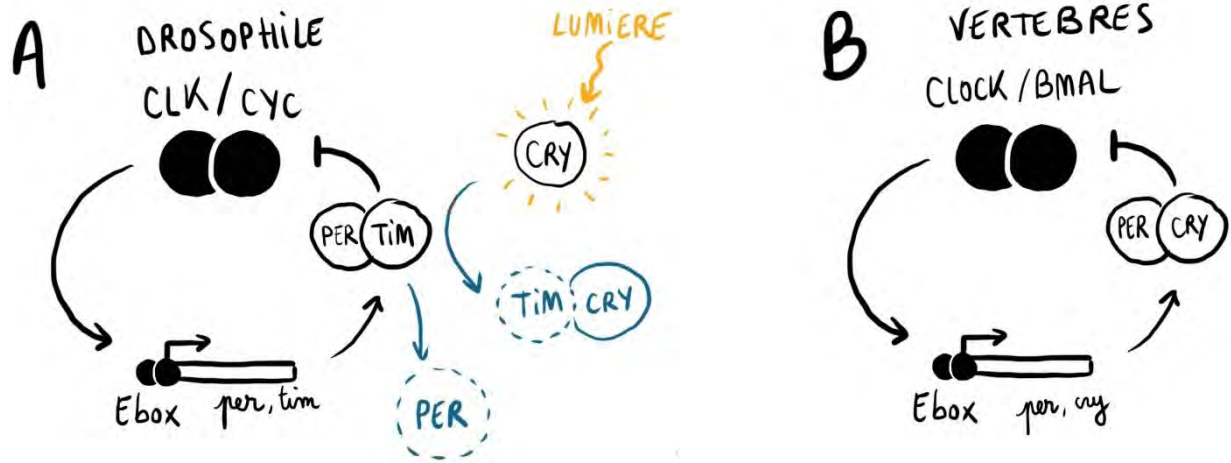
D'autres processus physiologiques présentant une rythmicité circadienne peuvent être étudiés, comme la température corporelle et le rythme de synthèse et sécrétion de la mélatonine, sécrétée la nuit et considérée comme un signal d'obscurité (Bhadra et al., 2017; Binkley, 1977; Tosini et al., 2001). Cette hormone est synthétisée et sécrétée par la glande pinéale de façon rythmique. Il est cependant à noter que la plupart des souris de laboratoires ne synthétisent pas de mélatonine (Kennaway, 2019). Chez les oiseaux (Chaurasia et al., 2005), certains reptiles (Tosini et al., 2001) et le poisson zèbre (Vatine et al., 2011), le rythme de synthèse de mélatonine persiste quand on place la glande pinéale en culture en condition d'obscurité constante, et au moins chez le poulet et le poisson zèbre elle est directement entrainable par des signaux extérieurs comme la lumière. Chez le poisson zèbre, la transcription du gène *aanat2*, l'enzyme limitante de la voie de synthèse de la mélatonine, est aussi utilisée comme reflet de la synthèse de la mélatonine chez la larve et l'adulte. Ce gène, exprimé dans les photorécepteurs classiques de la glande pinéale et la rétine, est ainsi transcrit de manière rythmique.

### 3. Echelle moléculaire

Les rythmes circadiens sont également présents au niveau moléculaire, et on peut mesurer et quantifier l'expression rythmique de gènes comme *aanat2* par différentes méthodes, comme par RT-qPCR ou à l'aide de rapporteurs bioluminescents comme la luciférase. Grâce à des animaux transgéniques exprimant la luciférase sous le contrôle d'un gène ou de régions régulatrices spécifiques, il est possible d'étudier des oscillations moléculaires *in vivo* ou à partir d'organes ou de cellules en culture (Tahara et al., 2012; Yoo et al., 2004).

#### D. Base génétique des rythmes circadiens

La base génétique des rythmes circadiens a été mise en évidence pour la première fois en 1971 suite à l'étude de mutations aléatoires générées à l'EMS (ethyl methanesulfonate) affectant le rythme d'éclosion et le rythme de l'activité locomotrice de drosophiles en DD (Konopka and Benzer, 1971). Trois mutations furent isolées, qui affectent de la même manière l'éclosion et l'activité locomotrice : une induit une arythmie de ces processus, une autre est associée à une période endogène de 19h, et la dernière à une période de 28h. Ces trois mutations affectent le même gène, et c'est ainsi que fut identifié le premier gène de l'horloge moléculaire. Puisqu'il est impliqué dans la période des rythmes étudiés, ce gène fut nommé *per* pour « period ». Suite à d'autres études, il a ensuite été déterminé que le gène *per* code pour un facteur de transcription dont l'expression est elle-même rythmique et circadienne. De plus, le gène *per* semble réguler sa propre transcription puisque sa surexpression entraîne une diminution de ses niveaux d'ARNm. Ce dernier résultat semble confirmer une hypothèse émise par Hall et Rosbash, proposant le modèle d'une horloge moléculaire reposant sur un système de boucle de transcription/traduction à rétroaction négative. Suite à l'étude d'autres mutants de drosophile fut identifié le gène *tim*, codant pour une protéine interagissant avec PER pour lui permettre d'entrer dans le noyau et réguler sa propre transcription. Le premier mutant circadien murin identifié en 1994 permis de compléter la boucle de transcription/traduction à rétroaction négative par la découverte du gène *clock*, puis plus tard de *bmal1*, pour établir que CLOCK-BMAL1, facteurs de transcription de type bHLH-PAS (basic Helix-Loop-Helix-Per-ARNT-SIM) constitue un hétérodimère capable d'activer la transcription de gènes cibles, dont *per*, via leur fixation à des boîtes E. Cela a ensuite été confirmé chez la drosophile, grâce à laquelle la boucle principale de l'horloge moléculaire circadienne de la drosophile fut complète : *Clk* et *Cyc* (orthologues de *Clock* et *Bmal1*) activent la transcription

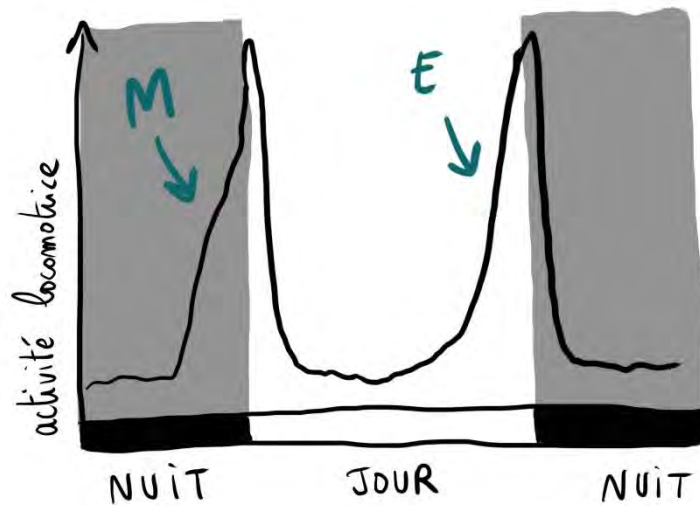


**Figure 3 : Schéma simplifié de la base génétique des rythmes circadiens chez la drosophile et les vertébrés**

**A.** Boucle principale de l'horloge moléculaire de la drosophile : l'hétérodimère formé par CLOCK (CLK) et CYCLE (CYC) active l'expression de *per* et *tim* via sa fixation à une Ebox. L'hétérodimère PER et TIM inhibe l'activité de CLOCK et CYCLE et inhibe ainsi sa propre transcription. La lumière induit l'activation de CRY, qui interagit avec TIM pour entraîner la dégradation de TIM et PER. **B.** Boucle principale de l'horloge moléculaire des vertébrés : l'hétérodimère formé par CLOCK et BMAL active l'expression de *per* et *cry* via sa fixation à une Ebox. L'hétérodimère PER et CRY inhibe l'activité de CLOCK et CYCLE et inhibe ainsi sa propre transcription.

de *per* et *tim*, qui vont eux-mêmes inhiber l'activité de CLOCK et CYCLE pour inhiber leur propre transcription. *Clk* et *Cyc* constituent ainsi les éléments positifs de la boucle et *per* et *tim* ses éléments négatifs. D'autres boucles s'entrelacent autour de cette boucle positive pour moduler son activité et ainsi générer des oscillations géniques de manière autonome, avec notamment une expression antiphasique des couples de gènes *per/tim* par rapport à l'expression de *Clk* (Huang, 2018). Un des autres acteurs clés de l'horloge moléculaire de drosophile est *cry1*, qui fait partie de la famille des cryptochromes et qui est sensible à la lumière bleue. Après photoactivation, CRY est capable d'interagir avec TIM pour entraîner la dégradation de TIM et PER et rephaser l'horloge moléculaire. Chez la drosophile, CRY est donc considéré comme un molécule photosensible clef du photoentrainement (Bhadra et al., 2017). Ce fonctionnement de l'horloge circadienne moléculaire sur un modèle de boucles de transcription/traduction à rétroaction négative est très conservé au cours de l'évolution (Fig 3).





**Figure 4 : L'activité locomotrice des drosophiles est crépusculaire**

Au cours du rythme jour/nuit, les drosophiles ont un profil d'activité bimodal et présentent une anticipation de l'allumage (M) et de l'extinction (E) de la lumière.

Gène	Mutation	Phénotype (activité locomotrice)	Références
<i>per</i>	EMS (ethyl methane sulfonate)	<b>LD</b> : pas d'anticipation (M et E) (mutant <i>per0</i> ) <b>DD</b> : arythmie, ↓ou↑ période (trois mutations différentes)	(Konopka and Benzer, 1971; Allada et al., 1998)
<i>tim</i>	Transposon	<b>DD</b> : arythmie, ↓ou↑ période	(Sehgal et al., 1994)
<i>clock</i>	EMS (codon stop prématuré :Δtranscriptional activation domain)	<b>LD</b> : pas d'anticipation (M et E) <b>DD</b> : arythmie	(Allada et al., 1998)
<i>cycle</i>	EMS (null mutant)	<b>LD</b> : ↑période (free run) <b>DD</b> : arythmie	(Rutila et al., 1998)
<i>cry</i>	EMS (Δsite de liaison à la flavine)	<b>LD/DD</b> : rythmique <b>Phase shift</b> : affecté <b>LL</b> : rythmique, ↑période	(Stanewsky et al., 1998; Helfrich-Förster et al., 2001)
<i>glass</i>	Affection de l'œil, HB eyelet, ocelles	<b>LD</b> : rythmique <b>LL</b> : faible pourcentage rythmique	(Helfrich-Förster et al., 2001)
<i>glass,crys</i>		<b>LD</b> : free run <b>LL</b> : rythmique	(Helfrich-Förster et al., 2001)

**Table 1 : Phénotypes locomoteurs de différentes mutations de gènes de l'horloge moléculaire ou de structures photosensibles de la drosophile *D.melanogaster***

Après cette introduction générale sur les rythmes circadiens, les chapitres suivants sont destinés à présenter les connaissances acquises autour des rythmes circadiens chez les vertébrés (mammifères, reptiles, oiseaux, et poissons téléostéens). Ces chapitres permettent une comparaison de la base génétique des rythmes circadiens, de l'organisation du système circadien et du photoentrainement pour ces espèces, ainsi qu'une description plus fournie de l'implication d'un photopigment particulier étudié au cours de cette thèse, la mélanopsine, et des cellules qui l'expriment. Bien que la mélanopsine ne soit pas exprimée chez les invertébrés, une brève partie est consacrée à un invertébré, la drosophile *D.melanogaster*, puisque c'est un modèle pionnier dans l'étude des rythmes circadiens qui présente une organisation du système circadien et un mécanisme de photoentrainement intéressant.

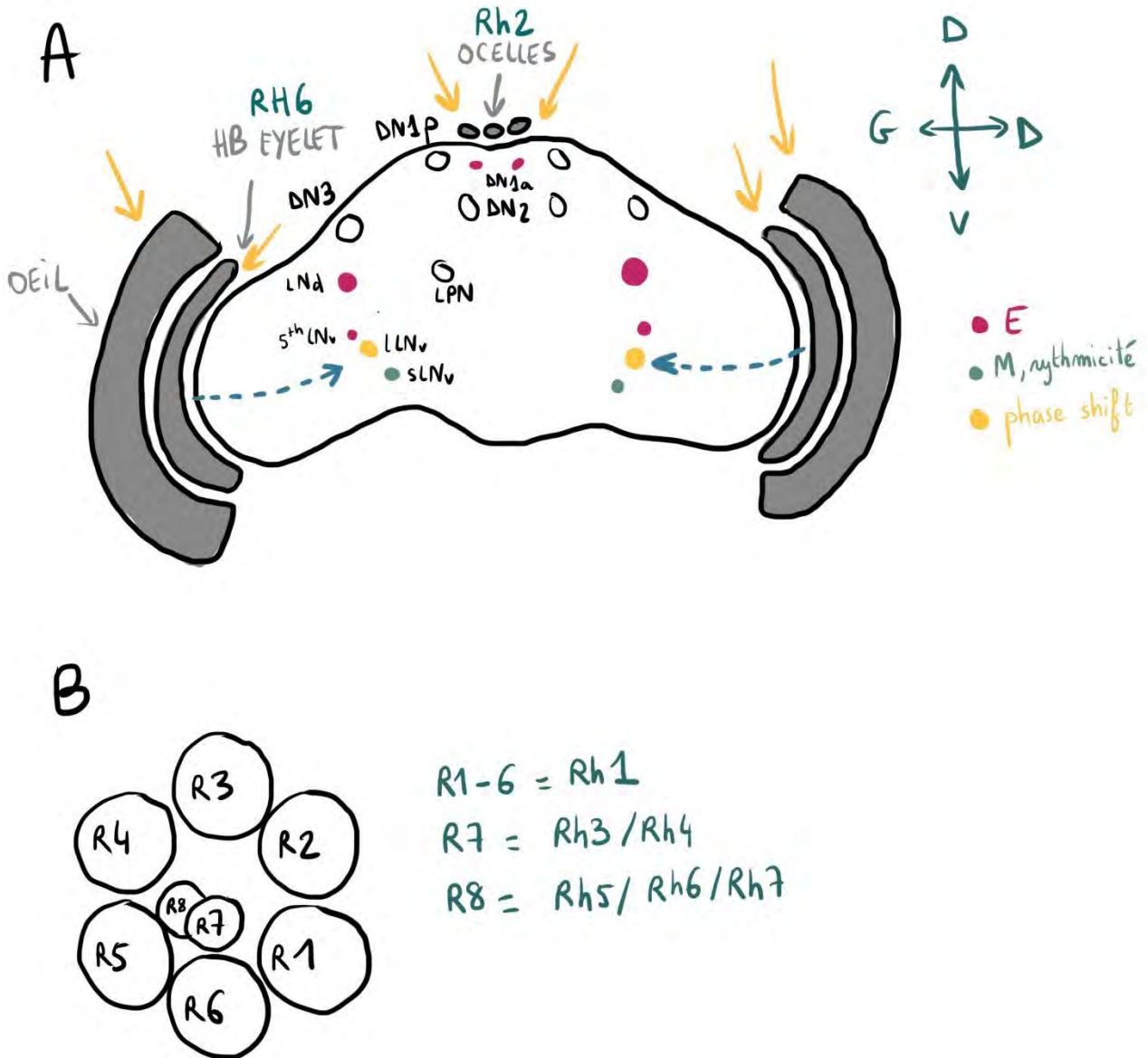
## II. Les rythmes circadiens chez la drosophile *D.melanogaster*

### A. Activité locomotrice de la drosophile

Comme évoqué plus haut, la très grande majorité des études effectuées pour décoder la composition de l'horloge moléculaire et du système circadien de la drosophile se sont basées sur l'étude de mutants affectant le rythme circadien de l'activité locomotrice. Chez les drosophiles adultes en laboratoire, l'activité locomotrice est crépusculaire : elle présente un profil bimodal, avec une forte activité en début de matinée et en fin de journée. Cette augmentation de l'activité est précédée par une anticipation de l'allumage et de l'extinction de la lumière, appelée M (pour « morning ») pour l'anticipation du matin et E (pour « evening ») pour l'anticipation du soir, qui sont générées par l'horloge circadienne (Fig 4) (Tataroglu and Emery, 2014).

### B. Base génétique des rythmes circadiens de la drosophile

Beaucoup de mutants de gènes circadiens ont été générés ou identifiés chez la drosophile, principalement via des cribles génétiques de mutations à l'EMS. Au niveau de l'activité locomotrice, la plupart des mutations entraînent un allongement ou un raccourcissement de la période ou provoquent une arythmie en DD. Cette arythmie est souvent accompagnée d'une perte de l'anticipation M et E en LD, comme dans le mutant null *per<sup>0</sup>*, ce qui appuie le fait que ces processus sont contrôlés par l'horloge circadienne (Table 1).



**Figure 5 : Neurones 'clock' et structures photoréceptrices de la drosophile**

**A.** Distribution des différents groupes de neurones 'clock' (s-LNv, l-LNv, 5th-LNv, LNd, DN1a, DN1p, DN2, DN3, LPN) et de leur rôle dans la régulation circadienne de l'activité locomotrice, ainsi que des structures photoréceptrices (œil, HB eyelet, ocelles) et des rhodopsines (Rh2, Rh6) exprimées dans les ocelles et l'HB eyelet (modifié de Tataroglu et Emery 2015). Les flèches jaunes représentent les structures photosensibles et les flèches en pointillés la connexion neuronale entre l'œil et l'HB eyelet avec les neurones LNvs. **B.** Représentation d'une ommatidie vue du dessus avec les différents photorécepteurs (R1 à R8) et rhodopsines (Rh1, Rh3, Rh4, Rh5, Rh6, et Rh7, dont la localisation précise est encore débattue) exprimées dans l'œil de drosophile.

## C. Organisation du système circadien de la drosophile

### 1. Les neurones clock

Chez la drosophile, l'horloge principale n'est pas contenue dans une structure définie comme ce qui est le cas chez les vertébrés et qui sera décrit plus tard, mais elle est constituée d'un réseau de différentes populations de neurones localisés dans le cerveau appelés neurones clock. Un groupe de neurone clock semble cependant avoir un rôle plus important dans la maintenance des rythmes circadiens en DD et peut-être assimilé à une horloge principale, le groupe sLNv. Les neurones clock ont été identifiés par l'expression des protéines PER et TIM et nommés selon leur localisation anatomique dans le cerveau. On retrouve ainsi les neurones ventraux-latéraux (LNvs), subdivisés en small-LNv (s-LNv), large-LNv (l-LNv) et 5ths-LNv (neurones LNvs n'exprimant pas PDF), les neurones dorsaux-latéraux (LNds), les neurones dorsaux (DN1a, DN1p, DN2 et DN3), et les neurones latéraux-postérieurs (LPNs). La plupart des neurones LNvs expriment le PDF (Pigment Dispersing Factor), un neuropeptide qui permet la synchronisation des neurones clock (Tataroglu and Emery, 2014). (Fig 5.A)

### 2. Rôle des neurones clock

Le rôle de chaque groupe de neurones clock a élégamment été étudié en analysant l'effet de la re-expression de *per* dans chaque groupe de neurones dans le mutant *per<sup>0</sup>*, ou en éliminant spécifiquement certains groupes de cellules. Il a ainsi été établi que l'anticipation M et E et la rythmicité de l'activité locomotrice étaient générés par différents groupes de neurones. Ainsi le sauvetage de *per* dans les LNvs permet par exemple de retrouver l'anticipation M, et le sauvetage dans les LNvs et LNds permet de retrouver l'anticipation E. L'élimination à la fois des neurones LNds, 5th-LNv et DN1 supprime quant à elle l'anticipation E. Enfin le sauvetage de *per* dans les neurones LNvs permet de retrouver une activité rythmique en DD, et l'élimination des neurones PDF des LNvs (ou la mutation de PDF) élimine l'anticipation M et provoque une arythmie de l'activité locomotrice en DD. Ces différentes expériences couplées à des expériences complémentaires ont permis de définir les structures impliquées dans la régulation circadienne de l'activité locomotrice (Tataroglu and Emery, 2014) (Fig 5.A) :

- anticipation E : LNd, 5ths-LNv, DN1
- anticipation M : s-LNv
- rythmicité : s-LNv
- phase shift : possible contribution des l-LNv

### 3. Connectome des neurones clock

La neurones *clock* sont interconnectés entre eux et envoient principalement des projections sur deux structures : la partie du cerveau dorsal qui comprend le pars intercerebralis, équivalent fonctionnel de l'hypothalamus, et la médulla accessoire (aME), une structure entre les lobes optiques et le cerveau qui reçoit elle-même des afférences de l'œil et des *eyelet* de Hofbauer-Buchner (HB eyelet), une structure photosensible située sous l'œil.

Les LNvs reçoivent des afférences de l'œil, et des HB eyelet (Fig 5.A).

#### D. Photosensibilité de la drosophile

##### 1. Structures et molécules photosensibles de la drosophile

La drosophile possède trois différentes structures photosensibles : l'œil, l'eyelet de Hofbauer-Buchner (HB eyelet) situé sous l'œil, et trois ocelles situés sur le dessus de la tête (Fig 5.A). L'œil est composé d'environ 800 ommatidies, qui contiennent chacune une cornée et huit cellules photosensibles appelées photorécepteurs (R1 à R8) (Fig 5.B). Le HB eyelet contiennent 4 photorécepteurs, et chaque ocelle comprend 80 photorécepteurs.

Les photorécepteurs expriment des protéines sensibles à la lumière appelées rhodopsines, qui sont différentes selon les photorécepteurs. Ainsi les photorécepteurs R1 à R6 de l'œil expriment la rhodopsine Rh1 sensible à la lumière verte/bleue, les récepteurs R7 la rhodopsine Rh3 ou la Rh4 sensibles aux UV, et les récepteurs R8 la rhodopsine Rh5 sensible à la lumière bleue, la rhodopsine Rh6 sensible à la lumière verte, ou la rhodopsine Rh7, qui ne conférerait pas une photosensibilité *per se* mais permettrait de médier la photosensibilité de Rh6. La rhodopsine Rh6 est également exprimée dans les photorécepteurs de l'HB eyelet, et les photorécepteurs des ocelles expriment la rhodopsine Rh2 (Sabat et al., 2017; Senthilan et al., 2019).

Une des particularités de la drosophile par rapport aux vertébrés est que la protéine CRY est directement photosensible. CRY est exprimée dans certains neurones clock (LNvs, LNds, DN1a, DN1p, mais pas dans DN3s et LPNs) et dans l'œil (Yoshii et al., 2008). CRY est aussi exprimée dans les tissus périphériques, comme dans l'intestin (Agrawal et al., 2017).

La drosophile présente donc une photosensibilité à partir d'organes dédiés (œil, HB eyelet, ocelle) mais également dans certains neurones et organes périphériques.

## 2. Régulation circadienne et non circadienne de l'activité locomotrice de la drosophile

### a) Photoentrainement

A la fois les structures dédiées à la photosensibilité et la protéine CRY contribuent au photoentrainement de l'activité locomotrice chez la drosophile. En effet des mutants n'ayant pas d'œil, de HB eyelet et d'ocelles (mutants *glass60j*) ou des mutants *cryb* présentent une activité locomotrice qui est toujours entraînée en LD. Cependant des doubles mutants *glass60j* et *cryb* sont en free run en LD. De plus il est nécessaire d'avoir cette double mutation pour observer un fort phénotype en LL : alors que la plupart des drosophiles wild-type sont immédiatement arythmiques en LL, les drosophiles portant la double mutation ont une activité locomotrice rythmique avec une période d'environ 24h. Les drosophiles ne portant qu'une seule des deux mutations ont un phénotype moins appuyé : un faible pourcentage de mutants *glass60j* a une activité rythmique et les mutants *cryb* ont une activité rythmique, mais cependant ces mutants *cryb* ont une période de plus de 24 heures ce qui reflète un effet de la lumière toujours présent chez ces drosophiles (Helfrich-Förster et al., 2001, Table 1). Il est décrit que tous les types de photorécepteurs de l'œil contribuent au photoentrainement, mais que les photorécepteurs de l'œil exprimant Rh6 ont un rôle plus important, peut-être du fait qu'ils représentent un centre intégrateur des autres photorécepteurs de l'œil (ils reçoivent en effet des afférences des autres photorécepteurs de l'œil), et pourraient être fonctionnellement semblables aux cellules ganglionnaires de la rétine des vertébrés (qui seront décrits plus tard) (Senthilan et al., 2019).

### b) Masking lors d'une réponse à une transition lumineuse

Suite à une transition lumineuse, on peut observer une augmentation du niveau d'activité dans le cas d'une transition nuit vers jour (LIGHT ON) et une baisse du niveau d'activité » dans le cas d'une transition jour vers nuit (LIGHT OFF) chez les drosophiles wild-types. Cette réponse semble médiée par l'œil, puisqu'elle n'est pas détectée dans les drosophiles portant des mutations affectant le développement de l'œil. Cependant les doubles mutants *glass60j ; cryb*, qui ont une activité arythmique en LD, présentent une réponse aux transitions résiduelle : suite à une transition nuit vers jour (LIGHT ON) on peut observer dans ce cas une baisse de leur activité locomotrice et suite à une transition jour vers nuit (LIGHT OFF) on observe une hausse de l'activité locomotrice (Rieger et al., 2003; Senthilan et al., 2019). D'autres structures ou molécules semblent donc impliquées dans ce processus. De ce fait, un des mutants *cycle* (mutation nulle) entraîne une activité locomotrice en free-run

en LD, qui pourrait indiquer une implication de ce gène, peut-être via l'horloge moléculaire, dans le masking (Rutila et al., 1998, Table 1).

### III. Les rythmes circadiens chez les mammifères

La partie suivante est consacrée à décrire comment les rythmes circadiens sont générés et photoentrainés chez les mammifères. La plupart des informations décrites proviennent d'études faites sur des rongeurs nocturnes (hamster, souris, rat) qui représentent les modèles les plus étudiés en chronobiologie. Quelques données existent chez l'humain, qui, pour des raisons évidentes, n'est pas un modèle très étudié dans les mécanismes sous tendant les processus chronobiologiques.

#### A. Base génétique des rythmes circadiens chez les mammifères

##### 1. Base génétique des rythmes circadiens : l'horloge moléculaire des mammifères

La boucle principale de l'horloge moléculaire des mammifères est très semblable à celle de la drosophile (Fig 3.B) : elle est constituée des éléments positifs *bmal1*, *bmal2* (orthologues de *Cyc*), et *clock* et des éléments négatifs *per1*, *per2*, *per3*, *cry1* et *cry2*. *Cry1* et *cry2* font partie de la famille des cytochromes mais ne sont pas sensibles à la lumière comme chez la drosophile (Bhadra et al., 2017). Le gène *clock* est quant à lui exprimé de manière constante chez les mammifères nocturnes comme la souris et la rat, et de manière rythmique chez les mammifères diurnes, comme le mouton, les capucins et le rat rayé (Yan et al., 2018). Un gène homologue de *tim* a été identifié chez les mammifères, mais son rôle dans l'horloge circadienne est débattue (Gotter, 2006; Kurien et al., 2019) .

##### 2. Mutations des gènes de l'horloge chez les mammifères

La mutation d'un des gènes de la boucle principale de l'horloge moléculaire chez les mammifères résulte souvent en l'altération de la période endogène de l'horloge (Table 2). Ainsi les souris mutantes perte de fonction pour *clock* ont une activité locomotrice rythmique en DD mais avec une période diminuée d'environ 20min par rapport aux contrôles (Debruyne et al., 2006). Une mutation perte de fonction de *per1* (Zheng et al., 2001), *per2* (Zheng et al., 1999), *per3* (Shearman et al., 2000) ou *cry1* (van der Horst et al., 1999) entraîne également une réduction de la période de l'activité locomotrice des souris en DD, tandis qu'une mutation de *cry2* entraîne son allongement (van der Horst et al., 1999). De façon intéressante *bmal1* (anciennement appelé *mop3*) est l'un des seuls gènes de l'horloge moléculaire qui, lorsqu'il est muté (mutation qui conduit à la perte du domaine PAS de la protéine, impliqué dans l'interaction avec CLOCK), conduit les souris à avoir une activité locomotrice arythmique en



Gène	Mutation	Phénotype (activité locomotrice)	Références
<i>clock</i>	ENU (dominant négatif ?)	<b>LD</b> : rythmique <b>DD</b> : arythmie	(Vitaterna et al., 1999)
<i>clock</i>	Dominant négatif ( $\Delta$ bHLH liaison <i>bmal</i> )	<b>LD</b> : rythmique <b>DD</b> : rythmique ( $\downarrow$ période) <b>Phase shift</b> : altéré	(Debruyne et al., 2006)
<i>per1</i>	perte de fonction	<b>DD</b> : rythmique ( $\downarrow$ période)	(Zheng et al., 2001)
<i>per2</i>	perte de fonction	<b>DD</b> : rythmique ( $\downarrow$ période)	(Zheng et al., 1999)
<i>per3</i>	null (-1,6kb pas de prot)	<b>DD</b> : rythmique ( $\downarrow$ période)	(Shearman et al., 2000)
<i>cry1</i>	perte de fonction	<b>DD</b> : rythmique ( $\downarrow$ période)	(van der Horst et al., 1999)
<i>cry2</i>	perte de fonction	<b>DD</b> : rythmique ( $\uparrow$ période)	(van der Horst et al., 1999)
<i>bmal1</i>	Dominant négatif ( $\Delta$ domaine PAS liaison <i>clock</i> )	<b>LD</b> : $\downarrow$ activité <b>DD</b> : arythmie	(Bunger et al., 2000)
<i>per1/2</i>	Null (exons 4-18 remplacé par Hprt ;	<b>LD</b> : rythmique (double mutant) <b>DD</b> : arythmie (double mutant) <b>Phase shift</b> : per1 pas d'avance (late night pulse) per2 : pas de retard (early night)	(Albrecht et al., 2001; Zheng et al., 2001)
<i>cry1/2</i>	nulle (délétion 9/7kb)	<b>LD</b> : rythmique (double mutant) <b>DD</b> (activité) : arythmie (double mutant)	(van der Horst et al., 1999)

**Table 2 : Phénotypes locomoteurs de différentes mutations de gènes de l'horloge moléculaire chez la souris**

DD (Bunger et al., 2000). Cette mutation s'accompagne d'une expression arythmique de *per1* et *per2* détectée par hybridation *in situ* en DD ainsi qu'une baisse de l'activité locomotrice en LD. Cependant BMAL1 régule l'expression de *bmal2*, et muter le gène *bmal1* revient donc fonctionnellement à créer un double mutant *bmal1/2* (Shi et al., 2010). Un des mutants murins *clock* (*clock*<sup>Δ19</sup>) généré par mutation aléatoire chimique à l'ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) présente également une activité locomotrice arythmique en DD (Vitaterna et al., 1994), cependant un autre mutant où les exons 5 et 6 ont été délétés du gène a une activité locomotrice tout à fait rythmique en DD (DeBruyne et al., 2006). La différence entre ces deux mutations pourrait résider dans la capacité de la protéine NPAS2 (neuronal PAS domain protein 2, qui présente de grandes similarités de séquence avec CLOCK en particulier dans le domaine bHLH-PAS) à pouvoir interagir et remplacer CLOCK dans le mutant de DeBruyne mais pas dans celui de Vitaterna. En effet, bien que les mutations affectent toutes deux le domaine bHLH de CLOCK, le mutant de DeBruyne est considéré perte de fonction car la protéine CLOCK ne semble plus exprimée, tandis que celui de Vitaterna est considéré comme un dominant négatif, et la protéine mutante CLOCK<sup>Δ19</sup> est toujours capable de se lier à BMAL1.

Pour avoir une activité locomotrice arythmique en DD chez les mammifères, il est nécessaire de muter les gènes de la boucle principale de l'horloge moléculaire par « paires » : l'activité locomotrice de souris présentant des mutations perte de fonction pour à la fois *per1* et *per2* (Zheng et al., 2001), *cry1* et *cry2* (van der Horst et al., 1999) ou *clock* et *npas2* (DeBruyne et al., 2007) est ainsi arythmique en DD. Le cas des gènes *per* est particulier puisqu'il existe trois paralogues chez les mammifères (PER1, 2 et 3), mais peu de données sont disponibles sur la fonction de PER3.

Ces différents mutants soulignent l'importance de chaque couple de gènes de la boucle principale (BMAL1/2, CLOCK/NPAS2, PER1/2, CRY1/2), qui sont essentiels pour générer un rythme d'activité locomoteur endogène, mais également la redondance qui existe entre chaque membre d'un même couple pour assurer le maintien de rythmes circadiens. Cette horloge moléculaire est donc robuste, et maintenir des rythmes circadiens semble être un processus essentiel.

### 3. Variants humains des gènes de l'horloge

Des variants de gènes de l'horloge existent chez l'humain, dont certains sont liés à des dérégulations de rythmes circadiens comme les rythmes veille/sommeil (Table 3).

Le premier variant identifié est un variant de *per2*, associé à un syndrome familial d'avance de phase de sommeil (endormissement et réveil très tôt, soit des personnes très

Gène	Mutation	Phénotype (activité locomotrice)	Références
<i>per2</i>	Hypophosphorylation par CKI (S662G)	<b>FASPS</b> : réveil tôt et coucher tôt	Xu <i>et al.</i> , 2007(Xu et al., 2007)
<i>per3</i>	↓ stabilité de la protéine	<b>FASPS</b> : réveil tôt et coucher tôt	(Zhang et al., 2016)
<i>cry1</i>	↑ activité d'inhibition de CLOCK/BMAL	<b>FDSPD</b> : réveil tard et coucher tard	(Patke et al., 2017)

**Table 3 : Variants de gènes de l'horloge associés à des dérégulations des rythmes circadiens chez l'humain**

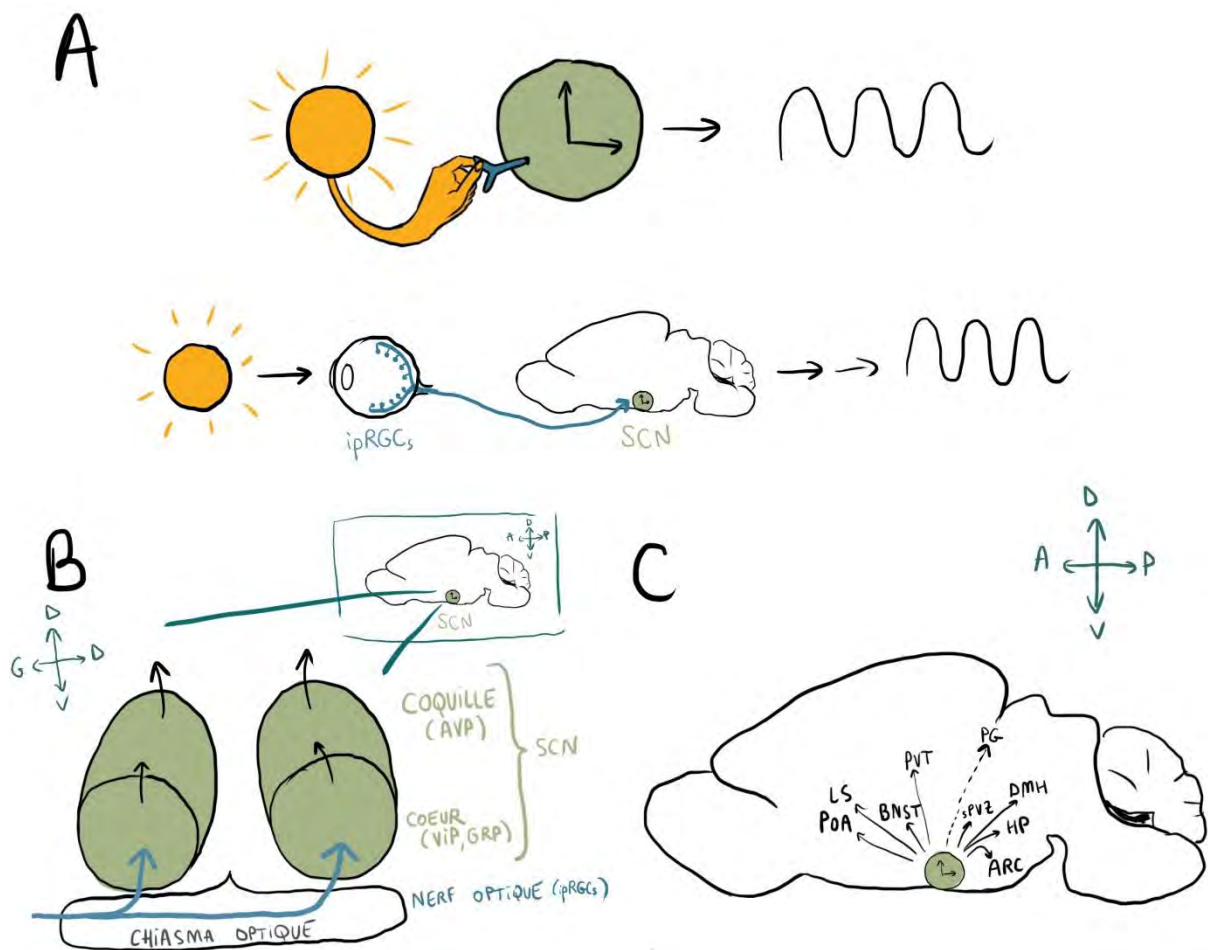
matinales). La modélisation de ce variant chez la souris reproduit le syndrome observé chez les humains, avec une période plus courte de leur rythme d'activité locomotrice en DD et une avance de phase en LD (Xu et al., 2007).

Deux variants de *per3*, qui réduisent la stabilité de la protéine PER3, sont également associés à un syndrome familial d'avance de phase de sommeil (Zhang et al., 2016a). Chez les souris possédant le variant, l'activité locomotrice est rythmique avec la même période que celles ayant la version humaine non mutée PER3 en LD et DD. Cependant la période de leur activité locomotrice est allongée en LL, suggérant une altération de la réponse à la lumière de ces variants PER3. Ceci pourrait expliquer que les individus atteints de ce syndrome ont plus de mal à s'adapter au changement de la durée du jour en hiver. Les drosophiles portant le variant ont un phénotype qui se rapproche plus des patients : elles débutent leur activité plus tôt en LD que les drosophiles contrôles, et la période de leur activité locomotrice est raccourcie en DD, un phénomène qui est aussi décrit chez les patients présentant ce syndrome (Jones et al., 1999). Les variants de PER3 semblent donc bien être en cause dans le syndrome familial d'avance de phase de sommeil chez l'humain.

Un autre syndrome, le syndrome familial de retard de phase de sommeil, où les sujets se couchent et se lèvent très tard est associé à un variant de *cry1* dans lequel l'exon 11 n'est pas transcrit. Ce variant a *in vitro* une activité inhibitrice plus importante sur CLOCK et BMAL1, due à une affinité accrue avec BMAL1, ce qui conduit à un allongement de la période de l'horloge moléculaire observée dans des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) exprimant le rapporteur *Bmal1:luciferase*, pouvant expliquer un retard de phase de sommeil (Patke et al., 2017). Aucun modèle animal n'a pour le moment été utilisé pour valider cette théorie.

## B. Organisation du système circadien des mammifères

Chez les mammifères, l'organisation du système circadien est bien décrite et considérée comme hiérarchique : ce système est articulé autour d'une horloge principale, le noyau suprachiasmatique, qui coordonne aux signaux extérieurs lumineux les autres horloges de l'organisme appelées horloges périphériques. Le noyau suprachiasmatique coordonne les horloges de l'organisme, comme celle présente dans la glande pinéale, via des voies nerveuses et hormonales et reçoit les informations lumineuses provenant exclusivement d'une population de cellules de l'œil, les ipRGCs (« intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells ») (Fig 6.A).



**Figure 6 : Le système circadien des mammifères est organisé autour d'une horloge principale, le noyau suprachiasmatique (SCN)**

**A.** Chez les mammifères, l'horloge principale (SCN, en vert), coordonne les horloges de l'organisme pour générer des rythmes circadiens. La lumière influence le SCN via une population de cellules de la rétine, les ipRGCs (en bleu). **B.** Schéma simplifié de l'organisation du SCN (en vert). La partie cœur du SCN contient des neurones VIP et GRP et reçoit des afférences de la rétine (en bleu). La partie coquille contient principalement des neurones AVP et est à l'origine de la plupart des efférences du SCN. **C.** Schéma simplifié des projections du SCN, adapté de Dibner *et al.*, 2010. Le SCN envoie des projections dans l'hypothalamus : zone subparaventriculaire (SPVZ), noyau préoptique ventrolatéral (POA), noyau du lit de la strie terminale (BNST), septum latéral (LS), hypothalamus dorsomédian (DMH), noyau arqué (ARC), hypothalamus postérieur (HP) ; il envoie également des projections dans le noyau paraventriculaire (PVT) du thalamus et de façon indirecte (flèche pointillée) vers la glande pinéale (GP).

## 1. Un système organisé autour d'une horloge principale, le SCN

Tandis que chez la drosophile, les neurones clock forment un réseau de différentes populations de neurones latéraux et dorsaux impliqués dans différents aspects de la régulation des rythmes circadiens, chez les mammifères ils sont compris dans une structure, le noyau suprachiasmatique (SCN). Le SCN comprend deux clusters de neurones localisés dans l'hypothalamus au-dessus du chiasma optique, qui possèdent chacun environ 10 000 neurones. Il a été identifié comme l'horloge principale chez les mammifères dans les années 1970 par des études de lésions. En effet il a été observé que la lésion du SCN entraîne une arythmie de l'activité locomotrice des hamsters en DD, et que la transplantation d'un SCN d'un hamster mutant ayant une période endogène courte (mutant *tau*, période d'environ 20h) permet de restaurer le rythme de l'activité locomotrice des hamsters lésés, et ce avec la période endogène de l'individu donneur. Ces observations ont ensuite été répétées chez d'autres espèces comme la souris et le rat (Dibner et al., 2010). Plusieurs cas d'altération de la région du SCN chez des patients (tumeur, lésion) corrèle avec des altérations de certains rythmes circadiens (Haugh and Markesbery, 1983; Schwartz et al., 1986; Cohen and Albers, 1991; DelRosso et al., 2014), indiquant une conservation du rôle du SCN chez les humains. Chez les mammifères étudiés, le SCN présente des oscillations circadiennes au niveau moléculaire et cellulaire qui persistent de façon autonome, comme l'expression des gènes de l'horloge circadienne moléculaire, la sécrétion de neuropeptides et neurotransmetteurs ou encore l'activité électrique de ses neurones (Dibner et al., 2010). Le SCN peut être anatomiquement divisé en une partie ventrolatérale appelée cœur, qui contient des neurones à peptide vasoactif intestinal (VIP) et des neurones libérant la gastrine (GRP), et une partie dorsomédiane appelée coquille, contenant principalement des neurones à vasopressine (AVP). La partie cœur reçoit des afférences directes et indirectes (par le biais des feuillets intergénéculés) de la rétine, ce qui permet son photoentrainement, et la partie coquille est synchronisée par la partie cœur grâce à différents neurotransmetteurs comme le VIP, la GRP et la substance P. La partie cœur est ainsi considérée comme la partie intégrant les signaux extérieurs et la partie coquille comme celle à l'origine de la plupart des efférences du SCN (Xie et al., 2019) (Fig 6.B).

## 2. Influence du SCN sur les horloges périphériques

Le SCN a longtemps été considéré comme le seul organe possédant une horloge circadienne pouvant osciller de manière autonome et qui était nécessaire pour que les horloges périphériques oscillent. Cependant il s'avère que l'on peut observer la persistance

d'oscillations moléculaires de gènes de l'horloge, grâce à un rapporteur luciférase, dans des tissus périphériques après lésion du SCN ou lorsqu'ils sont isolés (Yoo et al., 2004). Ces oscillations ne sont cependant plus en phase entre les différents tissus, et le SCN serait donc un coordinateur des différentes horloges de l'organisme, permettant de synchroniser les horloges périphériques entre elles tout en tenant compte des conditions environnementales. Cette coordination est possible par le biais de voies hormonales et nerveuses : en effet, la transplantation d'un SCN entouré d'une membrane semi-perméable, qui empêche le développement d'axones, peut toujours rétablir un rythme de l'activité locomotrice, ce qui suggère un rôle crucial de facteurs diffusibles. Cependant la transplantation d'un SCN embryonnaire, qui établit très peu de connexions neuronales, n'est pas suffisante pour rétablir des rythmes circadiens hormonaux, suggérant un rôle important des influx neuronaux (Li et al., 2012). Le SCN est donc source de messages hormonaux et nerveux, détaillés dans les paragraphes suivants.

#### a) Influences nerveuses du SCN

Le SCN envoie principalement des projections neuronales dans l'hypothalamus et les noyaux thalamiques (Dibner et al., 2010) (Fig 6.C). Dans l'hypothalamus, il projette majoritairement dans la zone subparaventriculaire (sPVZ), impliquée dans le contrôle des rythmes de température, sommeil et activité locomotrice (Vujovic et al., 2015), mais également dans le noyau préoptique ventrolatéral (POA), un petit cluster de neurones régulateurs du sommeil (Brown et al., 2012), le noyau du lit de la strie terminale (BNST), une structure hétérogène et complexe qui joue un rôle important dans le contrôle d'un large spectre de fonctions physiologiques et comportementales (Crestani et al., 2013), le septum latéral (LS), qui joue un rôle clef dans la réponse au stress et le processus émotionnel (Singewald et al., 2011), l'hypothalamus dorsomédian (DMH), qui lorsqu'il est lésé entraîne une atténuation des rythmes de sommeil, d'activité locomoteur et de prise de nourriture (Chou et al., 2003), le noyau arqué (ARC), impliqué dans la régulation de la prise de nourriture et la régulation du rythme de température et de l'activité locomotrice (Wiater et al., 2013) et l'hypothalamus postérieur (HP), qui contient des neurones à hypocrotine et à MCH (melanin-concentrating hormone) impliquées dans la régulation du sommeil et de l'éveil (Abrahamson et al., 2001). Dans le thalamus, le SCN envoie des projections dans le noyau paraventriculaire (PVT), qui innerve diverses régions impliquées dans la régulation de comportements (Kirouac, 2015). Le SCN, par une voie multi-synaptique, innerve également la glande pinéale. Cette structure sécrète la mélatonine de façon circadienne. Ce rythme de sécrétion est dépendant

du SCN, puisqu'une lésion de cette structure entraîne l'arythmie de la sécrétion de mélatonine (Meyer-Bernstein et al., 1999). La mélatonine est sécrétée la nuit que l'espèce soit diurne ou nocturne, et sa sécrétion est inhibée par la lumière : elle est donc considérée comme un signal d'obscurité plutôt que comme l'hormone du sommeil. La mélatonine possède deux récepteurs (MT1 et MT2), notamment présents au niveau du SCN. L'administration de mélatonine *in vitro* induit l'inhibition de l'activité électrique du SCN via les récepteurs MT1, et un décalage de phase de cette activité électrique, probablement via les récepteurs MT2 (Sapède and Cau, 2013). *In vivo*, un traitement à la mélatonine est capable d'entraîner ou de décaler les rythmes de veille/sommeil chez les rats et les humains (Arendt, 2019). La glande pinéale, via la sécrétion de mélatonine, pourrait donc avoir un rôle de feedback sur le SCN.

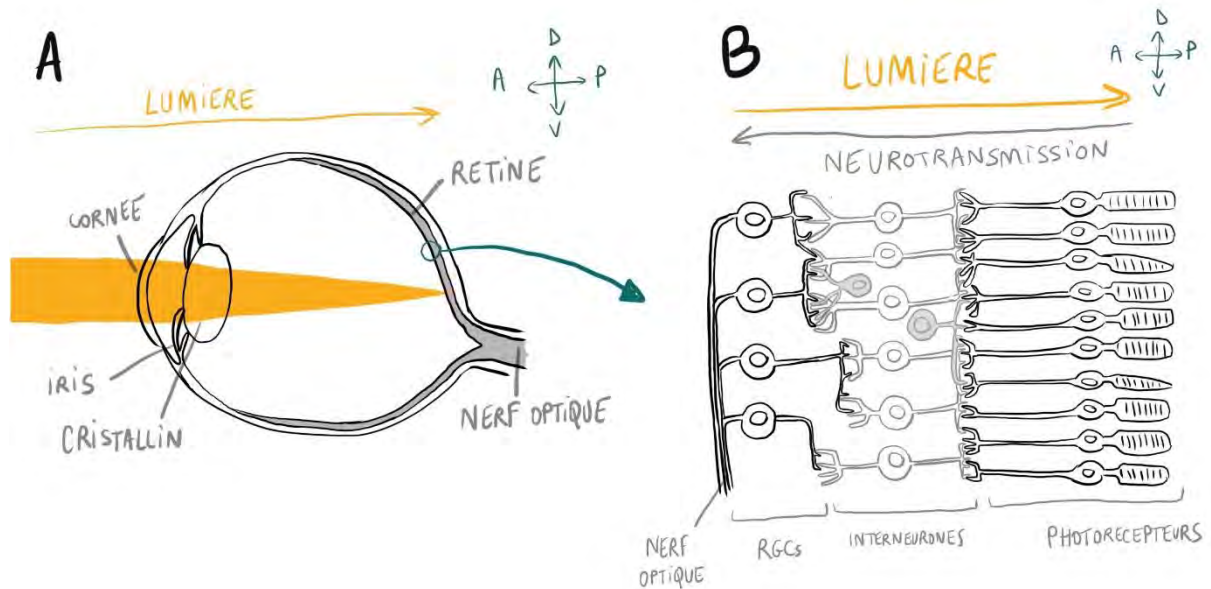
#### b) Influences hormonales du SCN

D'autres molécules directement produites par le SCN pourraient posséder un rôle de synchronisation des horloges périphériques, c'est le cas de l'AVP, la prokinétine 2 (Prok2), le Transforming Growth Factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) et le cardiotrophin-like-cytokine (CLC). La transcription du gène de l'AVP est rythmique et régulée par l'horloge moléculaire dans le SCN, et ce neurotransmetteur pourrait être impliqué dans la synchronisation des neurones du SCN et la régulation circadienne des rythmes hormonaux. Les ARNm de la Prok2 oscillent également dans le SCN : ils sont fortement exprimés pendant le jour et leur transcription est aussi régulée par l'horloge circadienne. L'injection de Prok2 dans le ventricule latéral de rats durant leur phase d'activité (la nuit) inhibe leur activité locomotrice, et les souris mutantes pour le gène codant pour Prok2 ont un rythme atténué d'activité locomotrice, de température, et de sécrétion de glucose. L'injection de TGF $\alpha$  dans le troisième ventricule inhibe quant à elle l'activité locomotrice et dérégule les rythmes veille/sommeil. De la même façon, l'injection de CLC inhibe également l'activité locomotrice (Li et al., 2012). Le SCN, via des facteurs sécrétés, peut donc agir sur des rythmes circadiens comme l'activité locomotrice ou les rythmes veille/sommeil pour les moduler.

### 3. Influence de la lumière sur le SCN : la rétine

Bien qu'une étude parue dans *Science* en 1998 décrive qu'une lumière placée sous le genou puisse provoquer un décalage de phase des rythmes de température corporelle chez l'humain (Campbell and Murphy, 1998), elle a depuis été largement disputée (Wright and Czeisler, 2002; Rüger et al., 2003), et chez les mammifères l'information lumineuse permettant le photoentrainement semble provenir uniquement de l'œil. En effet, le rythme de l'activité locomotrice de souris sauterelles nocturnes (*Onychomys leucogaster*) et





**Figure 7 : Structure de l'œil et de la rétine des vertébrés mammifères**

**A.** L'œil des vertébrés est composé de plusieurs structures, dont la cornée, l'iris, le cristallin, et la rétine, qui contient des cellules dont les axones forment le nerf optique. **B.** La rétine des vertébrés est composée de trois couches : la couche des photorécepteurs, des interneurones et des cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs), dont les axones forment le nerf optique. La couche des interneurones contient des cellules bipolaires (en blanc), des cellules horizontales (en gris en contact avec les photorécepteurs) et des cellules amacrines (en gris en contact avec les RGCs).

d'écureuils terrestres à manteau doré diurnes (*Spermophilus lateralis*) ayant subi une double énucléation n'est plus photoentrainé : en LD, l'activité n'est plus en phase avec le cycle d'illumination et oscille avec la période endogène de l'horloge (moins de 24h pour les souris, plus de 24h pour les écureuils) comme si les individus se trouvaient dans le noir complet (Nelson and Zucker, 1981). De même une énucléation rend les souris totalement insensibles à l'effet d'un pulse de lumière lors de l'expérience de phase shift (Freedman et al., 1999), et certains patients aveugles ont des rythmes de température corporelle et de sécrétion de mélatonine désynchronisés par rapport au rythme jour/nuit (Sack and Lewy, 2001). Les cellules impliquées dans le photoentrainement représentent une population particulière de cellules de la rétine appelées ipRGCs (« intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells ») qui seront décrites plus tard.

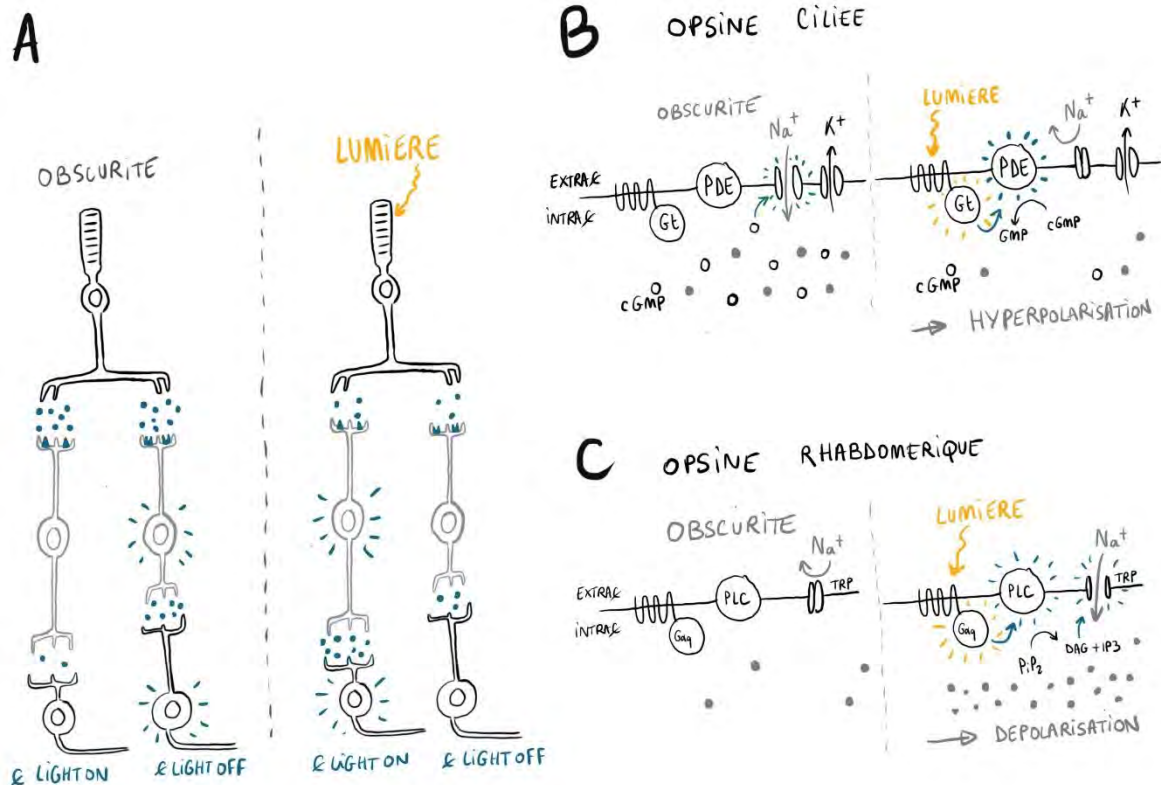
## C. Mécanisme de photoentrainement des rythmes circadiens chez les mammifères

### 1. Structure de la rétine

Pour mieux comprendre quelles cellules sont impliquées dans le photoentrainement chez les mammifères, il est nécessaire de décrire la composition de l'œil et plus particulièrement de la rétine, et le fonctionnement de ses différentes cellules.

L'œil des vertébrés à mâchoires (*gnathostomes*) diffère très peu entre les espèces et est composé de plusieurs structures. Ainsi la cornée est la première structure qui est traversée par la lumière et fait converger les rayons lumineux vers le cristallin. Cette lentille, dont la taille est contrôlée par l'iris, permet de concentrer et projeter les rayons lumineux sur la rétine, qui constitue la partie photosensible de l'œil (Fig 7.A).

La rétine est composée de plusieurs types cellulaires disposés en trois couches principales communiquant entre elles (Fig 7.B). La lumière passe ainsi à travers ces différentes couches pour atteindre les photorécepteurs classiques, qui détectent la lumière et transmettent l'information via influx nerveux aux cellules bipolaires. Ces dernières servent de relais direct entre les photorécepteurs classiques et les cellules ganglionnaires, des neurones de projection qui vont intégrer et relayer l'information du signal lumineux à différentes régions cérébrales. D'autres types de cellules sont présents dans la couche contenant les cellules bipolaires, qui vont moduler l'information du signal lumineux : les cellules horizontales, en contact avec les photorécepteurs classiques et les cellules bipolaires, et les cellules amacrines, en contact avec les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires.



**Figure 8 : Mécanisme de phototransduction**

**A.** Mécanisme de phototransduction au sein de la rétine : dans l'obscurité, les photorécepteurs libèrent du glutamate (en bleu). Les cellules bipolaires LIGHT ON possèdent des récepteurs métabotropes, le glutamate est ainsi perçu comme inhibiteur et induit l'hyperpolarisation de la cellule bipolaire. Cette dernière va réduire sa libération de glutamate, ce qui va induire à son tour l'hyperpolarisation de la cellule ganglionnaire associée. Les cellules bipolaires LIGHT OFF possèdent quant à elles des récepteurs ionotropes, le glutamate est ainsi perçu comme excitateur et va induire la dépolarisation de la cellule bipolaire. Cette dernière va augmenter sa libération de glutamate, ce qui va induire la dépolarisation de la cellule ganglionnaire associée. Le processus inverse se déroule lorsque le photorécepteur est à la lumière (cellules LIGHT ON activées et cellules LIGHT OFF inhibées). Les cellules ganglionnaires LIGHT ON ont généralement leurs dendrites dans la couche la plus interne de la couche plexiforme tandis que les LIGHT OFF ont leurs dendrites dans la couche la plus externe de cette couche. **B.** Cascade de phototransduction induite par une opsine ciliée. Dans l'obscurité, le cGMP (boules blanches vides) est présent en grande quantité et permet l'ouverture des canaux ioniques Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. La lumière induit l'activation de l'opsine et de sa protéine Gt, qui va activer une phosphodiesterase (PDE). Celle-ci va hydrolyser le cGMP en GMP. Le cGMP ne sera plus en quantité suffisante pour permettre l'ouverture des canaux ioniques, ce qui va faire chuter la concentration de cations (en gris) et induire l'hyperpolarisation de la cellule. **C.** Cascade de phototransduction induite par une opsine rhabdomérique. Dans l'obscurité, les canaux TRP sont fermés ce qui ne permet pas l'entrée de cations (en gris). La lumière active l'opsine et sa protéine Gαq, qui active la phospholipase C (PLC). Celle-ci transforme le PiP2 en DAG et IP3 qui permettent l'ouverture des canaux TRP et donc l'influx de cations dans la cellule, ce qui induit la dépolarisation de cette cellule.

### a) Phototransduction dans la rétine

La conversion du signal lumineux en signal électrique, appelé phototransduction, se passe ainsi dans la rétine (Fig 8.A) : dans l'obscurité, les photorécepteurs (cônes et bâtonnets) libèrent du glutamate. Selon le type de récepteur au glutamate que la cellule bipolaire en contact avec le photorécepteur possède à sa membrane, le glutamate sera soit perçu comme inhibiteur (récepteur métabotrope) ou excitateur (récepteur ionotrope). Ainsi si la cellule possède un récepteur de type métabotrope, le glutamate va induire l'hyperpolarisation de la cellule bipolaire (cellule LIGHT ON). Cette dernière va réduire sa propre libération de glutamate, ce qui va entraîner à son tour l'hyperpolarisation de la cellule ganglionnaire associée (cellule LIGHT ON). Si au contraire la cellule bipolaire possède un récepteur de type ionotrope, le glutamate libéré par le photorécepteur va induire la dépolarisation de la cellule bipolaire, qui va augmenter sa propre libération de glutamate (cellule LIGHT OFF). Cela va ensuite induire l'hyperpolarisation de la cellule ganglionnaire associée (cellule LIGHT OFF). Le processus inverse se déroule à la lumière. Les cellules LIGHT OFF sont donc activées dans l'obscurité et les cellules LIGHT ON sont activées par la lumière. Les cellules bipolaires et ganglionnaires entrent en contact via une couche appelée couche plexiforme interne. De manière générale, les cellules bipolaires LIGHT OFF font synapse avec les cellules ganglionnaires dans la partie externe de la couche plexiforme interne (sous-couche LIGHT OFF) et les cellules bipolaires LIGHT ON dans la partie interne de cette même couche (sous-couche LIGHT ON).

### b) Cascade de phototransduction au sein de la cellule

La photosensibilité des photorécepteurs repose sur la présence d'opsines, des protéines photosensibles présentes à leur surface membranaire. Ces opsines sont généralement distribuées dans des repliements formés par la membrane apicale des photorécepteurs. Les opsines font partie de la famille des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires, qui, lorsqu'elles sont liées à un chromophore, forment un photopigment et sont capables de phototransduction, c'est-à-dire de convertir un signal lumineux en signal électrique dans la cellule qui les exprime. Le chromophore confère ainsi la sensibilité à la lumière et l'opsine l'environnement nécessaire à l'absorption d'une ou plusieurs longueurs d'onde particulière. En réaction à l'absorption d'un photon, le chromophore change de conformation (isomérisation de *cis* à *all-trans*), et l'opsine passe d'un état de repos à un état activé. Cela induit l'activation de la protéine G, qui déclenche à son tour une cascade de signalisation différente selon le sous-type de protéine G et conduit à une

réponse cellulaire associée (Fig 8.B-C). Les opsines ciliées, comme celles trouvées dans les photorécepteurs classiques de la rétine des vertébrés, possèdent une protéine G de classe Gt (transducine), qui va activer une phosphodiesterase responsable de l'hydrolyse du cGMP. La concentration de cGMP va ainsi chuter dans la cellule, ce qui va induire la fermeture de canaux ioniques  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Ces cations ne vont plus pouvoir entrer dans la cellule et celle-ci va alors hyperpolariser en réponse à un signal lumineux (Fig 8.B). Au contraire, les opsines rhabdomériques contenant une protéine G de classe  $\text{G}\alpha_q$ , comme les rhodopsines des drosophiles, induisent la dépolarisation de la cellule en réponse à la lumière : cette protéine G active la phospholipase C qui hydrolyse le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en DAG (diacylglycerol) et IP3 (triphosphate d'inositol). Cela va conduire à l'ouverture de canaux ioniques TRP (transient receptor potential) et à l'influx de cations qui induisent la dépolarisation du photorécepteur (Fig 8.C).

## 2. Les cellules ganglionnaires à mélanopsine (ipRGCs)

Puisque l'énucléation des souris conduit à une totale abolition du phase shift mais que ce phase shift n'est pas affecté en l'absence des photorécepteurs classiques (cônes et bâtonnets), cela signifie que d'autres cellules photosensibles existent dans la rétine (Freedman et al., 1999). De plus, si certains patients aveugles présentent une désynchronisation de leurs rythmes circadiens de la température corporelle et de leur sécrétion de mélatonine avec le rythme jour/nuit, d'autres sont capables d'avoir des rythmes de veille/sommeil et de sécrétion de mélatonine entrainés au rythme jour/nuit. Une lumière est capable d'inhiber la sécrétion de mélatonine chez ces derniers patients, mais uniquement si leurs yeux ne sont pas couverts. Cela confirme donc que des cellules de l'œil autres que celles impliquées dans la vision sont photosensibles et capables de médier le photoentrainement de l'horloge circadienne (Czeisler et al., 2009; Sack and Lewy, 2001).

### a) Description de la mélanopsine et des ipRGCs

Ce nouveau type cellulaire de la rétine correspond à une population de cellules ganglionnaires exprimant une opsine sensible à la lumière bleue, la mélanopsine. Ces cellules sont nommées ipRGCs pour « intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells » (Fig 9.A). Cette opsine particulière a été découverte en 1998 dans des cellules dermiques photosensibles de *Xenopus Laevis*, appelées mélanophore, et a été nommée en conséquence mélanopsine (Provencio et al., 1998). Contrairement aux opsines exprimées dans les photorécepteurs classiques de la rétine, la mélanopsine est une opsine de type rhabdomérique. Elle permet aux cellules ganglionnaires qui l'expriment d'acquérir une

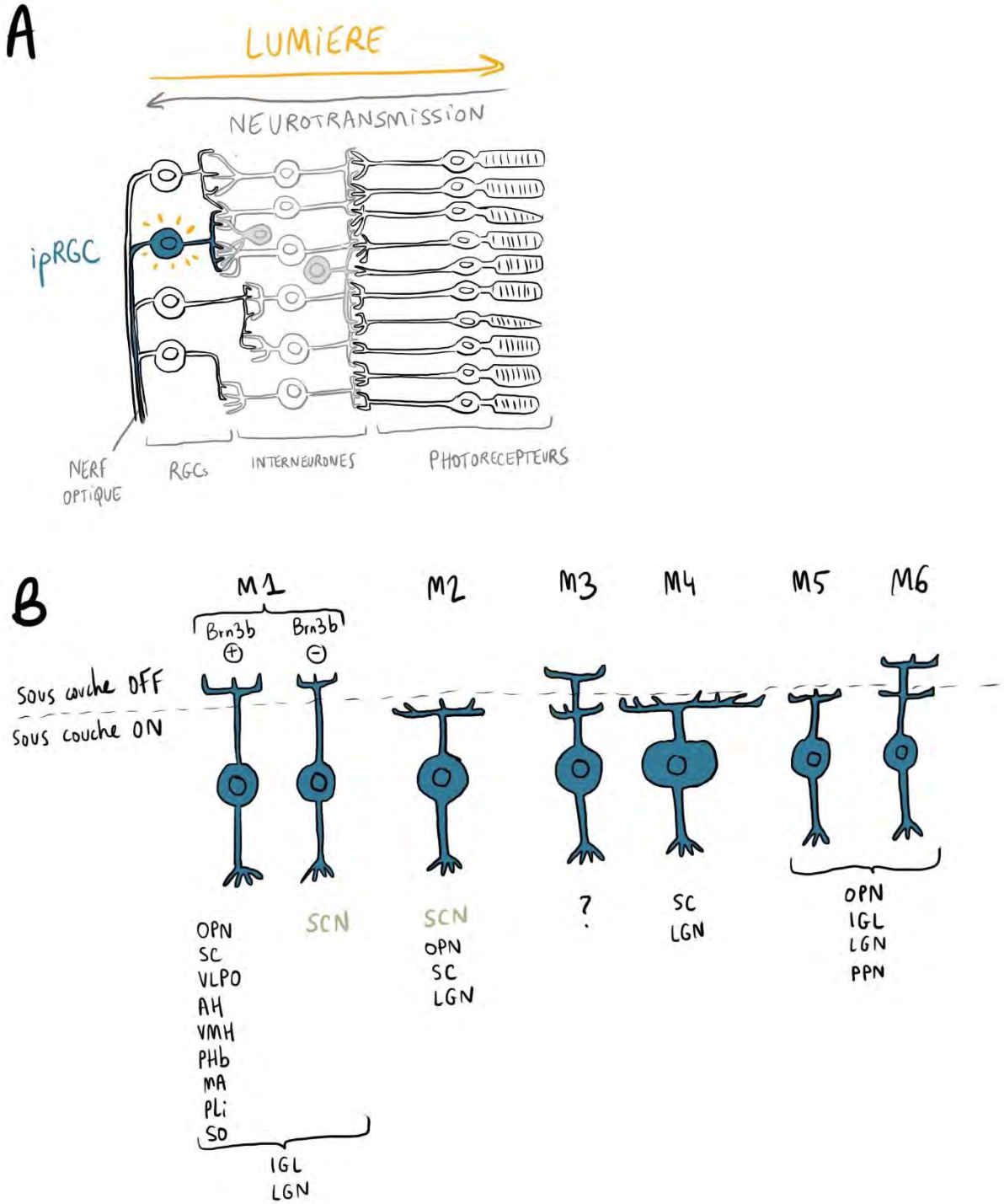
photosensibilité directe à la lumière bleue (elles présentent un pic d'absorbance à une lumière d'environ 480nm dépendante de l'expression de la mélanopsine) (Berson et al., 2002; Lucas et al., 2003). Comme chez les autres mammifères étudiés, les ipRGCs reçoivent l'information lumineuse leur provenant des photorécepteurs classiques de la rétine (cônes et bâtonnets) : en mesurant l'activité électrique des cellules à partir d'explants de rétine humaines, on peut observer que les ipRGCs sont activés par un pulse de lumière même si la neurotransmission provenant des photorécepteurs est bloquée. Cependant cette activation est absente de façon réversible en présence d'une drogue inhibant l'activité de la mélanopsine (Mure, 2021). Les ipRGCs diffèrent des photorécepteurs de la rétine non seulement par leur morphologie mais aussi par la cinétique de leur réponse à la lumière: leur seuil de réponse est plus élevé, elles répondent de façon plus lente et plus soutenue et dépolarisent en réponse à la lumière en utilisant une voie de phototransduction de type rhabdomérique (Berson et al., 2002; Lucas et al., 2003; Panda et al., 2005; Qiu et al., 2005).

Ces photorécepteurs atypiques transmettent l'information du signal lumineux grâce au neurotransmetteur excitateur utilisé par la majorité des cellules ganglionnaires, le glutamate. Ils ont également la particularité d'utiliser à la fois le glutamate et le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) comme neurotransmetteur et/ou neuromodulateur de la réponse au glutamate (Moldavan et al., 2018). Si la plupart des ipRGCs semblent être excitateurs, il a cependant été récemment décrit que certains ipRGCs sécrétaient du GABA, un neurotransmetteur de type inhibiteur (Sonoda et al., 2020).

#### b) Cibles des ipRGCs et sous-types de ipRGCs

L'utilisation d'animaux transgéniques et de traceurs antérogrades injectés dans l'œil a permis de démontrer que les ipRGCs innervent de nombreuses structures cérébrales impliquées dans des fonctions visuelles et non visuelles, dont le SCN. Contrairement à ce qui était pensé lors de leur découverte, les ipRGCs ne constituent pas une population de cellules homogènes et il existe au moins six populations d'ipRGCs caractérisées chez la souris (notées M1 à M6), qui présentent des morphologies, ramifications dendritiques, réponses à la lumière et cibles distinctes (voir Sonoda and Schmidt, 2016; Quattrochi et al., 2019 et leur références pour une description détaillée des types d' ipRGCs et leurs projections). (Fig 9.B) Chez les humains, des ipRGCs semblables aux M1, M2, M3 et M4 ont été identifiés sur leur ressemblance morphologique avec les ipRGCs murins (Mure, 2021).

La population des ipRGCs M1 fut la première décrite et la mieux caractérisée. Ces ipRGCs au petit corps cellulaire sont ceux qui expriment le plus fort taux de mélanopsine et



**Figure 9 : Les ipRGCs sont une population hétérogène de RGCs exprimant la mélanopsine qui projettent vers différentes structures**

**A.** Les ipRGCs constituent une population de RGCs exprimant la mélanopsine. **B.** Six types de populations d'ipRGCs (M1 à M6) sont décrites selon leur morphologie, ramifications dendritiques (sous couches ON ou OFF), réponse à la lumière et projections. OPN : noyau olivaire prétectal, SC : colliculus supérieur, VLPO : noyau préoptique ventrolatéral, AH : hypothalamus antérieur, VMH : noyau ventro médian de l'hypothalamus, PHb : noyau périhabénulaire du thalamus, MA : amygdales médianes, PLi : noyau postérieur limitans, SO : noyau supraoptique, SCN : noyau suprachiasmatique, IGL : feuillets intergénéculés, LGN : noyau géniculé latéral, PPN : noyau prétectal postérieur.

qui ont la réponse intrinsèque à la lumière la plus importante. Bien qu'ils possèdent des ramifications dendritiques dans la sous-couche « OFF » de la couche plexiforme interne de la rétine, des expériences d'électrophysiologie chez le rat avec l'aide de différents inhibiteurs pharmacologiques ont montré que ces ipRGCs recevaient principalement des signaux provenant de cellules bipolaires de type « ON ». Ces signaux leur permettent de répondre plus rapidement à la lumière avec un seuil de sensibilité plus bas par rapport à la réponse intrinsèque des ipRGCs. La photosensibilité intrinsèque des ipRGCs M1 permet quant à elle d'avoir une réponse plus longue et soutenue à un signal lumineux que celles des cellules ganglionnaires non photosensibles (Wong et al., 2007). Les ipRGCs M1 peuvent être subdivisés en deux sous-classes selon qu'ils expriment ou non le facteur de transcription Brn3b (Pou4f2). Grâce à la combinaison de lignées transgéniques *Opn4<sup>cre</sup>* et *Opn4<sup>tau-LacZ</sup>* permettant de suivre les projections des ipRGCs M1 exprimant ou non le transgène *Brn3b<sup>Z-dta</sup>*, utilisé pour détruire les cellules Brn3b+ avec la toxine diphtérique, Li et Schmidt ont décrit les différentes projections des ipRGCs M1 Brn3b+ et Brn3b- (Li and Schmidt, 2018). Les ipRGCs M1 Brn3b+ projettent ainsi sur le noyau olivaire prétectal, impliqué dans le réflexe pupillaire (contraction de la pupille en réponse à la lumière) (Klooster et al., 1995) ; le colliculus supérieur, impliqué dans la régulation non circadienne du sommeil et l'exécution des réflexes visuels (mouvement oculaires et de la tête) (Zhang et al., 2019); le noyau préoptique ventrolatéral, un petit cluster de neurones régulateurs du sommeil (Brown et al., 2012); l'hypothalamus antérieur impliqué dans la régulation du sommeil et de la température (Giustina et al., 2017) ; le noyau ventro-médian de l'hypothalamus, impliqué entre autre dans la régulation de l'appétit et la mémoire (Giustina et al., 2017) ; le noyau périhabéculaire du thalamus, qui projette vers des centres impliqués dans la régulation de l'humeur (Fernandez et al., 2018) ; les amygdales médianes, activées par le stress et qui font partie d'un centre de médiation de traitement et réponse au stress (Davern and Head, 2011); le noyau postérieur limitans, une zone de transition entre le pretectum et le thalamus (Márquez-Legorreta et al., 2016); et le noyau péri-supraoptique, une région dorsale au noyau supraoptique (Hattar et al., 2006). Les ipRGCs M1 Brn3b- projettent quant à eux principalement vers le SCN, organe central de la régulation des rythmes circadiens (Hattar et al., 2006). Les deux sous-classes de ipRGCs M1 ont peu de cibles en commun : ce sont les feuillets intergénéculés, qui intègrent et transmettent des signaux lumineux et non lumineux au SCN (Janik and Mrosovsky, 1994), et le noyau géniculé latéral, qui relaie les informations lumineuses au cortex visuel (Reid and Usrey, 2013).



Les ipRGCs de type M2 présentent des dendrites plus larges et ramifiées que les M1, et connectent les cellules bipolaires dans la sous-couche « ON » de la couche plexiforme interne. Leur réponse intrinsèque à la lumière est plus faible que les ipRGCs M1, et leur sensibilité repose en grande partie sur l'intégration de l'information lumineuse provenant des cônes et bâtonnets. Ils projettent sur le SCN (Baver et al., 2008), le noyau olivaire prétectal, le colliculus supérieur et le noyau géniculé latéral.

Les ipRGCs de type M3 ont la particularité d'être bistratifiés : s'ils présentent des dendrites à la fois dans les sous-couches « ON » et « OFF », ils reçoivent cependant principalement des signaux provenant de cellules bipolaires de type « ON » (Schmidt and Kofuji, 2011). Les projections de ces cellules ne sont pas décrites pour le moment.

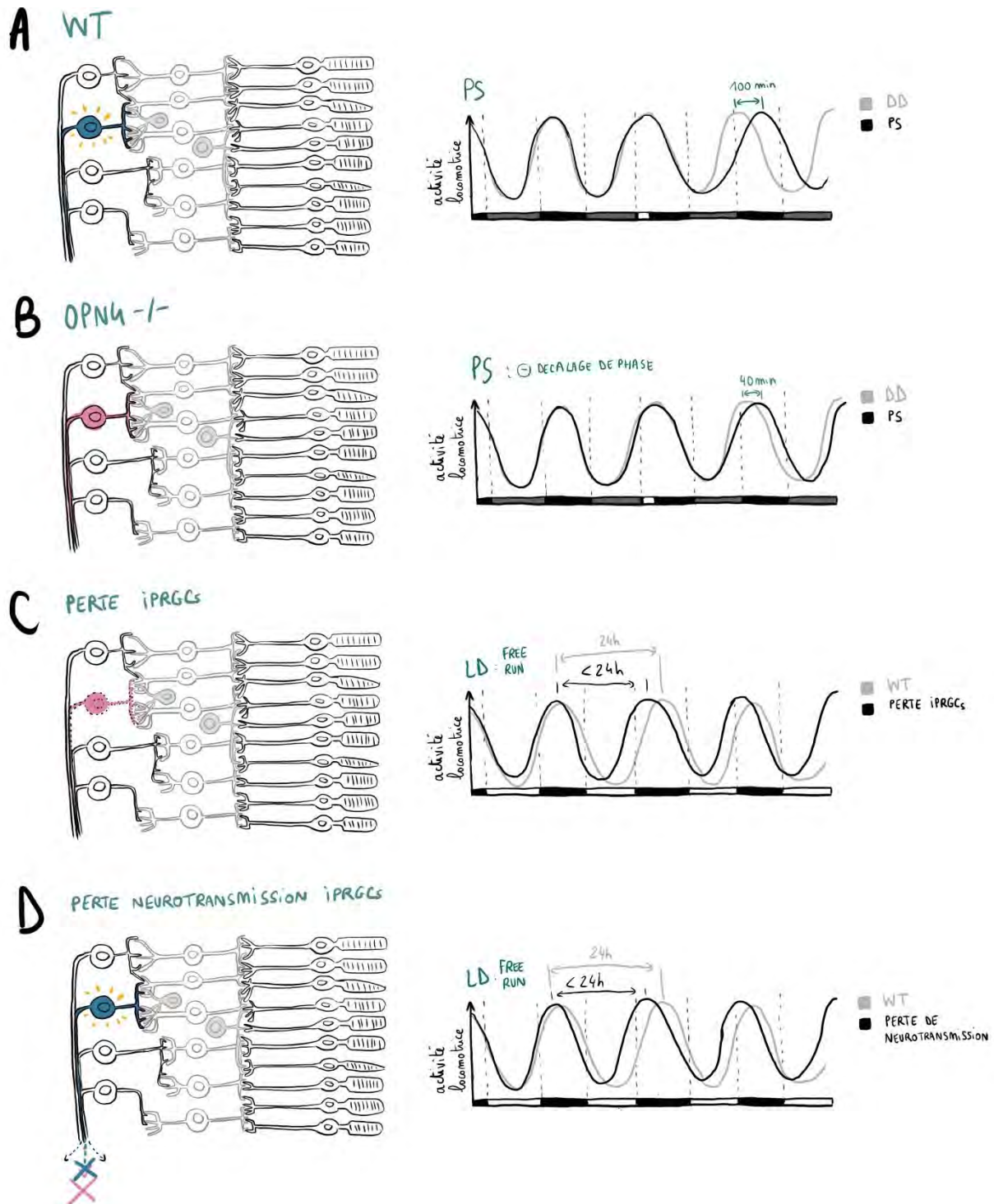
Les ipRGCs M4, au large corps cellulaire, connectent les cellules bipolaires dans la sous-couche « ON » et présentent l'arborisation la plus ramifiée des ipRGCs. Leur sensibilité lumineuse intrinsèque est encore plus faible que celle des ipRGCs M2. Ils projettent sur le colliculus supérieur et le noyau géniculé latéral.

Les ipRGCs de type M5 ont leurs dendrites dans la sous-couche « ON » et semblent avoir une faible réponse lumineuse intrinsèque. Leurs cibles sont le noyau olivaire prétectal, les feuillets intergénéculés, le noyau géniculé latéral, et le noyau prétectal postérieur impliqué dans le réflexe pupillaire (Rj and H, 1985).

Le dernier type d'ipRGC identifié est le type M6. Ces cellules reposent peu sur leur sensibilité intrinsèque pour détecter la lumière et semblent projeter sur les mêmes cibles que les ipRGCs de type M5. Comme les ipRGCs de type M2, elles sont bistratifiées, et reçoivent principalement des signaux provenant de cellules bipolaires de type « ON » (Quattrochi et al., 2019).

### 3. Mécanisme de photoentrainement

Chez les mammifères, les ipRGCs sont au cœur du mécanisme de photoentrainement de par leur propre photosensibilité mais aussi par l'intégration de l'information lumineuse leur provenant des cônes et des bâtonnets. En effet les souris mutantes pour la mélanopsine présentent un décalage de phase diminué dans les expériences de phase shift (Panda et al., 2002). Bien qu'il soit affecté, ce décalage de phase est toujours présent et il est nécessaire qu'à la fois la détection de la lumière dans les photorécepteurs classiques de la rétine, par mutation de gènes clefs de leur phototransduction, et des ipRGCs, par mutation du gène de mélanopsine, soit abolie (Hattar et al., 2003), ou que la neurotransmission des ipRGCs soit bloquée grâce la toxine botulique (Kofuji et al., 2016) pour que le photoentrainement soit



**Figure 10 : Les ipRGCs sont au cœur du photoentrainement de l'activité locomotrice via l'information lumineuse perçue de façon intrinsèque (mélanopsine) et celle provenant des photorécepteurs classiques de la rétine**

**A.** Situation wild-type : un pulse de lumière en début de nuit subjective induit un retard de phase de l'activité locomotrice. **B.** Les souris mutantes pour la mélanopsine (*opn4<sup>-/-</sup>*), dans lesquelles les ipRGCs ont perdus leur photosensibilité intrinsèque (en rose), présentent un retard de phase toujours présent mais diminué. **(C-D)** Il est nécessaire que les ipRGCs soient absents ou que la neurotransmission des ipRGCs soit bloquée pour n'observer aucun photoentrainement (dans ce cas, absence d'entraînement au cycle LD appelé free run).

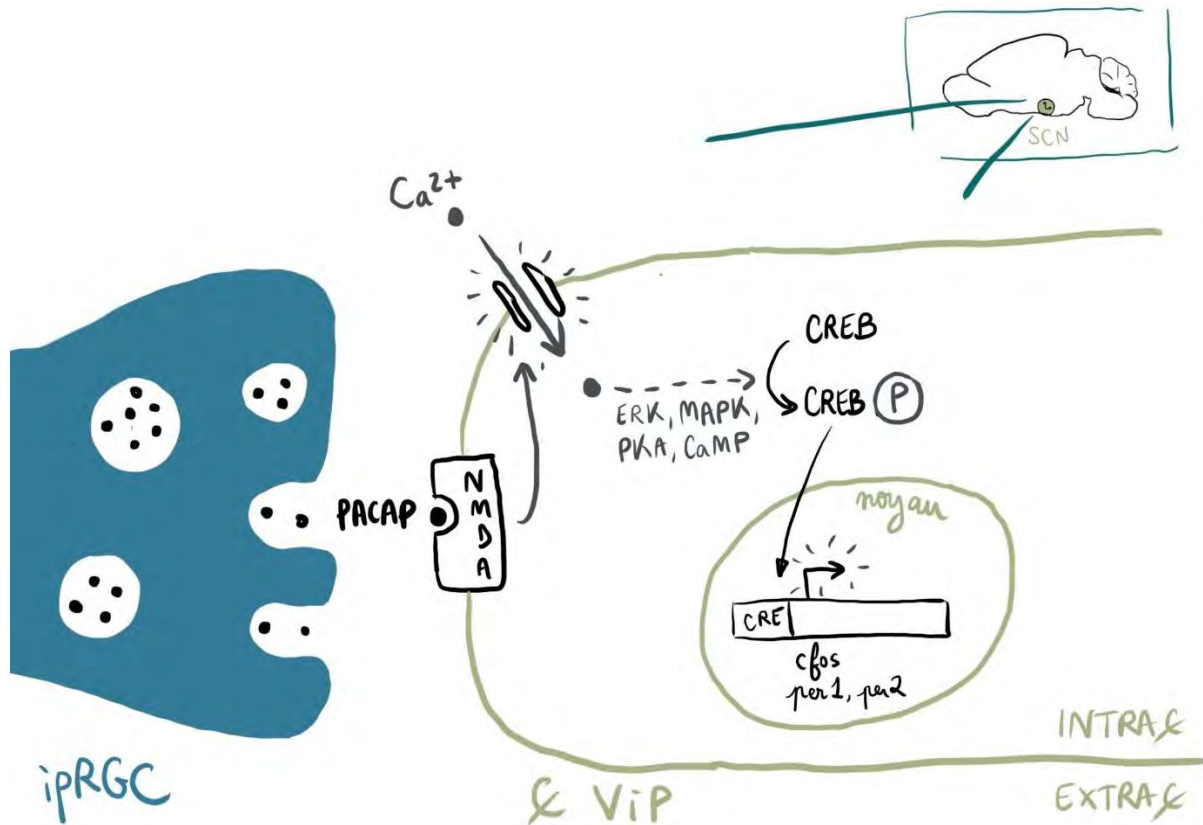
absent. Dans ces conditions, l'activité locomotrice est en « free-run » en LD (Fig 10). Les ipRGCs semblent également être au cœur du photoentrainement chez les humains, puisque la perte d'ipRGCs corrèle avec l'âge et Parkinson, conditions dans lesquelles une altération des rythmes circadiens est observée (Esquiva et al., 2017; Ortuño-Lizarán et al., 2018). De plus un variant de la mélanopsine, qui la rendrait moins sensible à la lumière, est associé au syndrome SAD (seasonal affective disorder), dans lequel les patients souffrent de dépression lors de l'automne et de l'hiver lorsque la luminosité est moindre (Roeklein et al., 2009, 2013).

#### a) Sous type d'ipRGCs impliqué dans le photoentrainement

Dans les modèles murins, lorsque tous les ipRGCs qui expriment *brn3b* sont ablatés de façon chimique (grâce à la combinaison des transgènes *opn4<sup>Cre/+</sup>; brn3b<sup>Z-dta/+</sup>*, où la toxine diphtérique est exprimée dans les cellules *opn4<sup>+</sup> /brn3b<sup>+</sup>*), la lumière est toujours capable d'induire un décalage de phase de l'activité locomotrice des souris portant les transgènes, et ce avec la même intensité que les souris contrôles (Chen et al., 2011). Les ipRGCs au cœur du photoentrainement semblent donc être les ipRGCs qui n'expriment pas *brn3b*. Ces ipRGCs représentent une population d'ipRGCs de type M1 et possiblement de type M2 (Berg et al., 2019), qui innervent le SCN et les feuillets intergénéculés.

#### b) Mécanisme de photoentrainement des ipRGCs au sein du SCN

Pour procéder au photoentrainement des rythmes circadiens, les ipRGCs transmettent l'information du signal lumineux au SCN via la libération de glutamate et de PACAP, qui vont activer les récepteurs NMDA (Methyl-D-Aspartate) présents à la surface des neurones VIP du SCN et induire un flux de calcium dans ces neurones (Fig 11). Cet influx de calcium va alors activer des voies de signalisation, comme celle des ERK (extracellular signal-regulated kinases), MAPK (Mitogen-activated protein kinases), PKA (protéine kinases A) ou CaMK (calcium/calmodulin dependent protein kinases), qui vont résulter en la phosphorylation de CREB (cAMP response element binding protein). CREB phosphorylé va ensuite pouvoir se fixer à l'élément CRE (calcium/cAMP response element) pour activer l'expression de gènes cibles, dont le gène de réponse immédiate *cfos* mais aussi des gènes de l'horloge moléculaire, comme *per1* et *per2*, aussi bien chez les mammifères diurnes que nocturnes (Challet, 2007; Liu and Panda, 2017). Lorsque la neurotransmission est spécifiquement bloquée dans les ipRGCs (grâce à l'expression de la toxine tétanique qui bloque la libération de neurotransmetteurs), l'activation des neurones du SCN par la lumière, observée par le marqueur *cfos*, est perdue (Kofuji et al., 2016). Certains ipRGCs libèrent également un neurotransmetteur inhibiteur, le GABA, qui permet d'abaisser la sensibilité du système circadien à la lumière, ce qui permet



**Figure 10 : Mécanisme de photoentrainement au sein du SCN**

Suite à leur activation par la lumière, les ipRGCs (en bleu) libèrent du PACAP (boules noires) qui activent les récepteurs NMDA à la surface des cellules VIP du SCN. Cette activation conduit à l'ouverture des canaux calciques. L'influx de calcium induit différentes voies de signalisations pour phosphoryler CREB. CREB phosphorylé va pouvoir pénétrer dans le noyau pour induire l'expression de différents gènes (comme *cfos*, *per1* et *per2*) via l'élément CRE.

probablement que l'horloge circadienne ne soit pas affectée par de trop faibles fluctuations de luminosité (Sonoda et al., 2020).

### c) Mécanisme moléculaire du photoentrainement : les gènes *per*

Chez les mammifères, les gènes *per* semblent être au cœur du mécanisme de photoentrainement. En effet, les souris mutantes pour *per1* ne présentent pas d'avance de phase de l'activité locomotrice suite à l'administration d'un pulse de lumière en fin de nuit à CT22, tandis que les souris mutantes pour *per2* ne présentent pas de retard de phase suite à l'administration d'un pulse de lumière en début de nuit à CT14 (Albrecht et al., 2001). Cela coïncide avec l'induction de l'expression de ces gènes dans la coquille du SCN : *per1* y est ainsi induit par un pulse de lumière administré à CT22 tandis que *per2* y est induit par un pulse de lumière administré à CT14 comme observé par hybridation *in situ* chez la souris. De façon intéressante, les gènes *per* sont très peu induits par la lumière pendant le jour subjectif et fortement exprimés pendant cette période, ce qui corrèle avec le moment où un pulse de lumière n'est pas capable d'induire un décalage de phase de l'activité locomotrice (Yan and Silver, 2002).

## D. Autres rôles des cellules exprimant la mélanopsine et de la mélanopsine chez les mammifères

En plus de leur rôle clef dans le processus de photoentrainement, les ipRGCs et la mélanopsine sont également impliqués dans d'autres processus, dont le masking et la phototaxie (Fig 12).

### 1. Masking

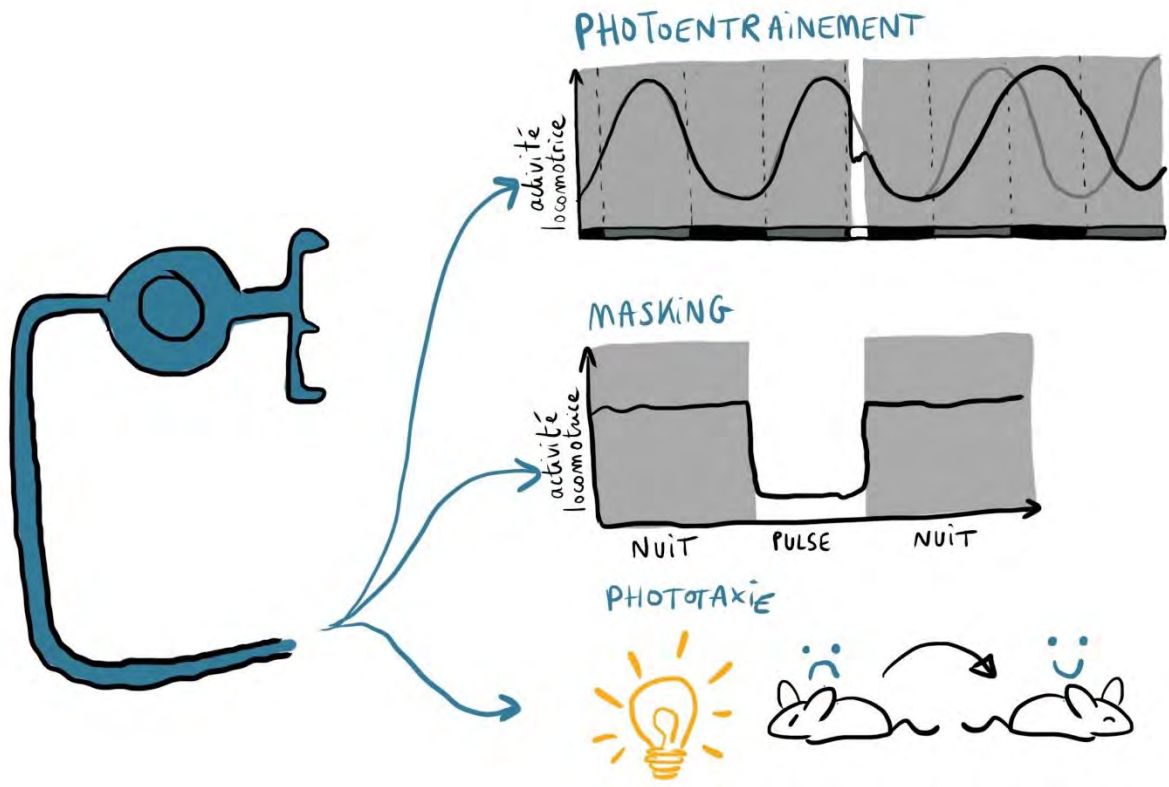
En condition LD, l'activité locomotrice est soumise à des effets indirects de la lumière, via son influence sur l'horloge circadienne, mais également à des effets de la lumière considérés comme directs. Ainsi une activité locomotrice rythmique en LD, c'est-à-dire plus élevée le jour que la nuit pour les espèces diurnes et inversement pour les espèces nocturnes, n'est pas forcément le reflet d'une horloge circadienne photoentrainée. Elle peut en effet être simplement la résultante des effets directs de la lumière, avec une élévation de l'activité locomotrice par une lumière pendant le jour pour les espèces diurnes et une diminution de l'activité locomotrice par cette même lumière pour les espèces nocturnes. On dit alors que la lumière masque de potentiels défauts de photoentrainement, et on appelle donc masking cet effet direct de la lumière sur l'activité locomotrice.

#### a) Mécanisme du masking

Le processus de masking et le circuit neuronal sous tendant n'est pas élucidé chez les mammifères. Ce processus semble cependant indépendant de l'horloge circadienne, puisqu'un pulse de lumière est capable d'induire une suppression de l'activité locomotrice de façon comparable entre des souris ayant une horloge circadienne non fonctionnelle et donc ayant une activité locomotrice arythmique en DD (souris double mutantes pour *cry1/cry2* ou *per1/per2*) et des souris contrôles (Mrosovsky, 2001; Pendergast and Yamazaki, 2011). Ce processus ne semble également pas dépendre du SCN : bien que des expériences de lésion de ce noyau conduisent parfois à une activité locomotrice arythmique en LD, beaucoup d'expériences du même type décrivent la persistance de la rythmicité de l'activité locomotrice en LD. Ainsi en cycle ultradien (courtes alternances de lumière et d'obscurité), les hamsters ayant subi une lésion complète du SCN ont toujours une activité locomotrice préférentiellement pendant la phase d'obscurité du cycle (94.8+/-2% de leur activité se trouve pendant la phase d'obscurité) et semblent donc avoir un masking préservé (Redlin and Mrosovsky, 1999). Cette variabilité entre expériences pourrait être due à des dommages collatéraux induits par la lésion du SCN, qui toucheraient d'autres structures du thalamus impliquées dans le masking ou les afférences provenant de la rétine.

#### b) Rôle des ipRGCs lors du masking

Différentes études soulignent le rôle essentiel des ipRGCs au cours du processus de masking, à la fois à travers leur photosensibilité intrinsèque et la transmission lumineuse des informations provenant des photorécepteurs classiques de la rétine. En effet les souris dont la phototransduction est à la fois affectée dans les photorécepteurs classiques de la rétine et mutantes pour *opn4* ont une activité locomotrice qui free runne en LD. En cycle ultradien leur activité locomotrice est distribuée de façon aléatoire entre les phases de lumière et d'obscurité, contrairement aux souris contrôles qui présentent une activité préférentiellement pendant la phase d'obscurité (Hattar et al., 2003). Les mêmes résultats sont obtenus avec des souris dont la transmission neuronale provenant des ipRGCs est spécifiquement bloquée (Kofuji et al., 2016). Les ipRGCs impliqués dans le masking de l'activité locomotrice semblent être les mêmes que ceux impliqués dans le photoentrainement de l'activité locomotrice, à savoir les ipRGCs *brn3b*<sup>-</sup> M1 et M2 puisque les souris dans lesquelles les ipRGCs *brn3b*<sup>+</sup> sont ablatés ont une activité similaire aux souris contrôles en conditions ultradiennes : elles ont une activité préférentiellement pendant la phase d'obscurité du cycle, avec des taux de préférence similaires entre souris sans ipRGCs *brn3b*<sup>+</sup> et les souris contrôles



**Figure 12 : Les ipRGCs et/ou la mélanopsine sont impliqués dans le photoentraînement, le masking et la phototaxie négative chez les mammifères**

Les ipRGCs sont impliqués dans le photoentraînement et le masking de l'activité locomotrice, et la mélanopsine dans la phototaxie négative chez les jeunes souris.

(Chen et al., 2011). La photosensibilité intrinsèque des ipRGCs est aussi impliquée dans le masking : bien qu'un premier article observe que le masking n'est pas affecté chez les souris mutantes pour *opn4* (Panda et al., 2002), plusieurs autres articles montrent que ce processus est présent mais diminué dans les souris mutantes (Mrosovsky and Hattar, 2003; Panda et al., 2003; Lupi et al., 2008).

## 2. Phototaxie

Un autre processus impliquant la mélanopsine est la phototaxie, c'est-à-dire le mouvement vers une source de lumière si elle est positive, ou le mouvement hors de la lumière si elle est négative. En effet dès 6 jours, les souris montrent une phototaxie négative en tournant le dos à une lumière, et cette phototaxie est abolie chez les souris mutantes pour la mélanopsine (Johnson et al., 2010). C'est à notre connaissance la seule étude qui s'intéresse au rôle de la mélanopsine dans ce processus, et les circuits neuronaux impliqués ne sont pas connus.





## IV. Les rythmes circadiens chez les vertébrés non mammifères (et non téléostéens)

Cette partie s'intéresse aux rythmes circadiens chez les vertébrés non mammifères (et non téléostéens, qui seront décrits plus tard). Peu de données sont disponibles sur ces espèces par rapport aux mammifères et aux téléostéens. La plupart des études portent sur des expériences d'ablations faites au XXème siècle pour décrypter l'organisation du système circadien chez ces espèces.

### A. Base génétique des rythmes circadiens des vertébrés non mammifères (et non téléostéens)

La base génétique de l'horloge circadienne est peu étudiée chez les vertébrés non mammifères et non téléostéens, et dans les espèces étudiées, les mêmes gènes que les mammifères ont été identifiés.

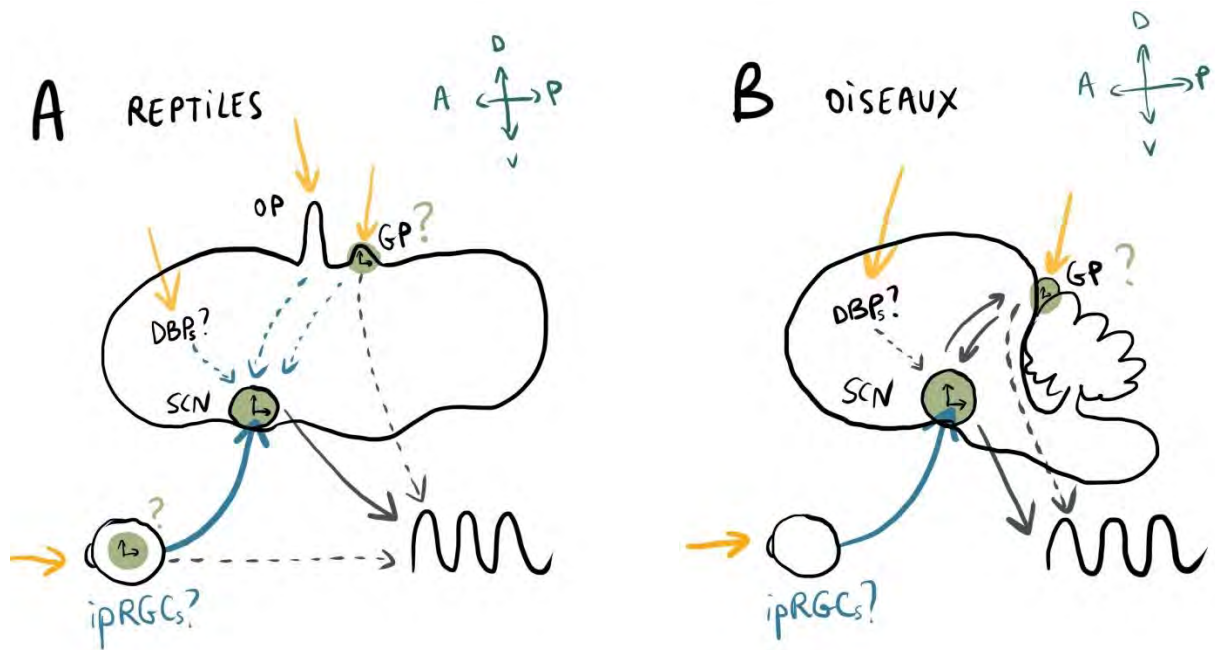
Ainsi le seul modèle reptile dans lequel l'horloge moléculaire a été étudiée est le lézard *P.sicula*, dans lequel l'expression de *clock*, *per2*, et *cry1a* a été identifié dans plusieurs tissus par RT-qPCR (cerveau, œil, poumon, cœur, muscle, foie et queue en régénération (Vallone et al., 2007a).

Chez les oiseaux, une seule étude a pour l'instant détecté une expression de *per1*, et ce dans la glande pinéale de poulet par PCR (Csernus et al., 2005), cependant il est communément admis que les mêmes acteurs que ceux des mammifères (*bmal1* et 2, *clock*, *per2* et 3, *cry1* et 2), sont exprimés chez les oiseaux à l'exception de *per1*. Ces différents acteurs ont par exemple été détectés dans la glande pinéale et la rétine de poulet ainsi que la glande pinéale, la rétine, et le tectum optique de la caille japonaise (voir Cassone, 2014 pour revue). L'expression de *clock* en LD et DD, bien que de faible amplitude, est rythmique au moins dans l'œil de la caille japonaise, un oiseau diurne (Yoshimura et al., 2000).

Aucune affectation de l'horloge moléculaire n'a été reportée chez ces espèces.

### B. Organisation du système circadien des vertébrés non mammifères (et non téléostéens)

Le système circadien des vertébrés non mammifères ne semble pas avoir une organisation aussi hiérarchique que les mammifères. Chez ces espèces, la rétine n'est pas la



**Figure 13 : Organisation du système circadien des reptiles et des oiseaux**

**(A-B)** Les points d'interrogation et les pointillés représentent les éléments incertains. **A.** Chez les reptiles, la glande pinéale (GP) et l'œil pariétal (OP) sont directement photosensibles. Ces structures, avec d'autres photorécepteurs dans le cerveau (DBPs pour « Deep Brain Photoreceptors ») et l'œil, pourraient photoentrainer le SCN. En plus du SCN, l'œil et la glande pinéale pourraient influencer directement les rythmes circadiens (génération de rythmes circadiens, influence sur la période). **B.** Chez les oiseaux l'interaction entre l'œil, le SCN et la glande pinéale (directement photosensible) est décrite comme nécessaire pour maintenir et coordonner les rythmes circadiens. Des photorécepteurs dans le cerveau (DBPs) pourraient contribuer au photoentrainement. La glande pinéale pourrait influencer directement les rythmes circadiens (génération de rythmes circadiens, influence sur la période).

seule structure capable de photodétection (il existe en effet d'autres structures photosensibles telles que la glande pinéale, l'œil pariétal ou d'autres structures cérébrales). Chez les vertébrés non mammifères, il existe des organes « accessoires » photosensibles, souvent qualifiés de « troisième œil ». Ils sont pour la plupart composé de deux types cellulaires : des photorécepteurs classiques et des neurones de projection, équivalents aux cellules ganglionnaires de la rétine. Ainsi dans ces organes, les photorécepteurs semblent directement être en contact avec les neurones de projection. Chez plusieurs espèces comme les oiseaux, lézards et amphibiens, la glande pinéale, organe provenant de l'évagination du diencephale et synthétisant la mélatonine (communément connue comme « hormone du sommeil ») est située au sommet de la tête et est directement photosensible. A partir du territoire pinéal se développent parfois d'autres structures, elles aussi photosensibles : l'œil frontal, une petite structure extra-crâniale située entre les yeux chez certains amphibiens, l'œil pariétal intra-crânial sur le dessus de la tête de certains lézards (Sapède and Cau, 2013)

Chez ces espèces, le système circadien serait articulé autour de plusieurs horloges principales et de plusieurs sources de détection de la lumière (Fig 13 et Table 4). Ce modèle est principalement basé sur le résultat d'expériences de lésion du SCN, de pinéalectomies (ablation de la glande pinéale), d'énucléations, et de pariétalectomies (ablation de l'œil pariétal), mais il existe de grandes variations selon les espèces étudiées. Ainsi même s'ils seront présentés par classe pour plus de facilité (reptiles, oiseaux), la généralisation des résultats obtenus dans une espèce à l'ensemble de la classe à laquelle elle appartient semble être inappropriée.

## 1. Organisation du système circadien chez les reptiles

Chez les reptiles, le SCN, la glande pinéale, la rétine et possiblement l'œil pariétal semblent jouer des rôles centraux dans le système circadien (voir Tosini et al., 2001 pour revue, Fig 13.A et Table 4). Ces structures possèdent toutes des photorécepteurs, à l'exception du SCN.

### a) SCN

Le SCN des lézards est semblable à celui des mammifères au niveau anatomique, et il reçoit également des afférences directes de la rétine. Une lésion du SCN des lézards diurnes *D.dorsalis* et *P.sicula* entraîne une arythmie de leur activité locomotrice en condition constante (en LL pour *D.Dorsalis*, et en DD pour *P.sicula*). Si l'injection quotidienne de mélatonine est capable d'entraîner l'activité locomotrice en DD de lézards *P.sicula* pinéalectomisés et contrôles, elle n'est pas capable d'entraîner ceux dont le SCN a été lésé.

Aucune autre lésion (pinéalectomie ou énucléation) ne provoque d'arythmie de l'activité locomotrice chez ces espèces. Le SCN semble donc tenir un rôle central dans le système circadien de *D.dorsalis* et *P.sicula* comme chez les mammifères.

#### b) Glande pinéale

La glande pinéale des lézards, lorsqu'elle est mise en culture sur plusieurs jours, présente une persistance de son rythme de sécrétion de mélatonine en LD. Chez certaines espèces ce rythme est maintenu lorsque la glande pinéale est en DD, indiquant qu'elle fonctionne comme une horloge circadienne autonome. La pinéalectomie entraîne des résultats variables selon les espèces, peut être en lien avec la présence ou non d'une horloge autonome dans la glande pinéale : elle peut n'avoir aucun effet sur les rythmes d'activité locomoteur (lézard diurne *D. Dorsalis* en DD), changer la période du rythme d'activité en conditions constantes (*S.occidentalis* en DD ou LL, *P.sicula* en DD, chez certains individus de *I.Iguana* en DD et de *S.olivaceus* en LL, tous des lézards diurnes). Enfin, la pinéalectomie entraîne une arythmie de l'activité locomotrice chez *A.carolinensis* en DD et LL de faible intensité, chez *Gallotia galloti* en DD et chez certains individus de *S.olivaceus* en LL.

#### c) Œil pariétal

Un autre organe de photodétection chez les lézards est l'œil pariétal. Celui-ci synthétise également la mélatonine, dont la sécrétion ou la synthèse pourrait aussi être contrôlée par une horloge circadienne endogène à l'œil pariétal. La pariétalectomie n'affecte pas le rythme de l'activité locomotrice chez *A.carolinensis* (en LD, DD, LL) ou *S.olivaceus* (en LL) et *P.sicula* (DD), et chez *I.Iguana* il entraîne un changement de la période de l'activité locomotrice dans certains individus placés en DD.

#### d) Oeil

L'énucléation entraîne des résultats variables selon les espèces de lézards : elle n'a aucun effet chez le lézard diurne *D.Dorsalis* (activité locomotrice rythmique en DD), l'activité locomotrice de certains individus des espèces *S.olivaceus* et *S.occidentalis* devient arythmique en LL ou garde une rythmicité mais avec une période plus courte que les individus non énucléés. Chez *P.sicula*, cette énucléation entraîne un raccourcissement de la période d'activité locomotrice en DD. L'énucléation associée à la pinéalectomie entraîne une arythmie de l'activité locomotrice chez 30% des *I.Iguana* testés. Chez neuf espèces de lézards appartenant à cinq familles taxonomiques différentes (Iguanidae, Gekkonidae, Eublepharidae, Xantusidae, and Lacertidae), l'activité locomotrice est toujours en phase avec l'illumination en cycles LD après énucléation. Chez *S.olivaceus* et *P.sicula*, après ablation simultanée de tous les

organes connus comme étant photosensibles (œil, pinéale, œil pariétal), l'activité locomotrice est toujours rythmique en LD en concordance avec le cycle d'illumination. Cependant si on empêche lumière d'atteindre le cerveau de lézards en recouvrant la tête de peinture noire ou en injectant de l'encre noire entre le crâne et la peau de lézards *S.olivaceus* énucléés et pinéalectomisés, leur activité locomotrice est en « free-run » en LD, ce qui suggère un défaut de photoentrainement et de masking. Selon les espèces, l'œil peut donc être considéré comme une des horloges principales du système circadien en plus d'être un des moyens de transmission des informations lumineuses aux horloges principales. Ce n'est cependant pas le seul moyen de transmission des informations lumineuses aux horloges circadiennes, puisqu'il semble également exister des photorécepteurs dans le cerveau, possiblement autres que la glande pinéale ou l'œil pariétal, capables d'entraîner l'activité locomotrice de certains lézards en LD.

## 2. Organisation du système circadien chez les oiseaux

Chez les oiseaux, le système circadien semble organisé autour de trois horloges principales : le SCN, la glande pinéale et la rétine. Leur interaction est décrite comme étant nécessaire pour maintenir une rythmicité et coordonner le reste des horloges, et il existerait avec une inhibition mutuelle entre le SCN et le couple photosensible rétine/glande pinéale (voir pour revue Cassone, 2014; Ebling and Piggins, 2020). Comme chez les reptiles, la lumière pourrait entraîner les horloges circadiennes via la rétine ou via des photorécepteurs présents dans le cerveau comme ceux de la glande pinéale (Fig 13.B et Table 5).

### a) SCN

Il existe deux noyaux homologues au SCN chez les oiseaux : le SCN médian et le SCN visuel, qui sont connectés entre eux via des voies nerveuses. Le SCN visuel est considéré comme ayant le rôle de relai de l'information lumineuse : le SCN visuel est le seul à recevoir des projections de la rétine et à activer *cfos* en réponse à la lumière chez la caille et l'étourneau. Il est également le seul à exprimer une rythmicité au niveau électrique et métabolique et à contenir des récepteurs à la mélatonine. Ainsi la mélatonine exogène inhibe l'activité métabolique du SCN visuel mais pas de celui du médian chez le moineau domestique. Le SCN médian est quant à lui considéré comme celui dans lequel se trouve l'horloge circadienne : après lésion de ce noyau, l'activité locomotrice reste rythmique en LD mais est arythmique en conditions constantes (chez le pigeon en LL de faible intensité : Yoshimura et al., 2001 ; chez le moineau de java en LL : Ebihara and Kawamura, 1981 ; chez le moineau domestique en DD : Takahashi and Menaker, 1982).

## b) Glande pinéale

La glande pinéale de poulet en culture ou des cellules de pinéale glande dissociée sécrètent toujours la mélatonine de façon rythmique en LD ou DD et sont toujours photoentrainables. Au moins chez cette espèce, la pinéale glande contient donc une horloge circadienne capable d'être directement photoentraînée. La pinéalectomie entraîne des résultats variables : chez le moineau domestique, l'activité locomotrice reste rythmique en LD, mais devient graduellement arythmique en DD après lésion, et la transplantation d'une glande pinéale restaure la rythmicité de l'activité locomotrice avec la période du donneur. Chez l'étourneau sansonnet, la lésion provoque également une perte de la rythmicité de l'activité locomotrice en DD et LL. Cependant elle n'a aucun effet sur cette rythmicité chez la caille japonaise aussi bien en LD qu'en DD. Il a été proposé que la variabilité des résultats de pinéalectomie soit en partie due au fait que la rétine sécrète de la mélatonine de façon rythmique chez certaines espèces, et que c'est la mélatonine et pas la glande pinéale en elle-même qui joue un rôle central dans le système circadien. Ainsi l'administration de mélatonine chez les moineaux domestiques et étourneaux sansonnet pinéalectomisés restaure la rythmicité de l'activité locomotrice.

## c) Oeil

L'énucléation chez le moineau domestique n'a pas d'effet sur le rythme de l'activité locomotrice en LD et DD. Certains moineaux non énucléés, lorsqu'ils sont placés en LD avec une lumière de faible intensité pendant la phase lumineuse, ont une activité locomotrice arythmique. Cependant si on leur enlève quelques plumes du crâne pour permettre à la lumière d'y pénétrer plus facilement, cela restaure leur rythmicité. Au contraire si on injecte de l'encre noire entre la peau et le crâne, l'activité locomotrice des moineaux est en « free-run » en LD. Comme chez les reptiles, il existe donc des photorécepteurs capables de photentraîner les rythmes circadiens autres que ceux de la rétine chez les oiseaux, possiblement ceux de la glande pinéale ou des photorécepteurs profonds dans le cerveau.

# C. Mécanisme de photoentrainement chez les vertébrés non mammifères (et non téléostéens)

## 1. Photoentrainement chez les reptiles

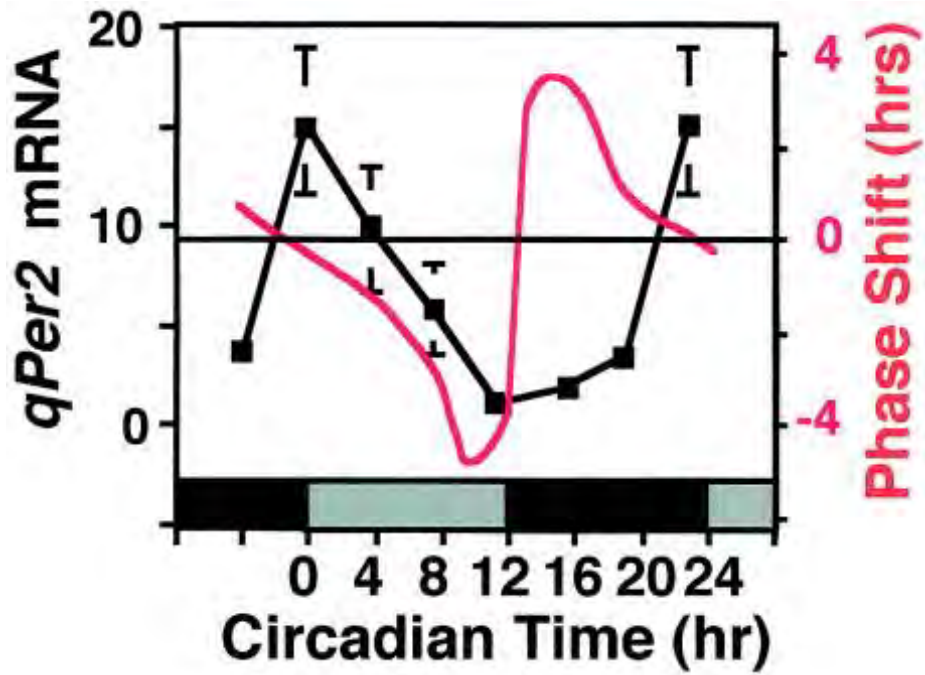
Chez les reptiles, l'œil semble impliqué mais pas essentiel dans le photoentrainement, puisqu'une lumière administrée pendant 6h est toujours capable d'induire un décalage de phase chez les lézards *S. Occidentalis* ayant subi une section nerf optique. Ce décalage de

phase se produit avec une amplitude plus grande que chez les lézards contrôles, et l'œil aurait donc un rôle inhibiteur dans le mécanisme de photoentrainement chez cette espèce (Underwood, 1985). De même chez cette espèce, après pinéalectomie, un pulse de lumière de 6h est aussi capable d'induire un décalage de phase (Underwood, 1983). L'œil est la glande pinéale ne semblent donc pas essentielles au processus de photoentrainement chez *S.Occidentalis*. Les autres expériences faites chez les reptiles pour identifier les structures impliquées dans le photoentrainement ont été faites en condition LD. Cependant dans ces conditions il est difficile de distinguer un rôle dans le photoentrainement d'un rôle dans le masking (effet direct de la lumière sur l'activité locomotrice). Les lézards *S.olivaceus* à la fois énuclés, pinéalectomisés et dont la lumière ne peut pas pénétrer dans le cerveau ont ainsi une activité locomotrice qui « free-run » en LD (Tosini et al., 2001). De même les lézards *P.sicula* à la fois pinéalectomisés, énuclés et qui ont reçu une injection d'un antisens dirigé contre l'opsine ps-RH2 exprimée dans l'hypothalamus antérieur ont une activité locomotrice qui « free-run » en LD pendant 6 à 7 jours après l'injection de l'antisens, alors que l'ablation de toutes les structures connues pour être photosensibles (œil, glande pinéale, œil pariétal) n'a pas d'effet sur le rythme de l'activité locomotrice en LD (Pasqualetti et al., 2003). Des photorécepteurs dans le cerveau seraient donc impliqués dans le photoentrainement chez *P.sicula*. Les auteurs de l'étude précisent cependant qu'il n'est pas exclu que l'antisens utilisé ne cible d'autres opsines que l'opsine ps-RH2, et que les possibles photorécepteurs identifiés dans l'hypothalamus antérieur ne soient donc pas les seuls à être impactés par l'injection. Le processus de photoentrainement semble mobiliser plusieurs structures capables de photodétection chez les reptiles, dont possiblement des photorécepteurs présents dans le cerveau (Fig 13.A et Table 4).

## 2. Photoentrainement chez les oiseaux

Chez les oiseaux, comme dans le cas des reptiles, plusieurs structures photosensibles dont des photorécepteurs dans le cerveau semblent participer au photoentrainement (Fig 13.B et Table 5) : ainsi les moineaux domestiques ayant subi à la fois une pinéalectomie et une énucléation ont une activité locomotrice rythmique en LD et cohérente avec le rythme d'illumination, ce qui reflète la présence d'un mécanisme de photoentrainement et/ou de masking. Cependant si on injecte dans ces mêmes oiseaux de l'encre noire entre la peau et le crâne, l'activité locomotrice est en « free-run » en LD de faible intensité (Cassone, 2014).





**Figure 14 : Le gène *per2* est un candidat comme médiateur du photoentrainement chez les oiseaux**

L'expression de *per2* dans l'œil de la caille japonaise en DD corrèle avec courbe de réponse de phase : lorsque *per2* est fortement exprimé et donc est très peu capable d'être induit par un pulse de lumière, (CT0), un décalage de phase de l'activité locomotrice n'est pas induit par un pulse de lumière. Au contraire quand *per2* est faiblement exprimé (CT12 par exemple), la lumière est capable d'induire l'expression de *per2* et d'induire également un fort décalage de l'activité locomotrice (Yoshimura *et al.*, 2000).

### 3. Mécanisme moléculaire du photoentrainement

Chez les reptiles aucune donnée n'est disponible sur le mécanisme moléculaire du photoentrainement.

Comme chez les mammifères, le gène *per2* est un candidat qui pourrait médier le photoentrainement chez les oiseaux. L'expression de *per2* est capable d'être induite par la lumière : ainsi dans l'œil et la glande pinéale de la caille japonaise, un pulse de lumière de 1h à CT10 ou CT16 augmente la quantité de *per2* observée par hybridation *in situ*. De façon intéressante, la capacité d'un pulse de lumière de 1h à induire un décalage de phase de l'activité locomotrice semble corrélér avec le taux d'expression de *per2* dans l'œil : lorsque *per2* est à son pic d'expression, un pulse de lumière n'est pas capable d'induire un décalage de phase, tandis que le décalage de phase le plus important est induit lorsque l'expression de *per2* est à son minimum (Simpson and Follett, 1982; Yoshimura et al., 2000) (Fig 14).

#### D. La mélanopsine et les cellules à mélanopsine chez les vertébrés non mammifères (et non téléostéens)

Au contraire des mammifères qui ne possèdent qu'un seul gène de mélanopsine, *opn4*, on trouve dans le génome des vertébrés non mammifères deux types de gènes de mélanopsine classés selon le degré de similarité en acides aminés de leur région centrale (comprenant les sept domaines transmembranaires et leurs boucles intra et extra-cellulaire), la phylogénie et leur localisation chromosomique et/ou synténie. Ceux présentant un degré plus élevé de similarité avec la mélanopsine des mammifères sont appelés *opn4m* ou *opn4* (« mammal-like ») et ceux plus proches de la première mélanopsine découverte chez le Xénope sont les *opn4x* (« *xenopus*-like »). Au cours de l'évolution, les mammifères semblent avoir perdu *opn4x* lors de réorganisations chromosomiques, peut-être en lien avec une réduction générale de leur photosensibilité (Bellingham et al., 2006).

#### 1. Expression des mélanopsines

La plupart des vertébrés non mammifères expriment un ou plusieurs gènes de types *opn4* et *opn4x*, à l'exception des serpents qui ne semblent pas exprimer de gènes *opn4* (Hauzman et al., 2019). De façon générale, les gènes de mélanopsine sont exprimés dans l'œil, et souvent dans plusieurs types cellulaires de la rétine. Par exemple chez le poulet (Northern blot et hybridation *in situ* : Chaurasia et al., 2005) et le serpent (hybridation *in situ* : Hauzman et al., 2019), on retrouve l'expression au niveau transcriptionnel d'au moins une des mélanopsines dans tous les types cellulaires de cette structure. L'expression des gènes de

mélanopsine n'est cependant pas restreinte à l'œil, et de nombreuses structures cérébrales dont certaines connues pour être photosensibles sont concernées : *opn4x* est détecté par hybridation *in situ* dans le SCN du xénope (Provencio et al., 1998), *opn4x* est détecté par RT-qPCR et protection à la RNase dans l'œil chez les lézards (Frigato et al., 2006) ; *opn4x* et *opn4m* par hybridation *in situ* chez le poulet (Chaurasia et al., 2005). Enfin une expression dans d'autres organes est parfois observée, comme une détection par hybridation *in situ* d'*opn4x* dans la peau du Xénope (Provencio et al., 1998) et d'*opn4m2* et *opn4x* dans celle du chimère éléphant (Davies et al., 2012) et d'*opn4x* par analyse transcriptomique par RNA-seq chez le serpent d'eau (Crowe-Riddell et al., 2019).

## 2. Caractérisation des cellules à mélanopsine

De rares études plus détaillées ont été faites sur la mélanopsine d'oiseaux, décrivant en détail leur pattern d'expression et leur capacité à conférer une photosensibilité.

Dans la rétine de poulet, OPN4x et OPN4m sont toutes les deux exprimées dans les cellules ganglionnaires, mais seule la protéine OPN4x est trouvée dans les cellules horizontales. Morera et collègues ont montré par des expériences d'imagerie calcique de cellules horizontales en culture que celles-ci sont intrinsèquement photosensibles (la lumière provoque une augmentation du taux de calcium intra-cellulaire dans les cellules qui expriment *opn4x* mais pas dans les cellules traitées avec un shRNA pour *opn4x*) et ce préférentiellement à une lumière bleue (Morera et al., 2016). Cette photosensibilité est ainsi dépendante de l'expression d'*opn4x* ; de plus, elle emploie un mode de phototransduction de type invertébré. Il semble donc y avoir une conservation de la capacité à la mélanopsine à conférer une photosensibilité et du type de phototransduction employé.

## E. Masking et phototaxie chez les vertébrés non mammifères (et non téléostéens)

### 1. Masking

Le masking est très peu étudié chez les vertébrés non mammifères, mais il est possible d'estimer le rôle de certaines structures dans ce processus en comparant les données disponibles en LD et en conditions constantes provenant d'animaux ayant subi diverses lésions (voir partie III.3.B pour références, Tables 4 et 5).

#### a) Masking chez les reptiles

Chez les reptiles, le SCN semble impliqué dans le processus de masking : les lézards diurnes *P.sicula* dont le SCN a été lésé ont une activité locomotrice arythmique en DD, témoignant de l'absence d'une horloge circadienne, ce qui permet en LD d'étudier uniquement le processus de masking. Dans ces lézards ayant subi une lésion, l'activité locomotrice est toujours arythmique en LD et n'est donc pas cohérente avec le rythme d'illumination, ce qui démontre une absence de masking en l'absence de SCN.

La glande pinéale ne semble pas nécessaire au processus de masking chez le lézard diurne *A.Carolinesis* : bien que l'activité locomotrice des lézards pinéalectomisés soit arythmique en DD, elle est toujours rythmique en LD.

Plusieurs structures photosensibles semblent être impliquées dans le masking : ainsi après l'ablation simultanée de l'œil, la glande pinéale, et de l'œil pariétal, les lézards diurnes *S.olivaceus* et *P.sicula* ont toujours une activité locomotrice rythmique en LD et en concordance avec le cycle d'illumination, donc un processus de masking et/ou de photoentrainement correct. Cependant après injection d'une encre noire entre le crâne et la peau de lézards *S.olivaceus* énucléés et pinéalectomisés, leur activité locomotrice est en « free-run » en LD, suggérant un défaut de photoentrainement et de masking.

#### b) Masking chez les oiseaux

L'œil en combinaison avec d'autres structures photosensibles du cerveau semblent avoir un rôle important dans le masking chez les oiseaux : en effet les cailles japonaises à la fois énucléées et ayant subi une pinéalectomie ont une activité locomotrice arythmique à la fois en DD et LD, tandis qu'une pinéalectomie seule n'a pas d'effet sur l'activité locomotrice en DD et LD et qu'une énucléation ne résulte en une activité locomotrice arythmique que dans deux tiers des cailles en DD ou LD. De plus chez le moineau domestique, l'énucléation n'a aucun effet sur l'activité locomotrice en LD ou DD. Cependant en LD de faible intensité, certains moineaux non énucléés ont une activité locomotrice arythmique en LD, témoin d'un masking et d'un photoentrainement affectés. La rythmicité de l'activité locomotrice de ces moineaux peut être restaurée si quelques plumes du crâne sont enlevées et ainsi permettre à la lumière de pénétrer plus facilement dans le cerveau, ce qui suggère un rôle de photorécepteurs présent dans le cerveau dans le masking et le photoentrainement, possiblement ceux de la glande pinéale.

Le SCN médian des oiseaux ne semble pas nécessaire au masking, puisque chez plusieurs oiseaux sa lésion n'a pas d'effet sur l'activité locomotrice en LD alors que l'activité locomotrice de ces mêmes oiseaux est arythmique en conditions constantes.

## 2. Phototaxie

La mélanopsine pourrait aussi être impliquée dans la phototaxie chez les reptiles, puisque certains serpents d'eaux, qui montrent une phototaxie négative lorsqu'on éclaire leur queue avec une lumière bleu/verte, expriment *opn4x* dans la peau de leur queue (Crowe-Riddell et al., 2019).

Espèce	SCN	PG	OP	O	PG+O	PG+O+OP
<i>D.Dorsalis</i>	LL : arythmie	DD : rythmique		DD : rythmique		
<i>P.Sicula</i>	LD : arythmie DD : arythmie (pas entrainable par mélatonine)	DD : changement de période (entrainable par mélatonine)	DD : rythmique	DD : période plus courte	LD + anti sens opsine ps-RH2 : free run	LD : rythmique
<i>S.occidentalis</i>		DD /LL : changement de période PS : phase shift présent		LL : arythmie ou période plus courte chez certains individus PS : phase shift présent mais plus important que les contrôles		
<i>I.Iguana</i>		DD : changement de période chez certains individus	DD : changement de période chez certains individus		LD : arythmie chez 30% des individus	
<i>S.olivaceous</i>		LL : changement de période chez certains individus, arythmie chez certains	LL : rythmique	LL : arythmie ou période plus courte chez certains individus	LD + encre noire : free run	LD : rythmique
<i>A.Carolinesis</i>		LD : rythmique DD, LL (faible intensité) : arythmie	LD, DD, LL : rythmique			
<i>Gallotia galloti</i>		DD : arythmie				

**Table 4 : Conséquences d'une lésion du SCN, de la glande pinéale (PG), de l'œil pariétal (OP), et/ou de l'énucléation (O) chez des reptiles**

Espèce	SCN	PG	O	PG+O
Pigeon	(SCN médian) : LD : rythmique LL faible intensité : arythmie			
Moineau de java	(médian) LD : rythmique LL : arythmie			
Moineau domestique	(médian) LD : rythmique DD : arythmie	LD : rythmique DD : arythmie graduelle (transplantation restaure avec la période du donneur, restauration par mélatonine)	LD, DD : rythmique LD (faible intensité) : free run chez certains (restauration si on enlève des plumes du crâne) LD + encre : free run	LD : rythmique LD (faible intensité) + encre : free run
Etourneau sansonnet		DD, LL : arythmie (restauration par administration de mélatonine)		
Caille japonaise		LD, DD : rythmique	LD, DD : arythmie dans 2/3 des individus	LD, DD : arythmie

**Table 5 : Conséquences d'une lésion du SCN, de la glande pinéale (PG), et/ou de l'énucléation (O) chez des oiseaux**

## V. Les rythmes circadiens chez les téléostéens, et plus particulièrement le poisson zèbre

Cette dernière partie porte sur les connaissances acquises sur les rythmes circadiens chez les téléostéens, en détaillant plus en profondeur ce qui est connu chez le poisson zèbre. Ce petit poisson rayé issu de l'Inde est un modèle émergent dans le domaine de la chronobiologie. Il présente en effet de nombreux avantages : c'est un modèle génétique puissant (génomme connu, existence de nombreuses lignées transgéniques et mutantes) qui offre de grandes capacités d'imagerie (transparence de l'embryon et de la jeune larve qui permettent de faire facilement des hybridations *in situ*, immunofluorescence, suivre l'activité neuronale par imagerie calcique ou l'expression de la luciférase) et d'étude comportementale (possibilité d'étudier le comportement de 96 larves en parallèle sans besoin de leur apporter de nourriture).

### A. Base génétique des rythmes circadiens des téléostéens

#### 1. Base génétique des rythmes circadiens : l'horloge moléculaire des téléostéens

Par rapport aux mammifères, la base génétique de l'horloge circadienne des poissons téléostéens comme le poisson zèbre est plus compliquée, car un événement de duplication du génome s'est produit au cours de leur évolution. De ce fait les poissons téléostéens possèdent des copies supplémentaires de chaque gène en comparaison avec ceux des mammifères et oiseaux, et selon les poissons certaines copies ont disparu ou ont été conservées, et il existe un répertoire varié de gènes de l'horloge moléculaire chez les téléostéens (Tolozza-Villalobos et al., 2015).

Le poisson zèbre possède ainsi trois copies de *bmal* (*bmal1a*, *1b* et *2*), trois copies de *clock* (*clock1a*, *1b* et *2*), quatre copies de *per* (*per1a*, *1b*, *2*, et *3*) et huit copies de *cry* (*cry1a*, *1b*, *2a*, *2b*, *3* et *4*, *5* et *dash*). Chez le poisson zèbre, l'expression des gènes *clock* semble être rythmique. Les différents CLOCK et BMAL peuvent interagir selon différentes combinaisons qui seront inhibées de façon différentes par les CRY. CRY1a, 1b, 2a et 2b sont ceux dont la séquence présente le plus d'homologie avec CRY1a des mammifères, et ils sont aussi capables d'inhiber l'activité de CLOCK/BMAL. CRY3 et CRY4a ne semblent pas inhiber CLOCK/BMAL, et de façon intéressante CRY4 présente plus de ressemblance au niveau de sa séquence avec la protéine CRY de drosophile, qui est chez cet insecte à la fois un acteur de la boucle principale



Gène	Mutation	Phénotype (activité locomotrice)	Références
<i>clock1a</i>	ENU (domaine PAS)	<b>DD</b> : ↓période	(Tan et al., 2008)
<i>per1b</i>	Insertion rétrovirus 1 <sup>er</sup> exon (↓ ARNm, pas de protéine)	<b>LD</b> : ↑activité, <b>DD</b> : ↑activité, ↓période	(Huang et al., 2015)
<i>per2</i>	Délétion de 11pb dans l'exon 2 (TALEN)	<b>LD</b> : ↓activité <b>DD</b> : ↑période	(Wang et al., 2015)

**Table 6 : Conséquence de mutations de gènes de l'horloge sur le rythme de l'activité locomotrice chez le poisson zèbre**

de l'horloge moléculaire et un photopigment répondant à la lumière bleue (voir Idda et al., 2012 pour revue).

## 2. Mutants de l'horloge moléculaire chez les téléostéens

Les seuls mutants étudiés chez les vertébrés non mammifères sont des mutants générés dans le modèle du poisson zèbre (Table 6). Le premier mutant a ainsi été généré en 2008 par mutation chimique à l'ENU et affecte le gène *clock1a*. Cette mutation touche au domaine PAS de la protéine, et conduit à une période du rythme de l'activité locomotrice des larves mutantes en DD plus courtes que celle des larves contrôles (comme le mutant murin), ainsi qu'une période plus courte du rythme de sécrétion de mélatonine de glandes pinéales provenant des poissons mutants adultes (Tan et al., 2008). Deux mutants des gènes *per* ont été générés en 2015 : un mutant *per1b*, produit par l'insertion d'une séquence rétrovirale dans le 1<sup>er</sup> exon et résultant en une forte baisse de la production d'ARNm de *per1b* et une absence de détection de PER1b (Huang et al., 2015), et un mutant *per2* par délétion de 11 paire de base dans l'exon 2 par la technologie TALEN, induisant un décalage de phase de lecture et probablement la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle (Wang et al., 2015). Ces deux mutants ont des phénotypes inverses : en LD les larves mutantes ont une activité locomotrice rythmique mais avec une hyperactivité dans le cas du mutant *per1b* et une hypoactivité pour le mutant *per2*. En DD, la période du rythme de l'activité locomotrice est réduite par rapport aux larves contrôles pour le mutant *per1b* alors qu'elle est augmentée dans le mutant *per2*. Concernant l'expression des autres gènes de l'horloge moléculaire, elle est toujours rythmique lorsqu'étudiée sur pool de larves entières par RT-qPCR dans les deux mutants, mais avec des niveaux d'expression variables : par exemple, les gènes *per1a*, *per2*, *per3* ont un taux d'expression beaucoup plus élevé chez les larves mutantes *per1b* que les contrôles en DD, et chez le mutant *per2* à la fois en LD et DD l'expression de *bmal1b* est très basse et l'expression de *cry1a* en DD augmentée par rapport aux contrôles. Pour le moment, aucun mutant conduisant à une activité locomotrice arythmique n'a été décrit chez le poisson zèbre. Au vu du nombre élevé de copies de gènes de l'horloge moléculaire chez cette espèce, il devrait exister de nombreuses redondances entre les éléments de l'horloge moléculaire et probablement un système encore plus robuste que ce qui existe chez les mammifères. Il faudrait donc procéder à des mutations simultanées d'un encore plus grand nombre de gènes que ce qui est nécessaire chez les mammifères pour arriver au même phénotype.

### 3. Influence de la lumière sur le développement de l'horloge chez le poisson zèbre :

L'un des avantages majeurs du modèle du poisson zèbre est qu'il permet d'étudier facilement l'effet d'éléments extérieurs sur le développement de l'horloge circadienne et l'apparition de rythmes circadiens. En effet il présente un développement rapide et complètement externe, puisque l'œuf est fécondé en dehors de la mère. De plus il est aisé de connaître et contrôler le temps initial de développement et ainsi limiter l'effet du moment de la fécondation ou de la « naissance » sur l'horloge et les rythmes circadiens. Les femelles pondent ainsi généralement au début de la journée peu après la transition nuit/jour et les œufs sont immédiatement fécondés par le mâle. Ainsi l'embryon n'est sous l'influence que de facteurs maternels de type génétique et il est très facile de contrôler les facteurs environnementaux auxquels sont soumis les embryons lors de leur développement.

#### a) La lumière, une nécessité pour le développement de rythmes circadiens

Chez le poisson zèbre, le développement de l'horloge circadienne semble essentiellement nécessiter la présence de facteurs environnementaux (voir Vallone et al., 2007b pour revue). Une seule étude suggère que le développement de l'horloge moléculaire dépende de facteurs maternels, mais elle n'a pas été reproduite. Dans cette étude, les embryons ont été élevés depuis la ponte en condition LD, DD ou LL, puis une hybridation *in situ* a été faite pour évaluer l'expression de *per3* toutes les 8 heures à partir de 24hpf (pour « hours post fertilization » c'est à dire heures après fécondation) jusqu'à 120hpf sur l'embryon entier (Delaunay et al., 2000). Dans les trois conditions, l'expression de *per3* est rythmique avec une période d'environ 24 heures, et le développement de l'horloge circadienne ne semble donc pas être dépendant de facteurs environnementaux. Cependant plusieurs études montrent que l'horloge circadienne et de nombreux rythmes circadiens ne semblent pas se développer en conditions constantes de température et de lumière. Ainsi Kaneo et Cahill montrent qu'un rythme circadien de bioluminescence du rapporteur *per3:luciferase* (expression de la luciférase contrôlée par le promoteur du gène *per3*), mesuré *in vivo* à partir d'embryons ou de larves uniques peut être observé à partir du 6<sup>ème</sup> ou 7<sup>ème</sup> jour de développement en DD lorsque les poissons ont au préalable été exposés à au moins 5 cycles LD. Si les poissons sont par contre placés en DD dès 14hpf, soit après un seul cycle LD, aucun rythme circadien de bioluminescence n'est observé (Kaneko and Cahill, 2005). L'expression de *per1a*, *cry1a* et *per2*, mesuré par protection à la RNase du 1<sup>er</sup> au 4<sup>ème</sup> jour de

développement, n'est également pas rythmique dans les pools d'embryons élevés en DD (Dekens and Whitmore, 2008). De même la synthèse de mélatonine, mesurée à partir de pools d'embryons de 19hpf à 103hpf, n'est pas rythmique lorsque les embryons sont élevés en DD à partir de 14hpf (Kazimi and Cahill, 1999), et aucun rythme de l'expression d'*aanat2* dans la glande pinéale n'est observé par hybridation *in situ* entre 18hpf et 72hpf dans les embryons élevés en DD ou LL (Vuilleumier et al., 2006). De la même manière seules 22% des larves élevées en DD dès 14hpf présentent une activité locomotrice rythmique observée à partir du 5<sup>ème</sup> jour de développement, mais cette activité semble entraînée par la manipulation des larves par l'expérimentateur et non pas par la lumière, car elle est en phase avec le moment où l'expérimentateur a manipulé les larves (Hurd and Cahill, 2002).

#### b) Une transition lumineuse au bon moment

Le moment d'exposition à la lumière ou le stade de développement où est administré une transition lumineuse, plutôt que le temps total d'exposition à la lumière ou de cycles LD semble être important pour le développement de l'horloge circadienne. Ainsi un rythme circadien de bioluminescence du rapporteur *per3:luciferase* ne peut être observé lorsque les embryons sont exposés à au moins 5 cycles LD ou 1 cycle LD au 5<sup>ème</sup> jour de développement (Kaneko and Cahill, 2005). Concernant le rythme de l'activité, 52% des larves présentent une activité locomotrice rythmique après avoir été élevées en deux cycles consécutifs pendant le 1<sup>er</sup> jour de développement et le 2<sup>ème</sup> jour de développement, alors que ce taux monte à 92% lorsque les larves ont été élevées avec deux cycles LD aux 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> jours de développement (Hurd and Cahill, 2002). L'horloge ou les horloges circadiennes contrôlant le rythme de l'activité locomotrice semblent donc nécessiter un cycle LD ou une transition lumineuse au 3<sup>ème</sup> jour de développement pour leur développement. L'horloge moléculaire régulant la sécrétion de mélatonine semble quant à elle se développer plus tôt, entre 20hpf et 26hpf. En effet aucun rythme de mélatonine n'est observé à partir des pools d'embryons transférés en DD à 14hpf ou 20hpf tandis que l'expression de la mélatonine est rythmique dans ceux transférés en DD à partir de 26hpf (Kazimi and Cahill, 1999). Cela coïncide avec le développement de la glande pinéale, dans laquelle les photorécepteurs et neurones de projection se différencient plus tôt que ceux présent dans la rétine. On peut par exemple observer l'expression d'opsines, comme la mélanopsine, dès 22hpf dans la glande pinéale tandis qu'il faut attendre 3dpf pour observer cette expression dans la rétine, et les projections se forment à partir de 19-20hpf dans la glande pinéale contre 60hpf pour la rétine. Ce serait donc probablement la glande pinéale ou une autre structure photosensible du cerveau et non

la rétine qui semble être à l'origine du rythme de mélatonine observé dans cette étude. De même le rythme d'expression d'*aanat2* suivi par hybridation *in situ* n'est observé que lorsque les embryons sont soumis à une transition lumineuse (L vers D ou D vers L) à 21hpf ou 24hpf mais pas à 15hpf ou 18hpf (Vuilleumier et al., 2006). Une autre publication suggère que l'horloge de la glande pinéale se développe encore plus tôt, puisqu'un pulse de lumière entre 0 et 6hpf (fin de blastula) est capable de générer des rythmes d'*aanat2*, observés par hybridation *in situ* dans la glande pinéale entre 48hpf et 78hpf (Ziv and Gothilf, 2006). Une transition lumineuse est donc nécessaire pour l'établissement d'une horloge moléculaire et de rythmes circadiens, dont le moment d'administration critique au cours du développement diffère selon le rythme (activité locomotrice, synthèse de mélatonine, horloge moléculaire), peut-être en lien avec l'existence d'horloges principales et périphériques ou la nécessité du rythme étudié à solliciter la coordination de plusieurs horloges.

### c) Mécanisme moléculaire du développement de l'horloge moléculaire

L'induction des gènes *per* et *cry* par la lumière semblent être impliquée dans le développement de l'horloge moléculaire. Dans les embryons élevés en DD, *per1* est en effet exprimé de façon constitutive à partir de 29hpf et *cry1a* est faiblement exprimé. La transcription de *cry1a*, observée par protection à la RNase sur pool d'embryons, est ainsi augmentée à la fin du 1<sup>er</sup> jour de développement, de façon dépendante de la lumière. Dekens et Whitmore proposent que cette augmentation de CRY1A permettrait de bloquer l'activité de CLOCK et BMAL, exprimés de façon constitutive au début du développement, pour inhiber la transcription de *per1a* et permettre de démarrer l'horloge moléculaire (Dekens and Whitmore, 2008). La transcription du gène *per2* semble être activée par la lumière très tôt au cours du développement, dès 5hpf, et l'utilisation d'un morpholino qui bloque la traduction ou le splicing de l'ARN *per2* empêche l'observation d'un rythme de la transcription d'*aanat2* dans la glande pinéale suite à un pulse de lumière entre 0 et 6hpf (Ziv and Gothilf, 2006). De plus les larves triple KO pour *per2*, *cry1a* et *cry2* présentent un établissement du rythme de l'activité locomotrice suite à un pulse de lumière réduit : en effet un pulse de lumière de 12h au début du 7<sup>ème</sup> jour de développement permet l'établissement du rythme de l'activité locomotrice les jours suivant dans seulement 30% des larves mutantes contre 91% des larves contrôles (Hirayama et al., 2019).

#### d) Le développement de l'horloge moléculaire : démarrage ou synchronisation ?

Si une transition lumineuse est nécessaire pour observer des rythmes moléculaires ou physiologiques au niveau d'un organe ou de l'individu, une question qui reste en suspens est de savoir si cette transition est nécessaire pour que l'horloge moléculaire démarre dans chaque cellule, ou bien pour que les horloges moléculaires présentes dans chaque cellule se synchronisent entre elles et ainsi permettre l'émergence de rythmes au niveau de l'organe ou de l'individu. Dekens et Whitmore suggèrent que les horloges moléculaires des embryons élevés en DD oscillent de façon asynchrones : par hybridation *in situ*, ils observent en effet un nombre intermédiaire de cellule exprimant *per1a* dans les embryons fixés le jour et la nuit (Dekens and Whitmore, 2008). Cependant une récente étude utilisant un rapporteur fluorescent de l'horloge moléculaire, comprenant le promoteur de *rev-erba* en amont du gène codant pour une protéine fluorescente déstabilisée, suggère qu'*in vivo* au niveau cellulaire dans les embryons élevés en DD, les horloges moléculaires n'oscillent pas ou alors avec une amplitude très faible, mais ne seraient pas désynchronisées entre elles (Wang et al., 2020).

#### 4. Une influence de la lumière sur le développement de l'horloge conservée chez les vertébrés ?

Chez les mammifères, l'influence des conditions extérieures sur le développement de rythmes circadiens est difficile à étudier. En effet l'embryon se développe *in utero* et est donc constamment sous l'influence de facteurs maternels, qu'ils soient de nature hormonale (par exemple la mélatonine, qui est capable d'être transférée de la mère à l'embryon comme montré chez des primates (Reppert et al., 1979) ou physiologiques et comportementaux (le rythme de la température corporelle ou de l'activité locomotrice de la mère pourraient par exemple entrainer l'horloge circadienne des embryons *in utero*). Il est donc difficile de dissocier l'influence de facteurs maternels et environnementaux sur le développement de l'embryon, et encore plus de distinguer des effets environnementaux qui s'exerceraient de manière directe sur l'embryon de ceux qui seraient médiés via la mère de façon indirecte.

##### a) Photodétection *in utero* chez les mammifères

Plusieurs évidences suggèrent que les embryons de mammifères pourraient être capables de photodétection *in utero* : l'expression de différentes opsines, dont la mélanopsine, peut être détectée par RT-qPCR avant la naissance dans les yeux d'embryons de souris et d'humains (dès E10.5 chez la souris et dès 8,6 semaines de gestation chez l'humain) (Tarttelin et al., 2003), et le SCN de babouins prématurés est capable d'activer l'expression

de *cfos* et *per1* suite à un pulse de lumière dès 125 jours après la conception, soit l'équivalent de 24 semaines de gestation chez l'humain (Hao and Rivkees, 1999). Le circuit médiateur des effets non visuels de la lumière semble être mis en place assez tôt dans le développement, et les ipRGCs sont intrinsèquement photosensibles et innervent déjà le SCN au moins dès la naissance chez les souris. Un long pulse de lumière (de 90 minutes) est également capable d'induire l'expression de *cfos* dans le SCN à ce moment-là (Sekaran et al., 2005). De plus la quantité de lumière capable d'atteindre l'embryon, semble être suffisante pour entraîner les rythmes circadiens, comme mesuré dans la cavité de l'utérus de rats albinos et de cochons d'inde (Jacques et al., 1987). Bien que le développement embryonnaire se déroule *in utero*, l'horloge circadienne de l'embryon pourrait donc être influencée de manière directe par la lumière, possiblement via les mêmes circuits que chez l'adulte.

#### b) Une influence maternelle chez les mammifères

En 1983, Reppert et Schwartz ont montré que les rythmes circadiens des embryons, et donc leur horloge circadienne, se coordonnent avec ceux de la mère plutôt qu'avec les rythmes d'illumination chez le rat. Dans cette expérience, les auteurs ont mesuré l'utilisation de glucose par le SCN à l'aide de déoxyglucose marqué au carbone 14. Cette utilisation reflète l'activité du SCN, qui est plus actif le jour que la nuit. Les rates gestantes sont ainsi soit gardées en LD, soit soumises à un changement de phase progressif du cycle d'illumination pour atteindre un cycle inversé DL au 6<sup>ème</sup> jour de gestation. Puis à partir du 19<sup>ème</sup> jour de gestation, elles sont placées en DD pour être sacrifiées et mesurer la présence de carbone 14 lors de la nuit subjective (période « Dark » du LD) du 20<sup>ème</sup> jour de gestation ou du jour subjectif (période « Light » du LD) du 21<sup>ème</sup> jour de gestation. Dans les deux cas, c'est-à-dire que les individus soient soumis au cycle LD ou au cycle DL, le SCN des rates et de leurs embryons sont en phase entre eux et avec le cycle d'illumination, avec une utilisation du glucose plus importante le jour subjectif (période « Light » du LD ou DL) que la nuit subjective (période « Dark » du LD ou DL). Cependant si on procède à la même expérience en faisant subir une énucléation aux rates gestantes dès le premier jour de gestation, le rythme d'activité du SCN des rates mises en DL n'est plus en phase avec le rythme d'illumination : il reste en phase avec l'ancien rythme LD. Dans ce cas, le rythme d'activité du SCN des embryons se développe en phase avec celui de leur mère (c'est-à-dire utilisation du glucose plus importante pendant la période « Dark » du DL) et non celui du rythme d'illumination (qui aurait été une utilisation plus importante du glucose pendant la période « Light » du DL) (Reppert and Schwartz, 1983). Si les facteurs environnementaux pourraient être capables d'agir sur le développement de

l'horloge circadienne, les facteurs maternels semblent avoir une influence plus importante sur l'horloge embryonnaire.

c) Rythmes circadiens en absence d'influence maternelle chez les mammifères

Les rythmes circadiens maternels ou la présence d'une horloge circadienne maternelle semblent importants pour synchroniser l'horloge circadienne des embryons avec les facteurs environnementaux, mais ils ne semblent cependant pas indispensables pour la mise en place de l'horloge. Ainsi les souris issues d'une mère dont le SCN a été lésé et élevées en DD depuis leur naissance présentent un rythme circadien de la prise de boisson, mais ces rythmes ne sont pas synchronisés entre les souris d'une même portée (Reppert and Schwartz, 1986). Cela suggère que l'horloge circadienne des embryons peut se développer indépendamment de la présence d'une horloge maternelle. Cependant la lésion du SCN maternel n'a été faite qu'au 7<sup>ème</sup> jour de gestation dans cette expérience, et pour confirmer ce résultat, il faudrait procéder à une lésion avant ou dès le 1<sup>er</sup> jour de gestation. L'absence de synchronisation des rythmes au sein d'une même portée suggère que le cycle LD auquel les embryons ont été soumis pendant la gestation n'est pas capable de photoentrainer l'horloge circadienne *in utero*, et donc ne serait possiblement pas à l'origine du développement de l'horloge circadienne. Une autre expérience vient compléter l'expérience de Reppert et Schwartz. En effet les souris issues du croisement d'un père sauvage et d'une mère arythmique (double mutante pour *per1* et *per2* ou pour *per2* et *cry1*), élevées par leur mère arythmique et n'ayant jamais été soumis à un rythme d'illumination (car mises en DD dès la conception) présentent une activité locomotrice rythmique (Jud and Albrecht, 2016). Cette activité n'est cependant pas synchronisée entre les différentes souris d'une même portée. Dans cette expérience, l'horloge circadienne des embryons de souris semble être capable de se développer de façon autonome en l'absence de facteurs environnementaux et de la présence d'une horloge circadienne maternelle.

d) Photodetection dans l'œuf chez les reptiles

Aucune donnée n'existe sur l'effet des conditions d'illumination sur le développement de l'horloge circadienne des reptiles, probablement du fait que la plupart des espèces pondent et enfouissent leurs œufs sous terre et ne seraient donc pas soumis à l'influence de la lumière pendant leur développement. Cependant certains lézards pondent à l'air libre (feuilles mortes, crevasses, trous dans les arbres), et il a été montré que les lézards *P.chinensis*, *T.septentrionalis*, *H.bowringii* et *G.japonicus* élevés en conditions d'illumination constante



avaient un développement embryonnaire, évalué par la période d'incubation, plus rapide que ceux élevés en conditions de noir constant (Zhang et al., 2016c). La lumière est ainsi capable d'influencer le développement embryonnaire à travers la coquille et il n'est donc pas exclu qu'elle puisse agir sur le développement de l'horloge circadienne chez les reptiles.

#### e) Lumière et développement de l'horloge circadienne chez les oiseaux

Chez les oiseaux, l'influence de la lumière sur le développement de l'horloge moléculaire n'est également pas connue. Chez le poulet, l'activité de l'enzyme AANAT provenant de glandes pinéales d'embryons récoltées toutes les 2h sur une période de 24h est rythmique en DD seulement lorsque les embryons étaient précédemment incubés en conditions LD pendant 18 jours (environ deux jours avant éclosion), mais pas en conditions DD ou LL (Zeman and Illnerova, 1990). Un rythme d'illumination semble donc nécessaire pour la mise en place de rythmes circadiens. Cependant l'activité de l'enzyme ayant été mesurée à partir d'un groupe de plusieurs glandes pinéales, on ne peut pas déduire si la lumière est nécessaire pour le développement du rythme circadien de l'activité de NAT dans chaque glande pinéale, ou si elle est nécessaire pour que les rythmes de l'activité de l'enzyme soient synchronisés entre les différentes glandes pinéales. Une autre étude montre que lorsqu'on élève des poulets en LL depuis la ponte pendant 12 semaines puis qu'on prélève et place leur glande pinéale en culture toujours en LL, elle sécrète de la mélatonine de façon rythmique (Csernus et al., 1998). Cela suggère donc qu'un rythme d'illumination n'est pas nécessaire pour le développement de l'horloge circadienne de la glande pinéale de poulet, et qu'un autre facteur que la lumière pourrait être nécessaire. Ce facteur pourrait par exemple être un facteur d'origine maternel ou un autre facteur environnemental (autre que la température ou la nourriture, puisque dans cette étude la température était maintenue constante et la nourriture distribuée à différents moments de la journée). Mais il est également possible que les conditions de mise en culture des glandes pinéales aient eu un effet d'entraînement, par exemple du fait de manipulations physiques. De plus en LL les glandes pinéales étaient exposées à une lumière naturelle avec une intensité lumineuse pouvant aller jusqu'à 4800 lux pendant la journée, tandis qu'elles étaient soumises à une lumière artificielle de 1200 lux pendant la nuit. Le fait que les glandes pinéales en culture aient été soumises à différentes sources de lumière entre la journée et la nuit pourrait également être un facteur d'entraînement.

## B. Organisation du système circadien des téléostéens

Chez les poissons, l'organisation du système circadien est moins bien comprise, et c'est souvent la glande pinéale qui est considérée comme horloge principale (Fig 15.A, Table 7).

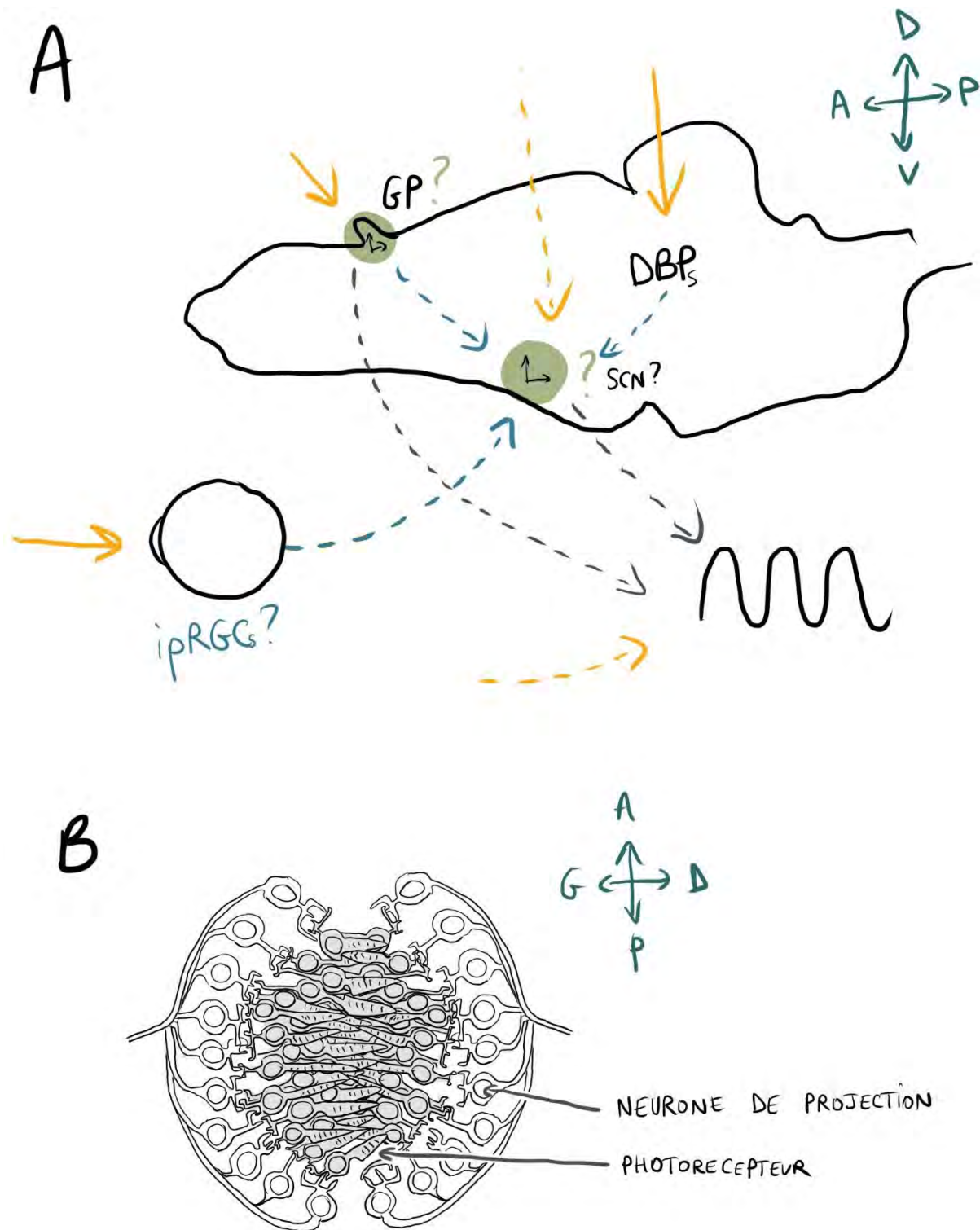
### a) SCN

Chez la plupart des poissons étudiés, une structure homologue au SCN n'a pas été décrite. Chez le poisson zèbre, une structure située au-dessus du chiasma optique exprimant plusieurs marqueuses typiques du SCN des mammifères a été décrite dans le cerveau ventral (Chen et al., 2017). Dans les embryons de poisson zèbre mutant pour *cyclops*, qui ne possèdent pas de cerveau ventral, on peut observer par hybridation *in situ* que la glande pinéale continue à exprimer *aanat2* (une des enzymes de la voie de synthèse de la mélatonine) de façon rythmique en conditions LD, DD et LL (Noche et al., 2011). Le SCN n'est donc pas considéré comme un élément essentiel du système circadien chez le poisson zèbre.

### b) Glande pinéale

#### (1) Description de la glande pinéale

La glande pinéale des poissons présente de grandes similarités avec la rétine (Fig 15.B) : ainsi la glande pinéale du poisson zèbre, comme la plupart des autres téléostéens est composée de photorécepteurs en son centre (qui sécrètent la mélatonine), de neurones de projection en sa périphérie (équivalents des cellules ganglionnaires de la rétine), et d'une population de cellules AgRP2+ (cellules semblables aux cellules de l'épithélium pigmentaire en contact avec les photorécepteurs de la rétine et impliquées par exemple dans le renouvellement des opsines ; elles ont également une fonction sécrétrice, possiblement de messagers chimiques dans le système vasculaire et/ou le liquide cébrospinal) (Shainer et al., 2017, 2019). Les photorécepteurs classiques de la glande pinéale ont une morphologie semblable aux cônes de la rétine et hyperpolarisent en réponse à la lumière chez les lamproies larvaires et adultes (Tamotsu and Morita, 1986), la truite (Meissl and Ekström, 1988) et le poisson rouge (Meissl et al., 1986). Chez le poisson zèbre, ils représentent une population hétérogène qui expriment des opsines différentes : la parietopsine (sensible à la lumière verte), la red cone opsine (sensible à la lumière rouge), l'exorhodopsine (prédite comme étant sensible à la lumière verte) et la parapinopsine1 (sensible aux UV). Ils semblent être en contact direct avec les neurones de projection, qui semblent être majoritairement de type OFF (hyperpolarisation en réponse à la lumière), au moins chez le poisson rouge (Meissl et al., 1986) et la lamproie (Uchida et al., 1992). La glande pinéale, lorsqu'elle est mise en culture en LD ou DD, continue à sécréter de la mélatonine de façon rythmique chez le poisson zèbre



**Figure 14 : Organisation du système circadien des poissons téléostéens**

**A.** Les points d'interrogation et les pointillés représentent les éléments incertains. Peu de choses sont connues sur l'organisation du système circadien chez les poissons. La plupart des tissus, comme la glande pinéale (GP), sont directement photosensibles, et il existe des photorécepteurs dans le cerveau (DBP pour « Deep Brain Photoreceptor»). Un SCN présomptif a été décrit chez le poisson zèbre mais son rôle dans le système circadien n'est pas connu. La glande pinéale est généralement considérée comme l'horloge principale chez ces espèces. **B.** Vue dorsale de la glande pinéale des poissons téléostéens : elle contient des photorécepteurs classiques en son centre (en gris) qui sécrètent la mélatonine et des neurones de projection en sa périphérie (en blanc), équivalents des RGCs. Le nombre de cellules correspond au stade 48hpf de poisson zèbre.

(Cahill, 1996) et le brochet (Bolliet et al., 1994). De plus chez le poisson zèbre, la glande pinéale est également directement photoentrainable : son rythme de sécrétion de mélatonine en culture s'adapte à un rythme LD inversé et garde la phase de ce rythme quand elle est replacée en DD (Cahill, 1996). Elle représente donc chez certains poissons une horloge circadienne autonome comme chez les poulets, et c'est cette structure qui est généralement considérée comme horloge principale. Deux gènes codant pour des enzymes de type AANAT (Aralkylamine N-Acetyltransferase), enzymes limitantes de la voie de synthèse de mélatonine sont exprimés chez la plupart des poissons étudiés : *aanat1*, exprimé dans la rétine, et *aanat2*, principalement exprimé dans les photorécepteurs classiques de la glande pinéale et parfois dans les photorécepteurs classiques de la rétine, comme chez le poisson zèbre (Appelbaum et al., 2006). L'expression d'*aanat2* est rythmique chez le poisson zèbre et est directement régulée par l'horloge moléculaire. Son activité est aussi régulée par la lumière : ainsi chez le brochet, la truite et la dorade, la lumière entraîne la dégradation d'AANAT2 dans la glande pinéale en culture par le protéasome (Falcón et al., 2001).

### (2) Pinéalectomie chez les poissons téléostéens

La pinéalectomie produit également des résultats variables selon les espèces (voir Zhdanova and Reeb, 2005 pour revue) : chez certaines espèces de poissons, cela n'a aucun effet sur le rythme de l'activité locomotrice (comme le poisson diurne mullet de lac en LD et DD, certains poisson chat japonais nocturnes en DD, LL ou LL de faible intensité, et la truite diurne en LL), cela abolit ces mêmes rythmes chez d'autres (le poisson chat fossile nocturne DD, certaines lamproies arctiques nocturnes en LD et DD) ou change la période du rythme en conditions constantes (certains mullet de lac en DD, le poisson chat japonais DD, mais pas LL ou LL de faible intensité).. Les effets variables de la pinéalectomie peuvent être dus en partie au fait que la glande pinéale ne contient pas une horloge circadienne dans toutes les espèces, comme chez la truite qui, lorsque la glande pinéale est en culture, continue à sécréter de la mélatonine de façon rythmique en LD mais pas en DD. La glande pinéale pourrait avoir un rôle de synchronisation des horloges périphériques via une voie hormonale (mélatonine) mais aussi via une voie nerveuse (neurones de projection).

### (3) Rôle de la pinéale chez le poisson zèbre

Aucune expérience de pinéalectomie n'a été décrite chez le poisson zèbre. D'autres types d'expériences ont été faites : ainsi lorsque l'horloge moléculaire est spécifiquement bloquée dans les photorécepteurs classiques de la glande pinéale, l'activité locomotrice des larves est toujours rythmique en LD, LL, LL de faible intensité et DD, avec la même période que les poissons dont l'horloge moléculaire n'est pas bloquée, mais avec une amplitude moindre

Espèce	PG	O
Mulet de lac	LD : rythmique DD : changement de période chez certains individus	
Poisson chat japonais	DD : changement de période LL : rythmique sans changement de période	
truite	LL : rythmique	
Poisson chat fossile	DD : arythmie chez certains individus	
Lamproie arctique	LD, DD : arythmie chez certains individus	
<i>Astyanax mexicanus</i>		(Poisson cavernicole) LD : rythmique DD : arythmie
<i>P. andruzzii</i>		(Poisson cavernicole) LD : arythmie (entraînable par nourriture)

**Table 7 : Conséquences d'une lésion de la glande pinéale (PG) ou de l'absence d'œil chez les poissons**

en LL de faible intensité et DD. Cependant la préférence de placement dans une colonne d'eau est arythmique en DD : les larves ne présentent plus de préférence pour le tiers supérieur de la colonne pendant le jour circadien (Ben-Moshe Livne et al., 2016). Les larves mutantes pour *aanat2* ne présentent pas de différence au niveau de la période du rythme de leur activité locomotrice en LD ou en DD. En DD ce rythme a une plus petite amplitude chez les larves mutantes, et en LD elles sont plus actives que les larves non mutantes la nuit (elles dorment moins). Cela semble être indépendant de l'horloge circadienne puisque lorsque les larves sont élevées en noir complet (une condition qui empêche l'horloge moléculaire de se mettre en place et donc les rythmes circadiens d'apparaître), cette hyperactivité persiste dans les larves mutantes. Le rythme de sommeil est cependant affecté en DD après entraînement en LD : chez les larves mutantes, le sommeil n'est alors plus rythmique (Gandhi et al., 2015). La glande pinéale semble donc avoir un rôle important dans le système circadien, puisque son bon fonctionnement semble nécessaire pour la maintenance de certains rythmes circadiens.

### c) Oeil

Un rôle de l'œil dans le système circadien chez les poissons n'a pas été décrit. Il est cependant intéressant de se pencher sur l'étude comparée d'espèces de poissons aveugles et non aveugles. L'un de ces poissons est *astyanax mexicanus*, qui existe sous deux formes : une forme de surface pigmentée et ayant des yeux fonctionnels, et une forme cavernicole non pigmentée et présentant une dégénérescence oculaire, mais ayant toujours une glande pinéale qui semble fonctionnelle (Yoshizawa and Jeffery, 2008). En LD, les poissons de surfaces et cavernicoles ont tous les deux une activité locomotrice rythmique selon l'illumination, mais lorsqu'ils sont placés en DD, le poisson cavernicole devient arythmique alors que le poisson de surface reste rythmique, au moins pour le premier cycle DD (Beale et al., 2013). De plus un autre poisson aveugle, le poisson somalien cavernicole *P. andruzzii* a une activité locomotrice complètement arythmique en LD, qui peut cependant être entraînée par la nourriture (Cavallari et al., 2011). Cela pourrait indiquer un rôle important de l'œil dans le système circadien des poissons, mais il pourrait exister d'autres différences clés entre les poissons aveugles et non aveugles, comme par exemple la présence d'une horloge fonctionnelle dans la glande pinéale, ou des mutations dans le génome affectant des gènes de l'horloge moléculaire.

## C. Mécanisme du photoentraînement chez les téléostéens

Chez le poisson zèbre, les cellules et tissus semblent être directement photoentraînables : le rein et le cœur en culture, ainsi que la lignée cellulaire PAC2 (lignée de

cellules embryonnaires de poisson zèbre) continuent à exprimer les gènes de l'horloge moléculaire de façon rythmique en LD et en DD, et ce rythme s'adapte lorsqu'on place ces tissus ou cellules dans un rythme LD inversé (Whitmore et al., 2000). *In vitro*, les horloges périphériques n'ont donc à priori pas besoin d'une horloge centrale pour être photoentraînées chez le poisson zèbre. De plus un grand nombre d'opsines sont exprimées chez le poisson zèbre (au moins 42 opsines), et chaque tissu étudié exprime une ou plusieurs de ces opsines (Davies et al., 2015). Chez le poisson zèbre, l'organisation du système circadien et de son photoentraînement n'est à ce jour pas claire : est-ce que chaque horloge est autonome et photentraînée de manière indépendante et/ou existe-t-il une ou plusieurs structures principales, dont la glande pinéale, pour coordonner les différentes horloges de l'organisme ?

### 1. Photopigments candidats du photoentraînement

Ainsi la nature du ou des photopigments impliqués dans l'induction des gènes par la lumière et le photoentraînement de l'horloge moléculaire n'est pas encore connu, et plusieurs candidats sont proposés. Parmi ceux-ci, on trouve l'opsine TMT (Teleost Multiple Tissue), qui comme son nom l'indique est exprimée dans de nombreux tissus, et les mélanopsines. En effet la transfection de l'opsine TMT ou de la mélanopsine *opn4m2* de poisson zèbre permet d'établir des rythmes de bioluminescence en LD du rapporteur *per2:luciferase* dans des cellules en culture du poisson cavernicole *P. andruzzi* (Cavallari et al., 2011). D'autres candidats sont les cryptochromes de l'horloge moléculaire, qui chez la drosophile sont des photopigments sensibles à la lumière bleue impliqués dans le photoentraînement de l'horloge moléculaire. Une étude montre ainsi, à l'aide de différents inhibiteurs que dans la lignée cellulaire de poisson zèbre Z3, la voie des MAPK est essentielle à l'induction de *per2* par la lumière, et que cette induction est maximale pour une lumière bleu/violette. Dans ces cellules les auteurs ne détectent pas de rétinol, le chromophore utilisé par les opsines, et proposent donc que cette induction se fasse via un photopigment qui ne soit pas une opsine, comme par exemple les cryptochromes (Cermakian et al., 2002). Comme la lumière induit la production d' $H_2O_2$  dans les cellules Z3 et qu'un traitement à l' $H_2O_2$  induit également l'expression de *cry1a* et *per2* dans ces cellules, la voie des ROS pourrait être une voie de signalisation impliquée dans le photoentraînement de l'horloge moléculaire (Hirayama et al., 2007). Hirayama propose ainsi que l' $H_2O_2$ , qui est produit de manière circadienne et en réponse à la lumière, agisse comme second messager pour activer la voie des MAPK et induire la transcription de *cry1a* et *per2*. Le photopigment impliqué dans cette cascade de signalisation pourrait ainsi

être une oxydase contenant de la flavine responsable de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et qui pourrait directement répondre à de la lumière bleue/violette.

## 2. Effets de la lumière sur l'horloge moléculaire

Chez les poissons, les effets de la lumière sur l'horloge circadienne ont principalement été étudiés chez le poisson zèbre. L'expression de nombreux gènes est régulée par la lumière, dont des gènes de l'horloge moléculaire, mais aussi des gènes de réponse au stress et de réparation des dommages induits par les UV : l'expression des gènes *per2*, *cry1a* et *dec1* est ainsi induite chez la larve entière, la glande pinéale adulte, le cœur adulte en culture et les cellules PAC2 après un pulse d'une heure de lumière (Weger et al., 2011; Ben-Moshe et al., 2014). L'analyse de la région promotrice du gène *per2* a permis d'identifier un module de réponse à la lumière d'environ 67 paires de bases qui est capable, lorsqu'il est positionné en amont du gène de la luciférase, d'induire une expression rythmique de la luciférase en LD dans les cellules PAC2 transfectées (Vatine et al., 2009). Ce module contient des boîtes E, qui permettraient la régulation circadienne du gène via la fixation du dimère BMAL/CLOCK, ainsi que des boîtes D qui seraient médiatrices de l'induction du gène par la lumière. Ainsi lorsque les cellules PAC2 sont transfectées avec un vecteur contenant 4 boîtes E en amont de la luciférase, on obtient une expression rythmique et robuste de la luciférase à la fois en LD et DD, tandis que lorsque ce sont 6 boîtes D qui sont mises en amont de la luciférase l'expression n'est rythmique qu'en LD. Plusieurs facteurs de transcription peuvent se fixer à ces boîtes D, dont le facteur de transcription *tef1*. L'expression de *tef1* est elle aussi régulée par l'horloge moléculaire et induite par la lumière. Les boîtes D semblent avoir un rôle central dans la régulation des gènes par la lumière, puisqu'on les retrouve enrichies dans les régions promotrices d'autres gènes régulés par la lumière, comme *cry1a*, *cry5* et *cry-dash* (Weger et al., 2011).

## 3. Photoentrainement au niveau moléculaire

Chez le poisson zèbre, les effets de phase shift induits par un pulse de lumière ont seulement été étudiés au niveau moléculaire. Comme chez les mammifères, un pulse de une heure de lumière administré en fin de journée subjective ou début de nuit subjective induit un retard de phase aussi bien concernant le rythme de bioluminescence du rapporteur *per1b:luciferase* dans des cellules PAC2 (Vallone et al., 2004) que de la sécrétion de mélatonine de glandes pinéales en culture (Debruyne\* et al., 2004), tandis qu'un même pulse administré en milieu ou fin de nuit subjective induit une avance de phase de ces mêmes



rythmes. La courbe de réponse de phase semble ainsi être similaire à celle des mammifères. Le photoentrainement semble impliquer les gènes *per* et *cry*, peut-être par les mêmes mécanismes que le développement de l'horloge moléculaire. Ainsi le décalage de phase de l'expression du rapporteur *per1b:luciferase* induit par un pulse de lumière de 15 minutes dans les cellules PAC2 corrèle avec la capacité de la lumière à induire l'expression de *cry1a* dans ces cellules : lorsque la lumière n'induit que très peu l'expression de *cry1a* (à CT4 ou CT8, c'est-à-dire lors du jour subjectif), le décalage de phase est au plus faible, tandis qu'à CT20 (lors de la nuit subjective) on peut observer une forte induction de l'expression de *cry1a* et un retard de phase d'environ 15h du rapporteur luciférase (Tamai et al., 2007). De façon intéressante, avec le même rapporteur *per1b:luciferase* dans des cellules en culture PAC2, Tamai et Vallone ne trouvent pas la même réponse à la lumière : ainsi dans l'étude de Tamai (Tamai et al., 2007), un pulse de 15min de lumière de forte intensité ( $5000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) induit un retard de phase de CT8 à CT20, tandis que dans l'étude de Vallone (Vallone et al., 2004), un pulse de 1h de lumière de plus faible intensité ( $20 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) induit d'abord un retard de phase de CT8 à CT12 puis une avance de phase à partir de CT12. Ces différences sont peut-être en lien avec l'intensité de lumière utilisée ou le temps d'administration de cette lumière.

#### D. La mélanopsine et les cellules à mélanopsine chez les téléostéens

Chez le poisson-zèbre, cinq gènes de mélanopsines sont exprimés : trois de type *opn4m* (*opn4a*, *opn4b*, *opn4c*) et deux de type *opn4x* (*opn4xa* et *opn4xb*). Tous codent pour des photopigments fonctionnels, comme l'indique la capacité de cellules Neuro-2a (cellules dérivées d'une tumeur de souris) à répondre à un signal lumineux lorsqu'elles sont transfectées par une construction comportant le gène codant pour n'importe laquelle de ces mélanopsines. Comme chez les mammifères et le poulet, elles répondent préférentiellement à une lumière bleue (leur pic d'absorbance est compris entre 470 et 484 nm) (Davies et al., 2011). Le patron d'expression des différentes mélanopsines diffère entre la larve et l'adulte chez le poisson-zèbre. Chez la larve, toutes les mélanopsines à l'exception d'*opn4xa* sont détectées par hybridation *in situ* dans la couche contenant les cellules bipolaires, amacrines et horizontales. La mélanopsine *opn4xa*, tout comme *opn4b*, sont quant à elles exprimées dans la couche des cellules ganglionnaires de la rétine. De façon intéressante, certaines mélanopsines sont détectées dans des structures extra rétiniennes : *opn4a* dans l'aire préoptique, *opn4b* dans le cerveau antérieur ventral et le thalamus dorsal, *opn4c* (aussi appelé

*opn4.1*) dans le cerveau postérieur caudal (à la jonction entre le cerveau antérieur et la moelle épinière), et *opn4xa* dans quelques cellules dans le diencephale dorsal (Matos-Cruz et al., 2011; Sapède et al., 2020; Kölsch et al., 2021). Il semble qu'*opn4xa* et *opn4b* soient également détectées dans la queue par RT-qPCR (Shiraki et al., 2010). L'expression de mélanopsines est également retrouvée exprimée de façon rétinienne et extra rétinienne chez d'autres espèces de poissons : *opn4x1b1* et *opn4x1b2* dans le SCN de saumon (Sandbakken et al., 2012) et *opn4a* dans celui de la morue (Drivenes et al., 2003) ; *opn4b* est détecté par hybridation *in situ* dans l'habenula de la morue (Drivenes et al., 2003) et *opn4x1a*, *opn4x1b1*, *opn4x1b2* dans celle du saumon (Sandbakken et al., 2012)

Chez le poisson zèbre adulte, l'expression, détectée par hybridation *in situ*, est plus étendue et est retrouvée dans tous les types cellulaires de la rétine avec un patron qui peut se chevaucher entre les différents types de mélanopsines (Davies et al., 2011). L'expression d'*opn4xa* n'est par exemple plus restreinte aux cellules ganglionnaires et *opn4xa* n'est plus le seul gène de mélanopsine à être exprimé dans cette couche. Par ailleurs dans tous les organes étudiés (nageoire, cœur, peau, branchies, muscles, foie, cerveau et testicules) les transcrits d'une ou de plusieurs mélanopsines sont détectés par la technologie NanoString (Davies et al., 2015).

## E. Masking, phototaxie et autres rôles possibles des cellules à mélanopsine et de la mélanopsine chez les téléostéens

### 1. Masking

Chez les poissons, l'œil ne semble quant à lui pas indispensable au masking, puisqu'en LD, les poissons *astyanax mexicanus* cavernicoles, d'ont l'œil dégénère au cours du développement, ont une activité locomotrice rythmique en LD alors qu'elle est arythmique en DD. Cependant un autre poisson aveugle, *P. andruzzi*, a une activité locomotrice arythmique en LD, et donc une horloge circadienne et un masking absents.

L'habenula semble être impliquée dans le masking chez le poisson zèbre. En effet une lumière bleue est capable d'induire une activité neuronale dans l'habenula gauche, et la lésion partielle de l'habenula affecte le masking de la position dans une colonne d'eau en réponse à une lumière bleue. Ce comportement, qui présente une rythmicité circadienne où les larves se positionnent préférentiellement dans le tiers supérieur de la colonne pendant le jour subjectif et en bas de la colonne pendant la nuit subjective (Ben-Moshe Livne et al., 2016), est aussi directement influencé par la lumière, et plus particulièrement une lumière bleue ou

verte : en condition d'alternance de lumière et d'obscurité d'une durée de 1 minute chacune, les larves se placent en haut de la colonne en phase de lumière et en bas de la colonne en phase d'obscurité. Après lésion partielle de l'habenula, ce déplacement est moins marqué chez les larves ayant subi une lésion que chez les larves contrôles. De façon intéressante, l'habenula reçoit des afférences directes du thalamus chez le poisson zèbre, et plus particulièrement de l'éminence thalamique médiane, et cette connexion entre le thalamus et l'habenula semble conservée chez plusieurs vertébrés dont le rat et l'humain. Une lumière bleue est aussi capable d'induire de l'activité neuronale dans le thalamus du poisson zèbre mais aussi des humains. L'énucléation ou la lésion de l'éminence thalamique médiane réduisent la réponse à la lumière de l'habenula chez le poisson zèbre. Comme l'éminence thalamique médiane est innervée par des cellules ganglionnaires de la rétine dont environ la moitié expriment la mélanopsine *opn4xa* (Lin and Jesuthasan, 2017; Zhang et al., 2017), il semble donc qu'un processus de masking impliquant les ipRGCs, le thalamus et l'habenula existe chez le poisson zèbre (Fig 16).

## 2. Phototaxie

Lorsqu'on place des larves de poisson zèbre dans une arène dont une partie est fortement éclairée (130 lux) et une partie est faiblement éclairée (60 lux), les larves passent plus de temps dans la partie fortement éclairée que faiblement éclairée. C'est ce qu'on appelle la préférence à la lumière. Cette préférence semble employer le même circuit que celui du masking (ipRGCs, éminence thalamique médiane et habenula, et ici habenula gauche plus particulièrement) puisqu'elle est tout autant abolie après énucléation ou ablation chimique d'une population de cellules ganglionnaires de la rétine comprenant des cellules exprimant *opn4xa* et *opn4b* (*atoh+* ; *eomesa+*), qu'après lésion de l'éminence thalamique ou lésion de l'habenula gauche (Zhang et al., 2017; Kölsch et al., 2021) (Fig 16).

## 3. Réponse à une transition lumineuse

La réponse à une transition lumineuse est bien décrite au niveau de l'activité locomotrice chez la larve de poisson zèbre et peut être décomposée en trois parties : une réponse immédiate qui se déroule dans les secondes suivant la transition lumineuse, appelée startle response, puis une réponse à court terme dans la minute qui suit la transition, et enfin une réponse à moyen terme environ 5 à 10 minutes après la transition. Selon que l'activité locomotrice soit moyennée en secondes ou minutes et selon la fenêtre sur laquelle est

effectué le calcul, la réponse à la transition lumineuse étudiée n'est donc pas la même (Fig 16).

#### a) Réponse immédiate

Au moment de la transition lumineuse, les larves présentent une augmentation soudaine et transitoire de l'activité locomotrice, appelée startle response. Les startle responses sont également décrites chez les mammifères, mais les études sont principalement concentrées sur la réponse à un stimulus auditif, et plus particulièrement à l'habituation à ce stimulus, qui est altéré chez les patients atteints de maladies neurologiques comme la schizophrénie (Fetcho and McLean, 2009). La startle response est appelée light-on response au moment de la transition de l'obscurité vers la lumière (transition light-on) et light-off response à la transition de la lumière vers l'obscurité (transition light-off). Si ces deux réponses sont caractérisées par une augmentation immédiate de l'activité locomotrice suite à la transition lumineuse, cette augmentation est plus importante lors de la light-off response que la light-on response.

La ou les structures médiatrices des startle response lumineuses ne sont pas clairement définies, mais il semble que l'œil ait un rôle important dans ce processus. En effet le mutant *chokh* (*chk*), du mot Bengali pour « œil », qui est caractérisé par une absence d'yeux, (mais également possiblement d'autres structures comme le diencephale ventral) ne présente aucune startle response en light-on ou light-off, et des larves non mutantes énuclées n'ont pas de light-off response (leur light-on response n'a pas été testée) (Emran et al., 2007; Fernandes et al., 2012).

L'intensité de la startle response semble présenter une rythmicité circadienne : en effet lorsqu'on soumet une larve de poisson zèbre à un pulse de 5 minutes d'obscurité pendant la journée, on observe une light-off puis une light-on response importantes. Cependant lorsqu'on soumet une larve à un pulse de 5 minutes de lumière pendant la nuit, la light-on puis la light-off response sont absentes ou très faibles. Cela semble bien être dû à une sensibilité différente à une transition lumineuse pendant la journée et la nuit, et non pas à l'effet de la différence du niveau basal de l'activité locomotrice entre la journée et la nuit : en effet si on place pendant la journée des larves dans le noir pendant 3 heures pour qu'elles aient un niveau basal similaire à celui observé pendant la nuit (dark-adapted), puis qu'on les soumet à un pulse de 5 minutes de lumière, on observe cette fois-ci une light-on puis une light-off response importante. De même des larves placées à la lumière pendant 3 heures au cours de la nuit (light-adapted) puis soumises à un pulse de 5 minutes d'obscurité, présentent

une light-off puis une light-on response, mais la light-off response est beaucoup moins importante si on compare celle observée dans les larves light-adapted de celle des larves soumises à un pulse d'obscurité pendant la journée. Cette rythmicité circadienne de l'intensité de la startle response semble être en lien avec la sensibilité à la lumière de la rétine, qui présente elle aussi une rythmicité circadienne, avec par exemple une réponse plus faible à un flash lumineux mesuré par électrorétinogramme pendant la nuit subjective que le jour subjectif, une expression d'opsines, dont l'opsine *opn1lw* (opsine sensible aux hautes longueurs d'ondes) présente dans les cônes plus importante lors du jour subjectif que la nuit subjective, ainsi qu'une structure synaptique différente entre la journée et la nuit (Li et al., 2005; Emran et al., 2010). Ceci appuie donc le rôle de l'œil dans les startle responses chez le poisson-zèbre. De façon intéressante, les larves mutantes pour *per2* ont une réponse light-off comparable avec les larves contrôles, mais aucune light-on response ne peut être observée chez ces larves. Dans ces mutants, la structure des synapses des cônes de la rétine est affectée ainsi que l'expression de l'opsine *opn1lw*, dont l'expression est toujours rythmique en LD mais avec une expression très faible par rapport aux larves contrôles, et une expression arythmique en DD (Huang et al., 2018). Le gène *per2* semble donc avoir un rôle dans la sensibilité aux transitions lumineuses chez le poisson zèbre, mais il n'est pas clair si ce rôle est lié à sa fonction dans l'horloge moléculaire.

#### b) Réponse à court terme

Dans la minute qui suit la transition lumineuse, se déroule une seconde réponse à la transition lumineuse, qu'on appellera ici réponse à court terme. La light-on response s'accompagne généralement d'une baisse de l'activité locomotrice par rapport au niveau de l'activité locomotrice avant la transition, tandis qu'au contraire la light-off response s'accompagne d'une activité locomotrice augmentée par rapport au niveau observé avant la transition lumineuse (Emran et al., 2007).

L'œil semble également impliqué dans cette réponse à court terme, puisque les larves énuclées présentent une augmentation de l'activité locomotrice dans les minutes suivant la transition light-off qui est moindre que chez les larves contrôles. Après ablation des photorécepteurs classiques de la glande pinéale par une méthode chimique grâce au transgène *Tg(tph2:nfsB)*, qui permet l'expression de la nitroreductase dans les photorécepteurs de la glande pinéale, les larves présentent toujours une augmentation de l'activité locomotrice dans les minutes suivant la transition lumineuse. Celle-ci est diminuée par rapport aux larves contrôles, mais est tout de même moins affectée que chez les larves

énuclées. L'œil et les photorécepteurs classiques de la glande pinéale semblent donc jouer un rôle dans la réponse à court terme à une transition lumineuse light-off. Cependant lorsqu'à la fois l'œil et les photorécepteurs classiques de la glande pinéale sont ablatés, cette augmentation est affectée mais toujours présente. Des cellules potentiellement directement photosensibles de la région préoptique seraient aussi impliquées dans l'augmentation de l'activité locomotrice suite à une transition lumineuse light-off. En effet les larves mutantes *otp* (*orthopedia*) ont une diminution drastique de la réponse à court terme à la transition light-off, et elle est totalement perdue chez les larves mutantes *otp* et énuclées. De façon intéressante, l'expression de la mélanopsine *opn4a* est détectée dans des neurones de la région *otp+* dont le développement est affecté dans le mutant *otp*, comme certains neurones de la région préoptique antérieure et des neurones dopaminergiques du tuberculum postérieur. L'ablation des neurones dopaminergiques du tuberculum postérieur avec l'association des transgènes Tg(*th:Gal4*) et Tg(*UAS:NsfB*) n'affecte que très peu la réponse à court terme à la transition light-off. Des photorécepteurs de la région préoptique antérieure exprimant la mélanopsine *opn4a* pourraient donc être essentiels, avec la rétine et la glande pinéale, à l'augmentation de l'activité locomotrice à court terme suite à une transition lumineuse light-off (Fernandes et al., 2012).

#### c) Réponse à moyen terme

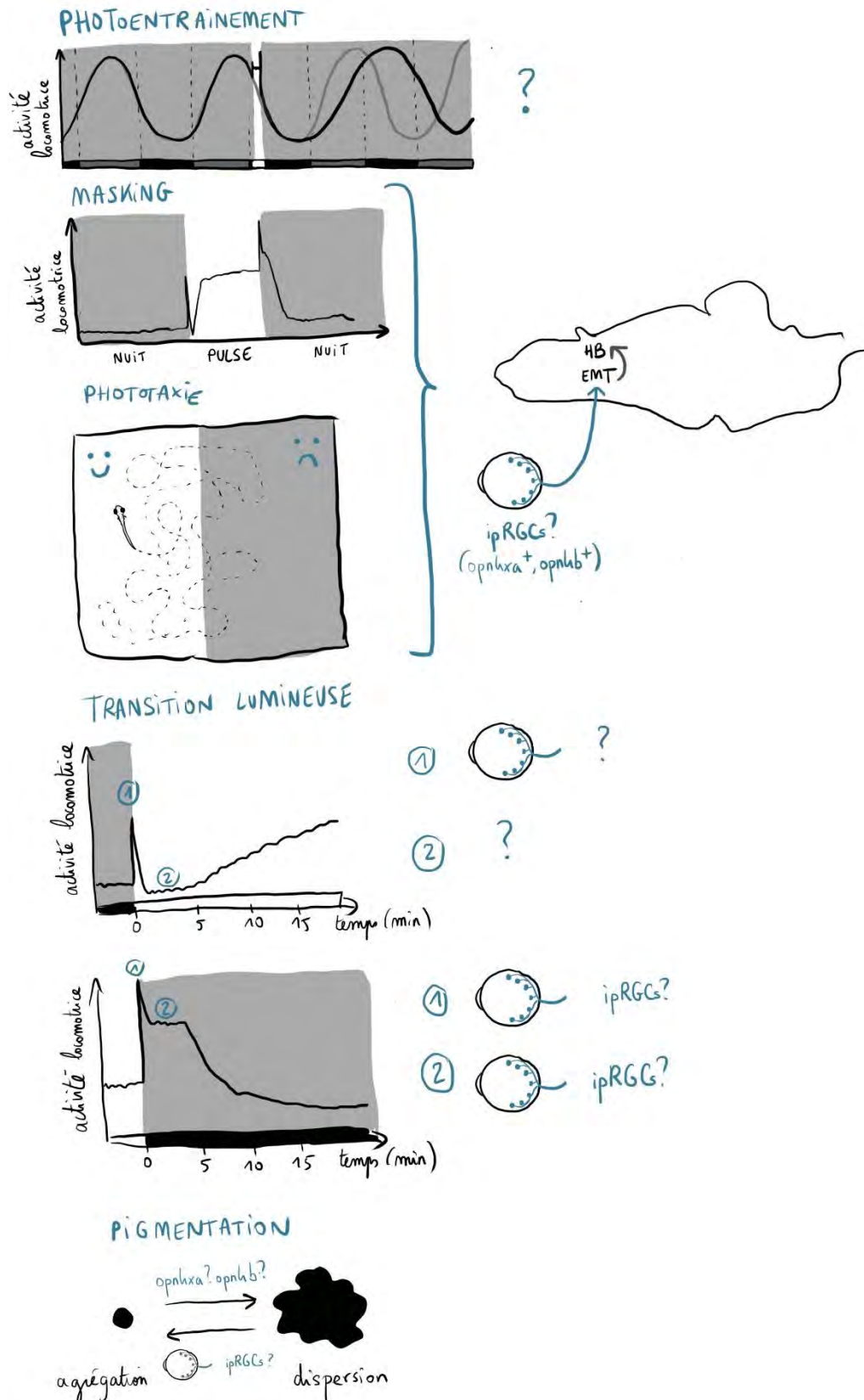
Enfin, environ 5 à 10 minutes après la transition lumineuse se déroule la réponse à moyen terme : après une transition light-on, l'activité locomotrice augmente peu à peu pour atteindre un niveau supérieur à celui observé avant la transition lumineuse, tandis qu'après une transition light-off, l'activité locomotrice diminue peu à peu pour atteindre un niveau inférieur à celui observé avant la transition lumineuse (Prober et al., 2006; Fernandes et al., 2012). Cette réponse à moyen terme s'apparente au phénomène de masking.

## 4. Pigmentation et lumière

Chez le poisson zèbre, la lumière induit un changement de couleur du corps en induisant soit une dispersion (assombrissement du corps) ou une agrégation (blanchissement du corps) des mélanosomes, des vésicules contenant la mélanine, un pigment d'apparence noir, dans les cellules pigmentaires appelées mélanophores. A 2dpf (days-post-fertilization pour jours après fécondation), la lumière induit essentiellement une dispersion des pigments, probablement pour protéger les larves des rayons UV car elles ne sont pas encore capables de s'éloigner de la source lumineuse. Plus tard, à 5dpf, la lumière induit d'abord une dispersion puis une agrégation des pigments. Une énucléation abolit le phénomène d'agrégation des

pigments mais pas leur dispersion à 5dpf, tandis que l'on peut toujours observer une dispersion des pigments dans un bout de queue isolé à 2dpf. L'agrégation des pigments serait donc médiée par l'œil et la dispersion possiblement par une photosensibilité intrinsèque aux mélanophores. De façon intéressante l'expression d'au moins deux mélanopsines, *opn4xa* et *opn4b*, a été décrite dans la queue de poisson zèbre à 2dpf (Shiraki et al., 2010). Les cellules à mélanopsine de l'œil et la mélanopsine dans les mélanophores pourraient être impliquées dans le changement de couleur de corps induit par la lumière (Fig 16).

Chez les mammifères, les ipRGCs (exprimant la mélanopsine) sont au cœur de la plupart des influences circadiennes et non circadiennes de la lumière sur le comportement. Cependant il n'est pas connu si le rôle de la mélanopsine et des cellules qui l'expriment est conservé chez les vertébrés non mammifères et/ou si elles présentent d'autres rôles, en particulier chez le poisson zèbre qui représente un modèle émergent de l'étude de l'influence de la lumière sur de nombreux processus. Ainsi comme chez les mammifères, la lumière influe sur les rythmes circadiens (photoentrainement), produit du masking et de la phototaxie chez le poisson zèbre, mais elle est aussi impliquée dans le développement de l'horloge et des rythmes circadiens, et une transition lumineuse induit une réponse locomotrice (Fig 16).



**Figure 16 : Plusieurs processus pourraient impliquer des ipRGCs et des mélanopsines chez le poisson zèbre**  
 Le photoentrainement, le masking, la phototaxie, la réponse locomotrice à une transition lumineuse et le changement de pigmentation en lien avec la lumière pourraient impliquer des cellules à mélanopsine de l'œil ou d'autres tissus. Le masking et la phototaxie pourraient impliquer des ipRGCs via une connexion à l'éminence thalamique (EMT) qui connecte elle-même à l'habenula (HB). La réponse à une transition lumineuse se découpe en trois parties : 1) la réponse immédiate, 2) la réponse à court terme, puis 3) la réponse à long terme, équivalente au masking.





# RESULTATS

C'est dans ce contexte que nous avons cherché à caractériser le rôle d'une des mélanopsines exprimée chez la larve de poisson zèbre, *opn4xa*, et des cellules qui l'expriment (cellules *opn4xa+*). Nous avons dans un premier temps étudié la réponse à la lumière des cellules *opn4xa+* de la glande pinéale (Sapède *et al.*, 2020, Chaigne *et al.*, en préparation) puis étudié si les cellules *opn4xa+* de la rétine et de la glande pinéale ainsi que le gène codant pour la mélanopsine *opn4xa* sont impliqués dans la régulation circadienne et non circadienne de l'activité locomotrice par la lumière (Résultats complémentaires partie 1, Chaigne *et al.*, en préparation, et Résultats complémentaires partie 2).

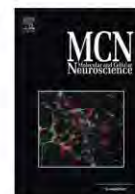


## I. La mélanopsine *opn4xa* définit une nouvelle population de neurones de projection de la glande pinéale

Avant le début de notre étude, *opn4xa* avait été décrite comme exprimée dans la couche des cellules ganglionnaires de la rétine ainsi que dans quelques cellules placées autour de la glande pinéale de la larve de poisson zèbre (1 à 5 dpf –days post fertilization- Matos-Cruz *et al.*, 2011). Dans cet article, le marqueur *otx5* avait été utilisé pour définir le territoire de la glande pinéale. Cependant *otx5* n'est exprimé que dans les photorécepteurs classiques de la glande pinéale et ne représente donc pas un marqueur pan-pinéal. Avec d'autres marqueurs, l'équipe de P. Blader a ainsi confirmé que les cellules *opn4xa* extra-rétiniennes font partie de la glande pinéale et ont une identité de neurone de projection dans cette structure (4 à 5 cellules *opn4xa+* parmi 20 neurones de projection à 48hpf –hours post fertilization- en moyenne).

Afin de savoir si *opn4xa* confère une photosensibilité à ces neurones de projection, nous avons étudié l'activation des neurones de projection de la glande pinéale suite à un pulse de lumière de 30min à l'aide de l'expression du marqueur *fos*, utilisé comme témoin précoce d'une activité neuronale. Seuls les neurones de projection *opn4xa+* sont ainsi activés suite à un pulse de lumière blanche. Nous avons ensuite étudié la réponse des neurones de projection à des pulses de lumière de différentes longueurs d'ondes (bleue, verte et rouge) ainsi que des pulses d'obscurité fait après une habitude avec des lumières de différentes longueurs d'ondes. Les neurones de projection *opn4xa+* semblent ainsi être les seuls neurones de projection activés suite à un pulse de lumière. Ils sont activés par une lumière bleue ou verte mais pas par une lumière rouge. Enfin, seuls des neurones de projection *opn4xa-* sont activés par un pulse d'obscurité (Sapède *et al.*, 2020). A l'aide du mutant *opn4xa-/-* généré par Elise Cau avec la technologie CRISPR/Cas9, nous avons également démontré que la photosensibilité des cellules *opn4xa+* est intrinsèque aux cellules *opn4xa* puisque l'expression de *fos* n'est pas observée dans la glande pinéale de mutants *opn4xa-/-* (Chaigne *et al.*, en préparation).

Les neurones de projection *opn4xa+* de la glande pinéale représentent donc une population particulière de neurones de projection de par leur photosensibilité intrinsèque et leur mode de réponse à la lumière.



## Functional heterogeneity in the pineal projection neurons of zebrafish

Dora Sapède<sup>a,b</sup>, Clair Chaigne<sup>a</sup>, Patrick Blader<sup>a</sup>, Elise Cau<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centre de Biologie du Développement (CBD, UMR5547), Centre de Biologie Intégrative (CBI, FR 3743), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

<sup>b</sup> IRMB, Université de Montpellier, INSERM, Montpellier, France



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Melanopsin  
ipRGCs  
Pineal gland  
Photoreceptor

### ABSTRACT

The zebrafish pineal organ is a photoreceptive structure containing two main neuronal populations (photoreceptors and projection neurons). Here we describe a subpopulation of projection neurons that expresses the melanopsin gene, *opn4xa*. This new pineal cell type, that displays characteristics of both projection neurons and photoreceptors, share a similar dependency for BMP and Notch signalling pathways with classical non-photosensitive projection neurons (PN). Functionally, however, whereas classical, *opn4xa*-negative PNs display an achromatic LIGHT OFF response, the novel cell type we describe exhibit a LIGHT ON character that is elicited by green and blue light. Taken together, our data suggest a previously unanticipated heterogeneity in the projection neuron population in the zebrafish pineal organ raising the question of the importance of these differences in pineal function.

### 1. Introduction

The zebrafish pineal gland is a neuroendocrine structure of the dorsal diencephalon that plays a key role in mediating the effects of the circadian clock on sleep/wake rhythms. An important part of this activity is controlled by pineal photoreceptors (PhRs) that secrete the sleep-promoting hormone melatonin (Ben-Moshe Livne et al., 2016; Gandhi et al., 2015). The PhR population is heterogeneous and contains three described subtypes: cells expressing *red cone opsin* (15 cells at 48–54 hpf), those expressing *exorhodopsin* (20 cells at 48–54 hpf; Cau et al., 2019; Clanton et al., 2013) and cells coexpressing *parietopsin* (a green-sensitive opsin) and the UV-sensitive opsin, *parapinopsin1* (6 cells at 48–54 hpf; Cau et al., 2019; Koyanagi et al., 2015; Wada et al., 2018). In addition to PhRs, the pineal gland contains projection neurons (PNs, 20 cells at 48 hpf) which project to the ventral diencephalon (Wilson and Easter, 1991) and a population of AgRP2+ cells that do not express neuronal markers nor exhibit a neuronal morphology, and share molecular characteristics with retinal-pigment epithelium cells (Shainer et al., 2017, 2019).

While a significant amount is known concerning the subpopulations of pineal PhRs and their function (Ben-Moshe Livne et al., 2016; Cau et al., 2019; Clanton et al., 2013; Gandhi et al., 2015; Koyanagi et al., 2015; Wada et al., 2018), much remains to be discovered concerning a possible corresponding heterogeneity in the PN population. PN functions have not been investigated. Electrophysiological experiments in lampreys and goldfishes suggest that PNs receive and integrate inputs

from the PhRs (Meissl et al., 1986; Uchida et al., 1992). Most projection neurons are thought to function in a LIGHT OFF fashion. Indeed, electrophysiological experiments performed in the rainbow trout suggest that teleost pineal projection neurons fire constantly in the dark and exhibit a LIGHT OFF response. This response is elicited at all visible wavelengths, although maximum firing occurs at green wavelengths. While it is not clear whether individual projection neurons (PNs) respond to all wavelengths, nevertheless, this response was referred to as ‘achromatic’ as it is elicited by a wide range of wavelengths (Dodt, 1963; Morita, 1966). In contrast, in the same species, few projection neurons show a chromatic response. This response is excitatory at medium and long wavelengths and inhibitory in the violet-UV range (Morita, 1966). PN achromatic LIGHT OFF responses were also recorded in other species such as frog, pike and turtle (Falcón and Meissl, 1981; Meissl and Ueck, 1980; Morita and Dodt, 1965) while chromatic LIGHT ON responses were described in lizards, frogs and pikes (Dodt and Heerd, 1962; Dodt and Meissl, 1982; Meissl and Donley, 1980). These results suggest heterogeneity in the population of pineal projection neurons in a number of species. However, whether a similar heterogeneity exists in zebrafish is unclear, as are the molecular mechanisms that permit PN responses to changes in brightness and wavelength.

In the main photosensitive structure of the vertebrate, the retina, there is a clear heterogeneity in the population of projection neurons. Indeed, based on morphological, molecular, electrophysiological and/or functional criteria around 30 categories of Retinal Ganglion Cells, or RGCs, have been described so far in the mouse (see Sanes and Masland,

\* Corresponding author.

E-mail address: [elise.cau@univ-tlse3.fr](mailto:elise.cau@univ-tlse3.fr) (E. Cau).

<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103468>

Received 17 October 2019; Received in revised form 31 January 2020; Accepted 1 February 2020

Available online 03 February 2020

1044-7431/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.



2015 for a review). Strikingly, among these subpopulations, a subset of the RGCS has been shown to be directly photosensitive, owing to the expression of melanopsin, a blue-green photosensitive pigment. These intrinsically photosensitive RGCs (ipRGCs), integrate light information from rods and cones, as well as from their innate photosensitivity, to regulate photo-entrainment of the circadian system (Lucas et al., 2012). Therefore, ipRGCs form a class of atypical photoreceptors that can both directly sense light and project to distinct brain areas to influence circadian rhythms, suggesting they function both as photoreceptors and projection neurons.

In this paper, we describe that the expression of the zebrafish melanopsin gene *opn4xa* is restricted to a subset of pineal PNs and analyse their development. The development of PhRs and PNs require specific signalling pathways: the Bone Morphogenetic Protein (BMP) pathway is necessary and sufficient to trigger PhR fate as well as to activate the Notch pathway in these cells, which inhibits a PN fate (Cau and Blader, 2009; Cau et al., 2008; Quillien et al., 2011; Sapède and Cau, 2013). Analysis of embryos deficient for the BMP or the Notch signalling pathways suggest that Notch inhibits the production of *opn4xa* + cells, as it does with the rest of the PN population, and that the BMP pathway is dispensable for *opn4xa* + cell development. These results suggest that *opn4xa* + cells and classical PNs share a common basic developmental program. Finally, monitoring of the induction of the immediate early gene *c-fos* in different illumination regimes highlights two distinct activities in the PN population. A subpopulation of *opn4xa* - cells show a LIGHT OFF response when the embryos are adapted in white, blue, red or green light. In contrast, *opn4xa* + PNs exhibit a LIGHT ON response following a pulse of white, blue or green light. We thus propose a parallel between *opn4xa* + PNs and the ipRGCs of the retina.

## 2. Results

### 2.1. A subset of pineal projection neurons expresses the melanopsin gene *opn4xa*

To describe photoreceptor heterogeneity in the pineal, we previously analysed the expression of classical opsin photo-pigments (Cau et al., 2019). We also considered the expression of the five zebrafish melanopsin genes and found a small population of *opn4xa* + cells at the left and right borders of the pineal organ (Fig. 1A) (Matos-Cruz et al., 2011). Combining in situ hybridisation for *opn4xa* with immunostaining against GFP in the transgenic lines *Tg(aanat2:GFP)<sup>y8</sup>* and *Tg(elavl3:EGFP)<sup>km3</sup>*, which label PhR and PN respectively (Fig. 1B, (Cau et al., 2008)), revealed that *opn4xa* expression is not detected in classical PhR (Fig. 1C,D,E) but in PNs (Fig. 1F,G,H). *opn4xa* expression can be first detected at 22–23 h post-fertilisation (hpf) in 1–2 *elavl3:EGFP*-positive cells. At 23 hpf an average of 4 *opn4xa* + cells are observed and this number remains stable to at least 10 days post-fertilisation (dpf; Fig. 1I). To further characterise *opn4xa* + cells, we looked for different markers displaying similarly restricted expression within the pineal organ. We found that the gene encoding the Wnt transcriptional effector Tcf7 (Veien et al., 2005) is expressed in a small subset of PNs (Fig. S1 A–C). We took advantage of a *tcf7* enhancer trap line *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* (Nagayoshi et al., 2008) to characterise *tcf7* expression in the pineal further. We first confirmed that expression of GFP from the *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* line co-localises with endogenous *tcf7* expression in PNs (Fig. S1 A–C). We next assessed co-labelling of the *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* enhancer trap line with *opn4xa* mRNA at stages ranging from 24 hpf to 4 dpf. Up to 30 hpf, the majority of GFP + cells were also *opn4xa*-positive (Fig. 1 I,J,K, Fig. S1 G). In contrast, from 2 dpf onwards, a population of cells showing a lower level of GFP appeared in the pineal of *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* that do not express *opn4xa* (Fig. S1 D–G). Altogether, we describe a subpopulation of PNs expressing *opn4xa* that can be labelled specifically with the *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* enhancer trap line up to 30 hpf.

### 2.2. Specification of the *opn4xa* + pineal fate does not require Wnt signalling

The fact that the *tcf7* enhancer trap line *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* is expressed in *opn4xa* + cells prompted us to investigate whether Wnt signalling was involved in the specification of the *opn4xa* + fate. First, we tested the expression of *opn4xa* in *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* homozygous embryos as the enhancer trap insertion abolishes expression of the endogenous *tcf7* gene (Nagayoshi et al., 2008). Pineal *opn4xa* + cells were observed in normal numbers in all GFP + embryos coming from *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* + / - incrosses suggesting that *tcf7* is not required for their specification (Fig. 2 A,B) as one third of GFP + embryos are expected to be homozygous for the insertion. To look at a possible redundancy with other Wnt effectors, we analysed the expression of *tcf7l2* and *lef1* in the pineal and compared it with the *Et(T2KHG)<sup>nss8</sup>* enhancer trap. Only the former is expressed in the pineal but did not show co-expression with the *tcf7* enhancer trap (Fig. S2). Finally, we modulated Wnt activity using conditional overexpression of Dkk1 or Wnt8 in heat-shocked *Tg(hsp70l:dkk1b-GFP)<sup>w32</sup>* and *Tg(hsp70l:wnt8-GFP)<sup>w34</sup>* embryos, respectively (Stoick-Cooper et al., 2007). Heat-shocked embryos carrying the *Tg(hsp70l:dkk1b-GFP)<sup>w32</sup>* transgene show normal expression of *opn4xa* (Fig. 2B) suggesting that Wnt activity is dispensable for the specification of *opn4xa* + cells. Similarly, heat-shocked embryos transgenic for the *Tg(hsp70l:wnt8-GFP)<sup>w34</sup>* transgene show normal numbers of *opn4xa* + cells suggesting that Wnt activity is not sufficient to drive the *opn4xa* + fate. We conclude that Wnt signalling does not play a role during specification of the *opn4xa* + fate.

### 2.3. Specification of *opn4xa* + cells does not require BMP signalling and is inhibited by Notch signalling

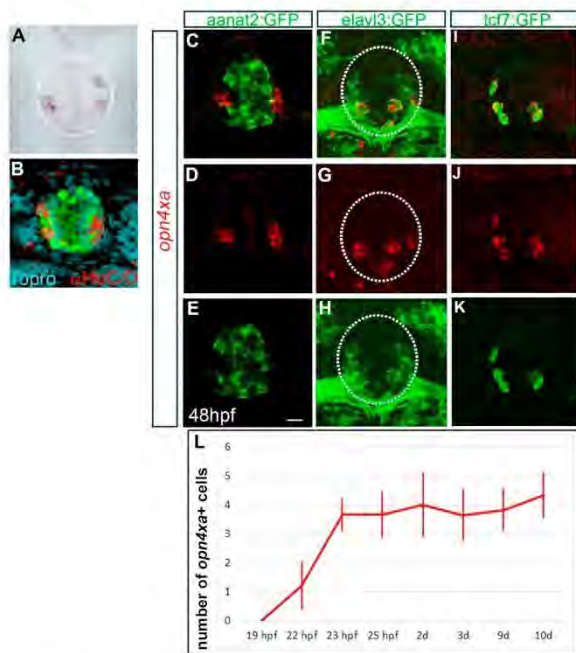
Classical PhRs are specified by a combination of Notch and BMP pathway activity with BMP activity being necessary and sufficient to activate the PhR fate and Notch being required to inhibit the inappropriate PN program (Cau et al., 2008; Quillien et al., 2011). To understand whether *opn4xa* + cells are closer to PNs or PhRs developmentally speaking, we analysed the effects of reducing BMP or Notch activities on the specification of these cells.

We used *Tg(hsp70l:dnXla.Bmpr1a-GFP)<sup>w30</sup>*, *Tg(hsp70l:nog3)<sup>f14</sup>* double transgenic embryos heat-shocked at 14hpf to reduce BMP signalling, a condition that we have previously shown reduces the number of classical PhRs (Quillien et al., 2011). Under these conditions, the number of *opn4xa* + cells was similar compared to wildtype embryos (Fig. 2A, C); pineal *opn4xa* + cells in BMP loss-of-function embryos exhibit an aberrant medial location which is likely due to the absence of classical photoreceptors normally found in the centre of the pineal gland (Fig. 2A). The effects of impairing Notch activity was analysed in the *mindbomb* (*mib*) mutant (*mib<sup>ta52b</sup>*) (Itoh et al., 2003). We found that *mib* embryos exhibit twice the number of *opn4xa* + cells at 48 hpf compared to controls (Fig. 2A,D). Altogether these results suggest that pineal *opn4xa* + cells behave as classical pineal PNs with respect to their requirement for BMP and Notch activity.

### 2.4. In contrast to classical PNs, *opn4xa* + projection neurons respond to light in a LIGHT ON fashion

Electrophysiological experiments performed in the rainbow trout, pike, frog and turtle have shown that projection neurons are continuously activated in the dark suggesting that they function in a LIGHT OFF mode (Dodt, 1963; Falcón and Meissl, 1981; Meissl and Ueck, 1980; Morita, 1966; Morita and Dodt, 1965). To assess whether *opn4xa* + PNs are also LIGHT OFF, we analysed the expression of *c-fos* after a 30 min dark-pulse in 48 hpf light-adapted embryos (Fig. 3A); *c-fos* is an immediate early gene that is extensively used as a read out of neuronal activation (reviewed in Guzowski et al., 2005). While light-adapted embryos fixed at the same circadian time show no *c-fos* expression in





**Fig. 1.** *opn4xa* is expressed in a restricted population of projection neurons within the pineal gland.

(A) In situ hybridisation at 48 hpf showing pineal *opn4xa*+ cells. The pineal is highlighted with a white dotted circle.

(B) Confocal projection showing the relative distribution of PNs (red, labelled with an anti-HuCD antibody) and PhRs (green, labelled with an anti-GFP in a Tg(*aanat2:GFP*)<sup>ns8</sup> background) at 48 hpf. Topro (cyan) labels cell nuclei. (C-K) Co-expression of *opn4xa* mRNA (in red) on the one hand with the Tg(*aanat2:GFP*)<sup>ns8</sup> (*'aanat2:GFP'*, C,D,E), the Tg(*elavl3:EGFP*)<sup>km3</sup> (*'elavl3:EGFP'*, F,G,H) and the *Et(T2KHG)*<sup>ns8</sup> (*'tcf7:GFP'*, I,J,K transgenes (in green).

(A-K) Anterior is upwards. Scale bars: 10 μm.

(L) Time course of *opn4xa* expression in the developing pineal organ. Average numbers of *opn4xa*+ cells are quantified at different time points indicated in hours post-fertilisation (hpf). Values are mean ± SD, n = 4, 5, 3, 6, 9, 26, 6 and 6, respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the pineal (Fig. 3Bi), a pulse of dark induced expression of *c-fos* expression in  $8.36 \pm 2.13$  cells per embryo, which are located laterally within the pineal (from n = 14 embryos) (Fig. 3Bii). The same experiment performed in *Et(T2KHG)*<sup>ns8</sup> or *Tg(elavl3:EGFP)*<sup>km3</sup> embryos showed that these LIGHT OFF cells are *tcf7:GFP*- but *elavl3:EGFP*+ and thus correspond to classical, *opn4xa*- projection neurons (Fig. 3C,D). To address if *opn4xa*+ PNs are LIGHT ON, next we examined the effect of a light pulse in dark-adapted embryos (Fig. 4A). We found that a 30 min pulse of white light delivered to 48 hpf dark-adapted embryos induced *c-fos* expression in  $3 \pm 1.41$  cells (from n = 17 embryos) located laterally within the pineal organ (Fig. 4Bii) in cells that strongly express the *Et(T2KHG)*<sup>ns8</sup> transgene (Fig. 4C); *c-fos* transcript was not detected in the pineal of non-light stimulated embryos fixed at the same circadian time (Fig. 4Bi). Similar results were obtained in 27 hpf and 3 dpf dark-adapted embryos (Fig. S3). In mammals, the pineal gland is connected to the retina via a multi-synaptic pathway (Sapède and Cau, 2013). To rule out that the pineal LIGHT ON response we describe is caused by photosensitivity in the retina, we assessed the presence of this response in *lakritz* (*lak*) mutant which lack neurotransmission from the retina owing to a complete absence of RGCs (Kay et al., 2001). The pineal LIGHT ON response is similar in *lak*+/+ and *lak*-/- embryos at 48 hpf suggesting that the retina is not involved in this activity

(Fig. 4D,E).

Taken together, our results indicate heterogeneity in the light-response within the PN population with *opn4xa*+ PNs functioning in a LIGHT ON fashion and classical PNs in a LIGHT OFF mode.

### 2.5. LIGHT ON and LIGHT OFF responses are elicited by different range of wavelengths

Apart from *Opn4xa*, which is sensitive to blue-green light (Davies et al., 2011), the classical PhR in the pineal express opsin photo-pigments (*exorhodopsin*, *red cone opsin* and *parietopsin*) that are sensitive to green and red light (Cau et al., 2019). We next examined whether LIGHT ON in blue, red or green wavelengths were involved in the induction of *c-fos* expression. We observed that 30 min light pulses in the blue and green range induce *c-fos* expression while similar pulses of red light could not induce a LIGHT ON response (Fig. 5 A-C, G). Given that the absorbance spectrum of the *Opn4xa* photo-pigment overlaps with the emission of the green and blue LEDs used in this study, we propose that this LIGHT ON response reflects the direct photosensitivity of *opn4xa*+ photo-pigment. In marked contrast with the results obtained for the LIGHT ON response, LIGHT OFF was elicited when the embryos were adapted in either red, blue or green light (Fig. 5 D-F, H) suggesting that this response is elicited by a wide-range of wavelengths and can, therefore, be referred to as achromatic.

Our results suggest that classical, *opn4xa*- projection neurons function in a LIGHT OFF mode and most likely transduce the light input received by classical PhRs. In contrast, *opn4xa*+ projection neurons are activated by light and most likely directly photosensitive.

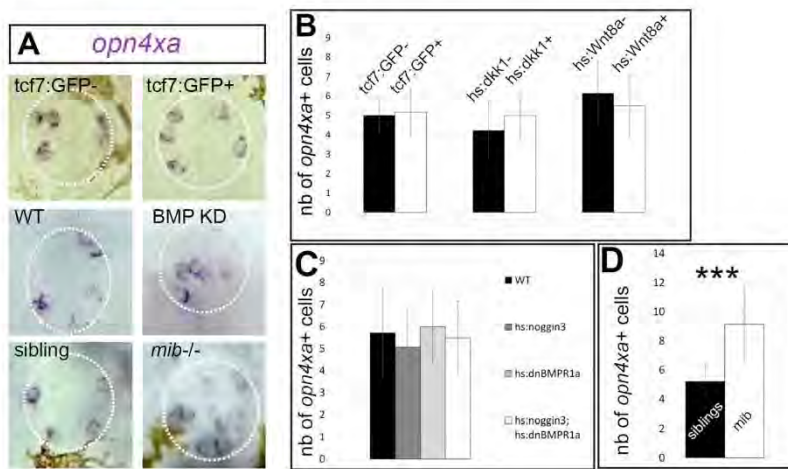
### 3. Discussion

In this paper, we describe a new population of cells in the zebrafish pineal gland. These cells express the green-blue photosensitive pigment *Opn4xa* and share developmental characteristics with classical, non-photosensitive projection neurons. Intriguingly, while classical PNs exhibit a LIGHT OFF response, a LIGHT ON response is observed in *opn4xa*+ PN upon illumination. These results suggest a previously unanticipated cellular diversity in the projection neuron population within the pineal gland. In the following section, we discuss the specification and potential function of the *opn4xa*+ PNs.

Projection neurons and photoreceptors of the pineal gland differ in their requirement for Notch and BMP signalling pathways: photoreceptors require BMP activation (while projection neurons do not) and BMP is in turn needed to activate the Notch pathway in these cells, which inhibits the projection neurons fate (Cau et al., 2008; Quillien et al., 2011). This led us to postulate that decoupling of the activation of BMP and Notch activity could represent an attractive mechanism to further diversify cell fates. Indeed, activation of the BMP signalling pathway without activation of Notch should lead to the generation of cells with a mixed photoreceptor/projection neuron identity (Cau and Blader, 2009). In contrast with this hypothesis, *opn4xa*+ cells, that exhibits both characteristics of photoreceptors and projection neurons, do not require BMP activity suggesting that they are more closely related to projection neurons than to classical photoreceptors. Similarly, Notch activity inhibits the production of both *opn4xa*- and *opn4xa*+ projection neurons to the same extent. Therefore, neither BMP nor Notch activities contribute to specifying *opn4xa*+ versus *opn4xa*- PN fates.

Since *opn4xa*+ and classical projection neurons show similar behaviour upon BMP or Notch loss of function, what are the signals that could specify these distinct identities? The Wnt effector *tcf7* is specifically expressed in *opn4xa*+ PN and so is the *Et(T2KHG)*<sup>ns8</sup> enhancer trap line at early stages. Nevertheless, *tcf7* mutants show a normal number of *opn4xa*+ pineal cells. Moreover, neither gain nor loss of Wnt activity affects the number of *opn4xa*+ cells, which suggests that Wnt activity is neither necessary nor sufficient for specification of *opn4xa*

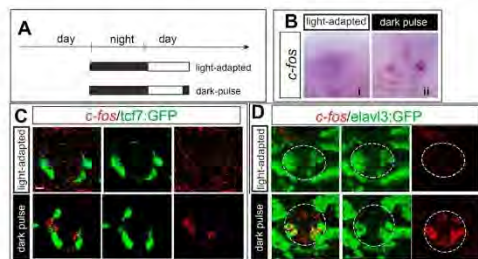




*GFP*<sup>w34</sup> transgene ( $n = 14$ ) after an heat shock at 14 hpf, were compared to siblings ( $n = 14$ ) at 48 hpf.

(C) Effect of a reduction in Notch activity: Control embryos ( $n = 30$ ) were compared to homozygous *mindbomb* (*mib*<sup>-/-</sup>;  $n = 7$ ) mutants at 48 hpf

(D) Effect of a reduced BMP signalling: Embryos transgenic for *Tg(hsp70:dnXla.Bmpr1a-GFP)*<sup>w30</sup> (*hs:dnBMPR1a*,  $n = 12$ ) or *Tg(hsp70:nog3)*<sup>tr14</sup> (*hs:noggin3*,  $n = 30$ ) or both ( $n = 18$ ) were compared to siblings ( $n = 7$ ). Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test,  $P = .44$ ; not significant.



**Fig. 3.** Identification of a population of *opn4xa*- PNs functioning in a LIGHT OFF mode:

(A) Experimental paradigm for the 'dark pulse versus light-adapted' comparison Embryos were light-adapted for three hours before being submitted to a 30 min dark pulse ('dark pulse') or maintained in the light ('light-adapted')

(B) Representative pictures of *c-fos* induction in the pineal organ after application of the light regimes described in A. i) light-adapted, ii) dark-pulse

(C-E) Induction of *c-fos* in the different light regimes in embryos carrying the *Et(T2KHG)*<sup>ms8</sup> ('*tcf7:GFP*', C) or the *Tg(elavl3:EGFP)*<sup>ms3</sup> ('*elavl3:EGFP*', D) transgenes (in green). Scale bars: 10  $\mu$ m. All embryos shown are 48 hpf. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

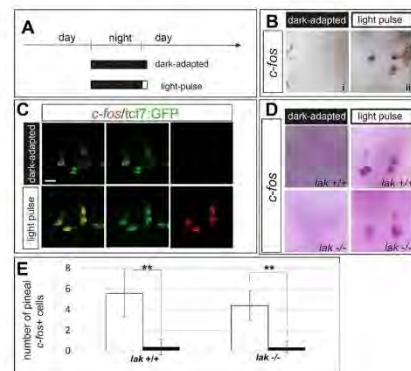
expression. It remains to be addressed whether *tcf7* (and/or Wnt signalling) is required to specify other aspects of the phenotype of these atypical PNs. Despite the absence of an observable function for *tcf7*, the *Et(T2KHG)*<sup>ms8</sup> enhancer trap line provides a useful marker for *opn4xa* + cells at early stages which will help us in analysing the projection pattern of these cells.

Our analysis confirms previous results obtained in another teleost, the rainbow trout, as well as in numerous other species showing that an important part of the projection neuron population function in a LIGHT OFF manner (Dodt, 1963; Falcón and Meissl, 1981; Meissl and Ueck, 1980; Morita, 1966; Morita and Dodt, 1965). Within the projection neuron population only *opn4xa* + PNs function in a LIGHT ON fashion. Given that this activity is only seen using blue and green light and not red light, it likely requires the function of *Opn4xa*, a photo-pigment with an absorbance peak at 470 nm (Davies et al., 2011). This result contrasts with the observation that a LIGHT ON (excitatory response) is observed at medium to long wavelengths in the rainbow trout (Morita,

**Fig. 2.** Effect of manipulating Notch, BMP and Wnt pathways on the *opn4xa* + fate

(A) Representative pictures of in situ hybridisations for *opn4xa* in the pineal organ upon BMP, Notch and Wnt modulation (as indicated) and their corresponding controls. (B-D) Average numbers of pineal *opn4xa* + positive cells upon manipulation of Wnt (B), BMP (C) or Notch signalling activity (D). Values indicated on the graphs are mean  $\pm$  SD (error bars). Two tailed Mann Whitney non parametric tests, were used for B and D. \* $P < .05$ ; \*\*\* $P < .001$ .

(B) Effect of gain or loss of Wnt activity on the number of pineal *opn4xa* + cells: Embryos from *Et(T2KHG)*<sup>ms8</sup> +/- increases were assessed for GFP fluorescence; countings were performed at 30hpf. The size of the GFP- and GFP+ populations ('*tcf7:GFP*-' and '*tcf7:GFP*+') were respectively  $n = 8$  and  $n = 31$ . Embryos carrying the *Tg(hsp70:dnXla.Bmpr1a-GFP)*<sup>w32</sup> transgene after a heat shock at 18 hpf, were compared with negative siblings at 48 hpf ( $n = 13$  for the '*hs:dnXla*-' and  $n = 11$  for the '*hs:dnXla*+'). Embryos carrying the *Tg(hsp70:wnt8-*



**Fig. 4.** *opn4xa* + PNs function in a LIGHT ON mode:

(A) Experimental paradigm for the 'light-pulse versus dark-adapted' comparison Embryos were dark-adapted for more than 14 hours and submitted to a 30 min light pulse ('light pulse') or maintained in the dark ('dark-adapted') before fixation.

(B) Representative pictures of *c-fos* induction in the pineal organ after application of the light regimes described in A. i) dark-adapted, ii) light-pulse

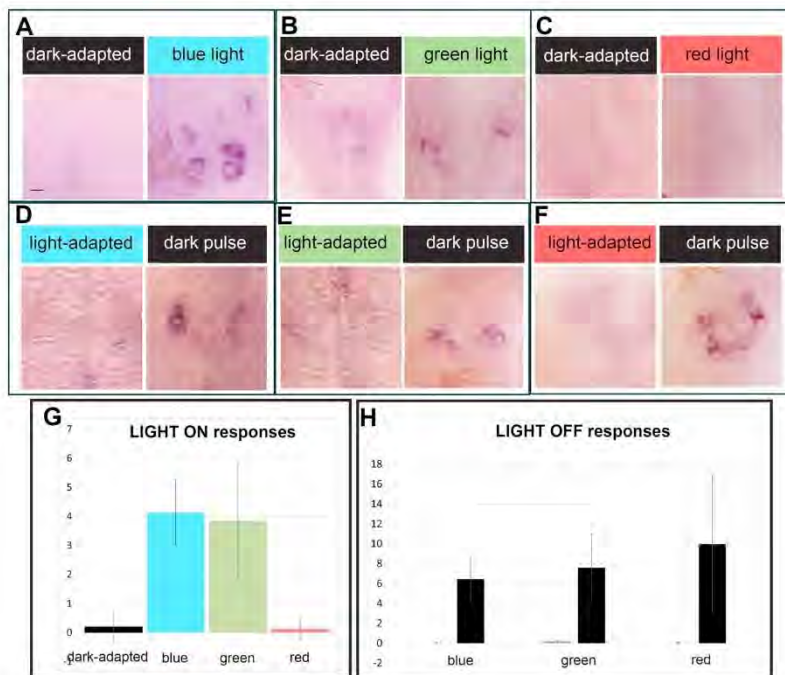
(C) Induction of *c-fos* in the different light regimes in embryos carrying the *Et(T2KHG)*<sup>ms8</sup> ('*tcf7:GFP*') transgene (in green). Scale bars: 10  $\mu$ m.

(D) Induction of *c-fos* upon a 30min light pulse in *lak* +/+ and *lak* -/- embryos.

(E) Quantification of the number of pineal *c-fos* + cells in light-pulsed (white bars) and dark-adapted (dark bars) *lak* +/+ and *lak* -/- embryos at 48 hpf. Two tailed Mann Whitney non parametric tests, were used \* $P < .05$ . Values are mean  $\pm$  SD,  $n = 5, 8, 10$  and  $6$ , respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

1966). A surprising degree of variation is indeed observed in the wavelengths triggering ON and OFF chromatic responses in different species. For instance, green light triggers the excitatory response in lizards and frogs while red light elicits this response in the pike. Similarly, the chromatic inhibitory response is stronger in the ultraviolet range in fish and frogs but mainly due to blue light in lizards (see Dodt and Meissl, (1982) for a review). It would be interesting to understand whether the LIGHT ON chromatic response observed in lizard, frog and





**Fig. 5.** Different spectral sensitivities for the LIGHT ON and the LIGHT OFF responses within the pineal gland:

(A-F) Representative pictures of *c-fos* induction in the pineal organ after application of light pulses in the blue, green or red range compared to dark adapted embryos (A-C) or after light adaptation with blue, green or red light followed by a dark pulse ('dark pulse') or maintained in the same lighting conditions ('light-adapted') (D-F)

(G, H) Quantification of the number of cells activating *c-fos* after a light pulse (G, LIGHT ON responses) or a dark pulse (H, LIGHT OFF responses). G) Numbers of embryos:  $n = 41, 8, 20, 16$  respectively

H) Numbers of embryos  $n = 10, 16, 5, 25, 21, 22$  respectively

Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pike require a direct photosensitivity from specific projection neurons. Alternatively, in these species, pineal photoreceptors could elicit a dual excitatory/inhibitory action on their targets similar to that described for retinal photoreceptors, which trigger a different response in bipolar cells depending on the type of glutamate receptor they express (Euler et al., 1996; Masu et al., 1995; de la Villa et al., 1995).

Are there other LIGHT ON projection neurons in the zebrafish pineal gland? Adaptation with white light allowed us to identify an average 8 LIGHT OFF PNs for around 3 LIGHT ON PNs. Since at 48 hpf the pineal gland contains 20 PNs, either some of the PN responses have not been identified or the LIGHT OFF cells do not systematically activate *c-fos* following a 30 min dark pulse, in the present testing conditions. It thus remains possible that there are other unidentified projection neurons that respond in a LIGHT ON fashion for instance in response to UV light.

While a complete description of the neurotransmitter/neuromodulator content of all zebrafish pineal neurons is lacking, glycinergic cells with a photoreceptor morphology have been observed in the pineal gland (Marquart et al., 2015; Moly et al., 2014). These observations suggest that at least a proportion of pineal photoreceptors exert an inhibitory action on projection neurons, therefore providing a possible mechanism for the LIGHT OFF response we describe. Alternatively, photoreceptors could constantly produce an excitatory neurotransmitter in the dark, which would be blocked by light leading to an interruption of projection neuron activity through a "disfacilitation mechanism" (Uchida et al., 1992). A more detailed analysis of the neurotransmitter/neuromodulator content of all pineal neurons, and *opn4xa* + PNs in particular, would be useful. Finally, the fact that the LIGHT OFF response is observed independently of the wavelength at which the embryos are adapted suggests that LIGHT OFF projection neurons receive inputs from several types of pineal photoreceptors.

Although direct photosensitivity of *opn4xa* + PNs remains to be confirmed, they share many characteristics with retinal ipRGCs raising intriguing questions regarding the functions of these pineal cells. Indeed, in mammals ipRGCs exhibit crucial roles during the control of circadian, wake/sleep rhythms as well as in mediating the direct effects of illumination on physiology and behaviour (see Lazzerini Ospri et al.

(2017); Lucas et al. (2012) for reviews)). In particular, ipRGCs transmit light information, via their own intrinsic photosensitivity as well as inputs from rod and cone PhRs, to the mammalian 'master clock' the suprachiasmatic nucleus (Hannibal and Fahrenkrug, 2004; Hattar et al., 2002, 2006). It is unclear whether a suprachiasmatic nucleus is present in the larval zebrafish and whether *opn4xa* + retinal or pineal cells project onto such a structure. On the other hand, the zebrafish pineal gland has long been thought to play a 'master clock' role owing to its direct photosensitivity, its capacity to generate intrinsic rhythms of melatonin synthesis/secretion and the fact that disrupting the function of the molecular clock in pineal PhRs affect circadian rhythms of locomotor activity (Ben-Moshe Livne et al., 2016; Bolliet et al., 1997; Cahill, 1996, 1997; Falcón et al., 1989). Could *opn4xa* + PNs play a role alongside classical pineal PhRs in the function of the circadian system? Analysis of an *opn4xa* mutant allele combined with retina-specific and/or pineal specific transgenic tools would help us understand whether *opn4xa* + PNs are important players in this field.

#### 4. Experimental procedures

##### 4.1. Zebrafish lines and developmental conditions

All animals were handled in the CBI fish facility, which is certified by the French Ministry of Agriculture (approval number A3155510). The project was approved by the French Ministry of Teaching and Research (agreement number APAFIS#3653-2,016,011,512,005,922).

Embryos were reared at 28 degrees in a 14 h Light/10 h Dark cycle and staged according to standard protocols. All the transgenic and mutant lines have been described previously: *Tg(aanat2:GFP)<sup>ns8</sup>* (Gothilf et al., 2002), *Tg(elavl3:EGFP)<sup>knv3</sup>* (Park et al., 2000), *Et(T2KHG)<sup>nms8</sup>* (Nagayoshi et al., 2008), *Tg(hsp70l:dkk1b-GFP)<sup>w32</sup>* and *Tg(hsp70l:wnt8-GFP)<sup>w34</sup>* (Stoick-Cooper et al., 2007), *Tg(hsp70l:dnXla.Rbpj-MYC)<sup>vu21</sup>* and *Tg(hsp70l:nog3)<sup>fr14</sup>* (Chocron et al., 2007), *mib<sup>ia52b</sup>* (Itoh et al., 2003), *lakritz* (Kay et al., 2001). Conditions of heat-shock were: *Tg(hsp70l:dnXla.Rbpj-MYC)<sup>vu21</sup>* and *Tg(hsp70l:nog3)<sup>fr14</sup>*: 30 min at 39.5 °C; *Tg(hsp70l:dkk1b-GFP)<sup>w32</sup>* and *Tg(hsp70l:wnt8-GFP)<sup>w34</sup>*: 1 h at 38 °C. The



protocol for genotyping *lakritz* embryos is available upon request.

#### 4.2. Application of different light regimes

To assess LIGHT ON responses, two different protocols were used. In the first protocol, the light was turned on at 9 am and the embryos fixed at 9.30 am. In the second one, the embryos were dark adapted for 2 h (from 9.30 to 11.30) before a 30 mn light pulse and a fixation at noon. We did not notice a difference in the responses between these two protocols. On the other hand, for the assessment of the LIGHT OFF responses, the embryos were light-adapted from 9 am to 12 noon after which light was turned off and the embryos were fixed 30 mns after. The comparison of adapted and pulsed embryos fixed at the same circadian time allowed us to conclude that the observed *c-fos* expression was caused by the pulse rather than by circadian rhythms.

Illumination with white light was performed using a regular neon lamp (80 lx). Illumination with blue, green and red light was performed in a MWP unit (Zantiks) equipped with standard blue, green and red LEDs. The characteristics of the light emitted from these LEDs is:

Blue light: 92 lx,  $\lambda_{\max}$  = 449 nm, half-band width: 25,4 nm  
 Green light: 109 lx,  $\lambda_{\max}$  = 512 nm, half-band width: 33,07 nm  
 Red light: 34 lx,  $\lambda_{\max}$  = 627 nm, half-band width: 21,67 nm

Scripts controlling the different light regimes are available upon request.

#### 4.3. Immunohistochemistry and in situ hybridisation

Immunohistochemistry and in situ hybridisation were performed as previously described and fluorescent in situ hybridisation were revealed using either Fast Red (Sigma) or the TSA Plus System (TSA-Fluorescein, Perkin Elmer; Cau et al., 2019). Immunohistochemistry against Tcf712 was performed as described in Hüsken et al. (2014) using an anti-Human TCF3,4 antibody (1:400, Biomol, clone O.T.148).

Probes used in this study were: *opn4xa* (Matos-Cruz et al., 2011), *c-fos* (Ellis et al., 2012), *lef1* and *tef7* (Veien et al., 2005).

#### 4.4. Cell counting and statistical analysis

Fluorescent cells were counted using the ImageJ software on confocal data sets with 2  $\mu$ m interval optical planes. Statistical tests and number of embryos used are stated in each figure and/or figure legend.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103468>.

#### CRedit authorship contribution statement

**Dora Sapède:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **Clair Chaigne:** Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Patrick Blader:** Conceptualization, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Elise Cau:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Supervision.

#### Acknowledgements

We thank S. Mazères for his help with the spectral analysis of LED light, R. Dorsky for providing the *Et(T2KHG)<sup>nms8</sup>*, *Tg(hsp70l:dkk1b-GFP)<sup>w32</sup>* and *Tg(hsp70:wnt8-GFP)<sup>w34</sup>* transgenic lines, and M. Halpern and K. Soanes for sharing probes. We are indebted to members of the Blader team for helpful discussions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Université de Toulouse III (UPS); Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; DEQ20131029166); Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC); Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); Association

Rétina France and the Ministère de la Recherche. We would like to thank Brice Ronsin, Stéphanie Bosch and the Toulouse RIO Imaging platform; as well as Stéphane Relexans, Aurore Laire and Richard Brimicombe for taking care of the fish.

#### Declaration of competing interest

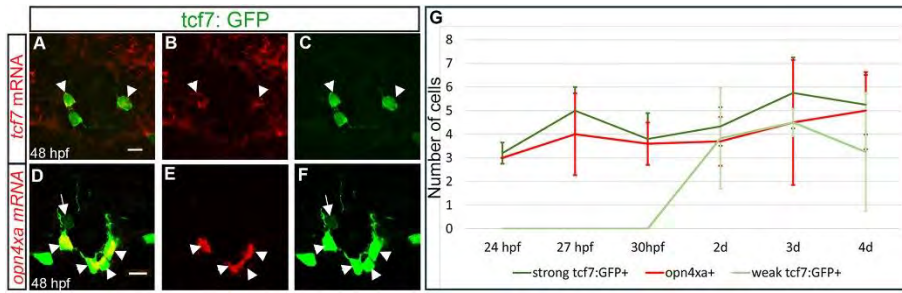
The authors declare that no competing interests exist.

#### References

- Ben-Moshe Livné, Z., Alon, S., Vallone, D., Bayleyen, Y., Tovín, A., Shainer, I., Nisembaum, L.G., Aviram, I., Smadja-Storz, S., Fuentes, M., et al., 2016. Genetically blocking the zebrafish pineal clock affects circadian behavior. *PLoS Genet.* 12, e1006445.
- Bolliet, V., Bégay, V., Taragnat, C., Ravault, J.P., Collin, J.P., Falcón, J., 1997. Photoreceptor cells of the pike pineal organ as cellular circadian oscillators. *Eur. J. Neurosci.* 9, 643–653.
- Cahill, G.M., 1996. Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* 708, 177–181.
- Cahill, G.M., 1997. Circadian melatonin rhythms in cultured zebrafish pineals are not affected by catecholamine receptor agonists. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 270–275.
- Cau, E., Blader, P., 2009. Notch activity in the nervous system: to switch or not switch? *Neural Dev.* 4, 36.
- Cau, E., Quillien, A., Blader, P., 2008. Notch resolves mixed neural identities in the zebrafish epiphysis. *Development* 135, 2391–2401.
- Cau, E., Ronsin, B., Bessièrè, L., Blader, P., 2019. A Notch-mediated, temporal asymmetry in BMP pathway activation promotes photoreceptor subtype diversification. *PLoS Biol.* 17, e2006250.
- Chocron, S., Verhoeven, M.C., Rentsch, F., Hammerschmidt, M., Bakkers, J., 2007. Zebrafish Bmp4 regulates left-right asymmetry at two distinct developmental time points. *Dev. Biol.* 305, 577–588.
- Clanton, J.A., Hope, K.D., Gamse, J.T., 2013. Fgf signaling governs cell fate in the zebrafish pineal complex. *Development* 140, 323–332.
- Davies, W.I.L., Zheng, L., Hughes, S., Tamai, T.K., Turton, M., Halford, S., Foster, R.G., Whitmore, D., Hankins, M.W., 2011. Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 4115–4132.
- Doty, E., 1963. Photosensitivity of the pineal organ in the teleost, *salmo irideus* (gibbons). *Experientia* 19, 642–643.
- Doty, E., Heerd, E., 1962. Mode of action of pineal nerve fibers in frogs. *J. Neurophysiol.* 25, 405–429.
- Doty, E., Meissl, H., 1982. The pineal and parietal organs of lower vertebrates. *Experientia* 38, 996–1000.
- Ellis, L.D., Seibert, J., Soanes, K.H., 2012. Distinct models of induced hyperactivity in zebrafish larvae. *Brain Res.* 1449, 46–59.
- Euler, T., Schneider, H., Wässle, H., 1996. Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J. Neurosci.* 16, 2934–2944.
- Falcón, J., Meissl, H., 1981. The photosensory function of the pineal organ of the pike (*Esox lucius* L.) correlation between structure and function. *J. Comp. Physiol. A.* 144, 127–137.
- Falcón, J., Marmillon, J.B., Claustrat, B., Collin, J.P., 1989. Regulation of melatonin secretion in a photoreceptive pineal organ: an in vitro study in the pike. *J. Neurosci.* 9, 1943–1950.
- Gandhi, A.V., Mosser, E.A., Oikonomou, G., Prober, D.A., 2015. Melatonin is required for the circadian regulation of sleep. *Neuron* 85, 1193–1199.
- Gothilf, Y., Toyama, R., Coon, S.L., Du, S.-J., Dawid, I.B., Klein, D.C., 2002. Pineal-specific expression of green fluorescent protein under the control of the serotonin-N-acetyltransferase gene regulatory regions in transgenic zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 225, 241–249.
- Guzowski, J.F., Timlin, J.A., Roysam, B., McNaughton, B.L., Worley, P.F., Barnes, C.A., 2005. Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 599–606.
- Hannibal, J., Fahrenkrug, J., 2004. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport* 15, 2317–2320.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., Yau, K.W., 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065–1070.
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., Berson, D.M., 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 497, 326–349.
- Hüsken, U., Stickney, H.L., Gestri, G., Bianco, I.H., Faro, A., Young, R.M., Roussigne, M., Hawkins, T.A., Beretta, C.A., Brinkmann, I., et al., 2014. Tcf712 is required for left-right asymmetric differentiation of habenular neurons. *Curr. Biol.* 24, 2217–2227.
- Itoh, M., Kim, C.-H., Palardy, G., Oda, T., Jiang, Y.-J., Maust, D., Yeo, S.-Y., Lorick, K., Wright, G.J., Ariza-McNaughton, L., et al., 2003. Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta. *Dev. Cell* 4, 67–82.
- Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W., Baier, H., 2001. Retinal ganglion cell genesis requires *lakritz*, a zebrafish atonal homolog. *Neuron* 30, 725–736.
- Koyanagi, M., Wada, S., Kawano-Yamashita, E., Hara, Y., Kuraku, S., Kosaka, S., Kawakami, K., Tamotsu, S., Tsukamoto, H., Shichida, Y., et al., 2015. Diversification of non-visual photopigment parainopsin in spectral sensitivity for diverse pineal functions. *BMC Biol.* 13, 73.

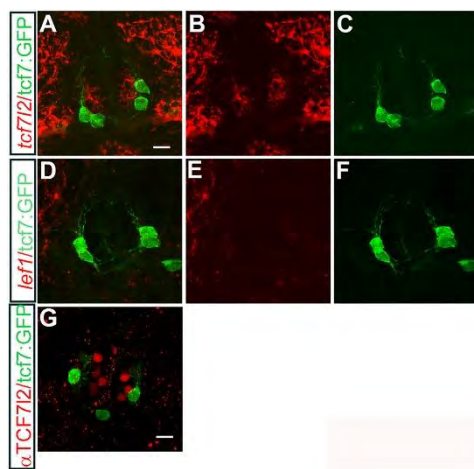


- Lazzerini Ospri, L., Prusky, G., Hattar, S., 2017. Mood, the circadian system, and melanopsin retinal ganglion cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 40, 539–556.
- Lucas, R.J., Lall, G.S., Allen, A.E., Brown, T.M., 2012. How rod, cone, and melanopsin photoreceptors come together to enlighten the mammalian circadian clock. *Prog. Brain Res.* 199, 1–18.
- Marquart, G.D., Tabor, K.M., Brown, M., Strykowski, J.L., Varshney, G.K., LaFave, M.C., Mueller, T., Burgess, S.M., Higashijima, S.-I., Burgess, H.A., 2015. A 3D searchable database of transgenic zebrafish Gal4 and Cre lines for functional neuroanatomy studies. *Front. Neural Circuits* 9, 78.
- Masu, M., Iwakabe, H., Tagawa, Y., Miyoshi, T., Yamashita, M., Fukuda, Y., Sasaki, H., Hiroi, K., Nakamura, Y., Shigemoto, R., 1995. Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80, 757–765.
- Matos-Cruz, V., Blasic, J., Nickle, B., Robinson, P.R., Hattar, S., Halpern, M.E., 2011. Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS One* 6, e25111.
- Meissl, H., Donley, C.S., 1980. Change of threshold after light-adaptation of the chromatic response of the frog's pineal organ (Stirnorgan). *Vis. Res.* 20, 379–383.
- Meissl, H., Ueck, M., 1980. Extraocular photoreception of the pineal gland of the aquatic turtle *Pseudemys scripta elegans*. *J. Comp. Physiol. A* 140, 173–179.
- Meissl, H., Nakamura, T., Thiele, G., 1986. Neural response mechanisms in the photoreceptive pineal organ of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 84, 467–473.
- Moly, P.K., Ikenaga, T., Kamihagi, C., Islam, A.F.M.T., Hatta, K., 2014. Identification of initially appearing glycine-immunoreactive neurons in the embryonic zebrafish brain. *Dev. Neurobiol.* 74, 616–632.
- Morita, Y., 1966. Lead pattern of the pineal neuron of the rainbow trout (*Salmo irideus*) by illumination of the diencephalon. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* 289, 155–167.
- Morita, Y., Dodt, E., 1965. Nervous activity of the frog's epiphysis cerebri in relation to illumination. *Experientia* 21, 221–222.
- Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., Kawakami, K., 2008. Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn*-like. *Development* 135, 159–169.
- Park, H.C., Kim, C.H., Bae, Y.K., Yeo, S.Y., Kim, S.H., Hong, S.K., Shin, J., Yoo, K.W., Hibi, M., Hirano, T., et al., 2000. Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev. Biol.* 227, 279–293.
- Quillien, A., Blanco-Sanchez, B., Halluin, C., Moore, J.C., Lawson, N.D., Blader, P., Cau, E., 2011. BMP signaling orchestrates photoreceptor specification in the zebrafish pineal gland in collaboration with notch. *Development* 138, 2293–2302.
- 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.
- Sapède, D., Cau, E., 2013. The pineal gland from development to function. *Curr. Top. Dev. Biol.* 106, 171–215.
- Shainer, I., Buchshtab, A., Hawkins, T.A., Wilson, S.W., Cone, R.D., Gothilf, Y., 2017. Novel hypophysiotropic AgRP2 neurons and pineal cells revealed by BAC transgenesis in zebrafish. *Sci. Rep.* 7, 44777.
- Shainer, I., Michel, M., Marquart, G.D., Bhandiwad, A.A., Zmora, N., Ben-Moshe Livne, Z., Zohar, Y., Hazak, A., Mazon, Y., Förster, D., et al., 2019. Agouti-related protein 2 is a new player in the teleost stress response system. *Curr. Biol.* 29, 2009–2019.e7.
- Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Riehle, K.J., Hubbert, C., Major, M.B., Fausto, N., Moon, R.T., 2007. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134, 479–489.
- Uchida, K., Nakamura, T., Morita, Y., 1992. Signal transmission from pineal photoreceptors to luminosity-type ganglion cells in the lamprey, *Lampetra japonica*. *Neuroscience* 47, 241–247.
- Veien, E.S., Grierson, M.J., Saund, R.S., Dorsky, R.I., 2005. Expression pattern of zebrafish *tcf7* suggests unexplored domains of Wnt/beta-catenin activity. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 233–239.
- de la Villa, P., Kurahashi, T., Kaneko, A., 1995. L-glutamate-induced responses and cGMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J. Neurosci.* 15, 3571–3582.
- Wada, S., Shen, B., Kawano-Yamashita, E., Nagata, T., Hibi, M., Tamotsu, S., Koyanagi, M., Terakita, A., 2018. Color opponency with a single kind of bistable opsin in the zebrafish pineal organ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 11310–11315.
- Wilson, S.W., Easter, S.S., 1991. Stereotyped pathway selection by growth cones of early epiphysial neurons in the embryonic zebrafish. *Development* 112, 723–746.



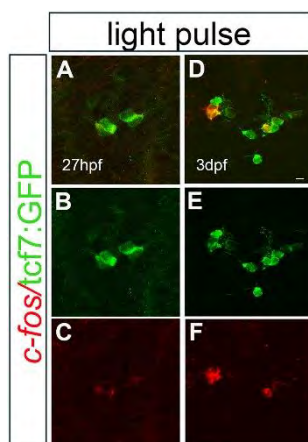
**Supplemental Fig. 1. Characterisation of the expression driven by the *Et(T2KHG)<sup>nns8</sup>* ('tcf7:GFP') enhancer trap in the pineal gland**

(A-F) Comparison of *tcf7* (A-C) or *opn4xa* (D-F) expression (in red, in situ hybridisation) with GFP expression from the *Et(T2KHG)<sup>nns8</sup>* ('tcf7:GFP') transgene (in green, immunohistochemistry). White arrowheads highlight co-expressing cells. White arrow show a weak *tcf7:GFP+* *opn4xa* – cell. Scale bars: 10  $\mu$ m. (G) Comparison of the number of cells expressing *tcf7:GFP* strongly or weakly and *opn4xa*. Means  $\pm$  S.D. are shown.



**Supplemental Fig. 2. Comparison of the expression of *tcf712* and *lef1* with the *Et(T2KHG)<sup>nns8</sup>* ('tcf7:GFP') enhancer trap in the pineal gland**

(A-F) Expression of two other TCF encoding genes: *tcf712* (A-C) or *lef1* (D-F) (in red, in situ hybridisation) with expression from the *Et(T2KHG)<sup>nns8</sup>* ('tcf7:GFP') transgene (in green, immunohistochemistry). (G) Double immunostaining with anti-GFP (green) and anti-TCF712 (red) in pineal neurons. Anterior is up. All embryos are 48 hpf. Scale bars: 10  $\mu$ m.



**Supplemental Fig. 3. Induction of *c-fos* expression following a light pulse in the pineal gland at 27 hpf and 3 dpf.**

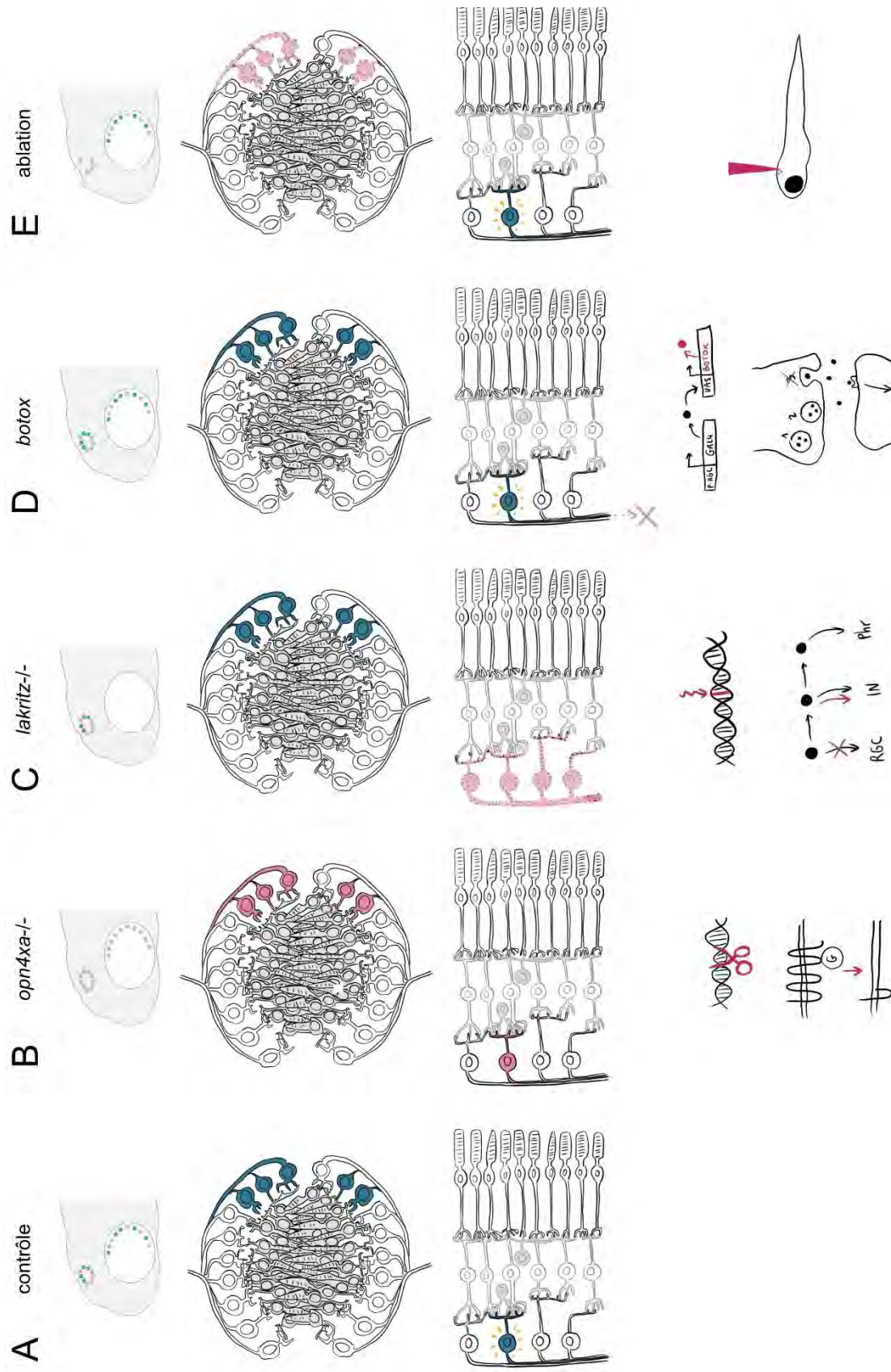
Expression of *c-fos* (in red, in situ hybridisation) compared with expression from the *Et(T2KHG)<sup>nns8</sup>* ('tcf7:GFP') transgene (in green, immunohistochemistry) at 27hpf (A-C) and 3dpf (D-F). Scale bars: 10  $\mu$ m.



## II. A la recherche de la fonction de la mélanopsine *opn4xa* et des cellules qui l'expriment

Au vu de l'abondante littérature ayant montré un rôle des cellules exprimant la mélanopsine dans le contrôle circadien chez la souris, nous nous sommes demandé.e.s si les cellules *opn4xa* et/ou le gène *opn4xa* étaient impliqué.e.s dans la régulation des rythmes circadiens par la lumière chez la larve de poisson zèbre. Nous avons commencé par valider les outils génétiques et techniques utilisés pour répondre à cette problématique (Résultats complémentaires partie 1), puis à l'aide de ces outils nous avons étudié le rôle des cellules ganglionnaires (*opn4xa+* et *opn4xa-*) de la rétine et de mélanopsine *opn4xa*, exprimée dans la rétine et dans la glande pinéale, dans la régulation des rythmes circadiens de l'activité locomotrice par la lumière (Chaigne *et al.*, en préparation). En parallèle, nous avons également étudié le rôle de la mélanopsine *opn4xa* dans la régulation des rythmes circadiens au niveau moléculaire, tenté de mettre au point l'utilisation d'une nouvelle machine de comportement, tenté de mettre au point un protocole nous permettant de tester les capacités de photoentrainement avec différentes longueurs d'onde, et enfin étudié le rôle des cellules ganglionnaires et de la mélanopsine *opn4xa* lors de la réponse locomotrice à une transition lumineuse (Résultats complémentaires partie 2).





**Figure 1 : Présentation des différents modèles testés pour étudier le rôle de la mélanopsine *opn4xa* et des cellules qui l' expriment**

**A.** Situation contrôle : *opn4xa* est exprimé dans quelques neurones de la glande pinéale et certains RGCs (en bleu). *opn4xa* (en rose) ne sont plus photosensibles (en rose). La mutation générée par CRISPR/Cas9 induit un codon stop prématuré qui résulte en une protéine prédictée tronquée. **C.** Dans le mutant *lakritz*, les cellules *opn4xa* de la glande pinéale ne sont pas affectées, et tous les RGCs sont affectés. Cette mutation induite par l' ENU empêche la différenciation des progéniteurs en RGCs qui se différencient ensuite en interneurons (IN) puis en photorécepteurs (Phr). **D.** Dans le modèle *botox*, les cellules *opn4xa* de la glande pinéale ne sont pas affectées, et la neurotransmission de tous les RGCs est bloquée. Ce modèle utilise le système UAS/GAL4 : une séquence régulatrice spécifique des RGCs (p.RGC) est utilisée pour exprimer GAL4 dans les RGCs. La protéine GAL4 se fixe sur la séquence UAS et permet l' expression du botox, qui inhibe la fusion des vésicules contenant les neurotransmetteurs avec la membrane plasmique et bloque donc toute neurotransmission. **E.** Dans le modèle d' ablation, les cellules *opn4xa* de la glande pinéale sont détruites (en rose), et la rétine n' est pas affectée. L' ablation est faite par ablation au microscope biphoton.

## A. Résultats complémentaires partie 1

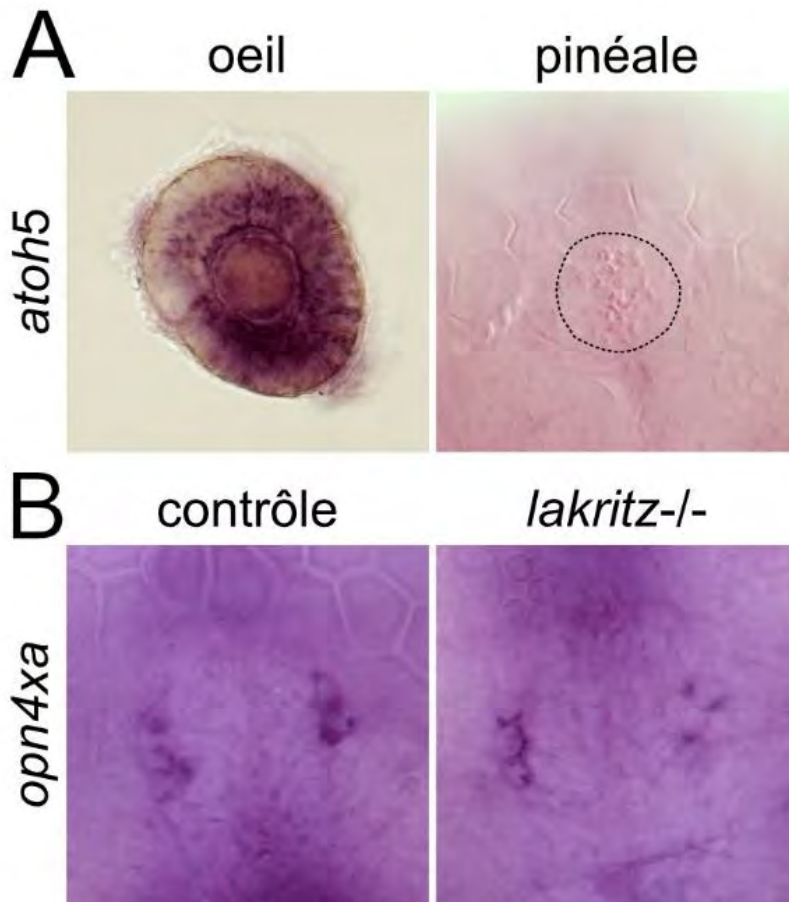
### 1. Validation d'outils génétiques pour étudier la fonction du gène *opn4xa* et des cellules qui l'expriment

Le mutant *opn4xa* permet d'analyser la fonction de la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa+* de la glande pinéale et de la rétine, mais sans distinguer une fonction de cette photosensibilité des cellules de la glande pinéale de celles de la rétine. D'autre part, à l'intérieur de chaque structure (glande pinéale ou rétine), les cellules *opn4xa+* peuvent intégrer l'information lumineuse provenant des photorécepteurs classiques en plus de celle leur provenant de leur propre photosensibilité. Une perte des cellules *opn4xa+* ou de leur transmission synaptique pourrait donc conduire à un phénotype plus important et plus facilement détectable qu'une seule perte de leur photosensibilité. Par exemple chez la souris, la mutation de la mélanopsine *opn4* et la perte des cellules *opn4+* ou la perte de leur neurotransmission conduit à des phénotypes différents : phase shift diminué dans un cas et complète absence de photoentrainement dans l'autre. C'est pourquoi nous avons souhaité valider et développer des outils qui nous permettraient de distinguer un rôle des cellules *opn4xa+* de la rétine et de la glande pinéale, ainsi que d'étudier le rôle de ces cellules et non pas de leur seule photosensibilité intrinsèque (Fig 1).

#### a) La mutation *lakritz* n'affecte pas les cellules *opn4xa+* de la glande pinéale

N'ayant pas d'outils génétiques qui affecteraient spécifiquement le développement des cellules *opn4xa+* de la rétine, nous avons utilisé le mutant *lakritz* dans lequel le développement de toutes les cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs) est affecté du fait d'une mutation dans le gène *atoh5* (Kay et al., 2001, Fig 1.B). Puisque chez le poisson zèbre les mutations affectant le développement de l'œil affectent souvent le développement de la glande pinéale, nous avons vérifié que la glande pinéale n'était pas affectée dans les larves *lakritz*. Nous avons confirmé par hybridation *in situ* que dans des embryons contrôles, le gène *atoh5* est exprimé dans l'œil mais pas dans la glande pinéale à 22hpf (« heures post fertilization » pour heures après fécondation) et 3dpf (« days post fertilization » pour jours après fécondation) (Fig 2.A). De plus, nous observons toujours la présence de cellules *opn4xa+* dans la glande pinéale des larves *lakritz* (Fig 2.B). Ces cellules semblent toujours être photosensibles puisqu'un marquage *cfos* est toujours observé après un pulse de lumière de 30min dans la glande pinéale de larves *lakritz* (Sapède et al., 2020). Aucun marquage *opn4xa*





**Figure 2 : *atoh5*, un gène exprimé dans l'œil mais pas dans la glande pinéale, est muté dans le mutant *lakritz* et n'affecte pas les cellules *opn4xa* de la glande pinéale**

**A.** Hybridation *in situ* du gène *atoh5*. Vue latérale d'un œil (objectif 20x) et vue dorsale d'une glande pinéale (délimitée en pointillés, objectif 40x) à 3dpf. **B.** Hybridation *in situ* du gène *opn4xa*.

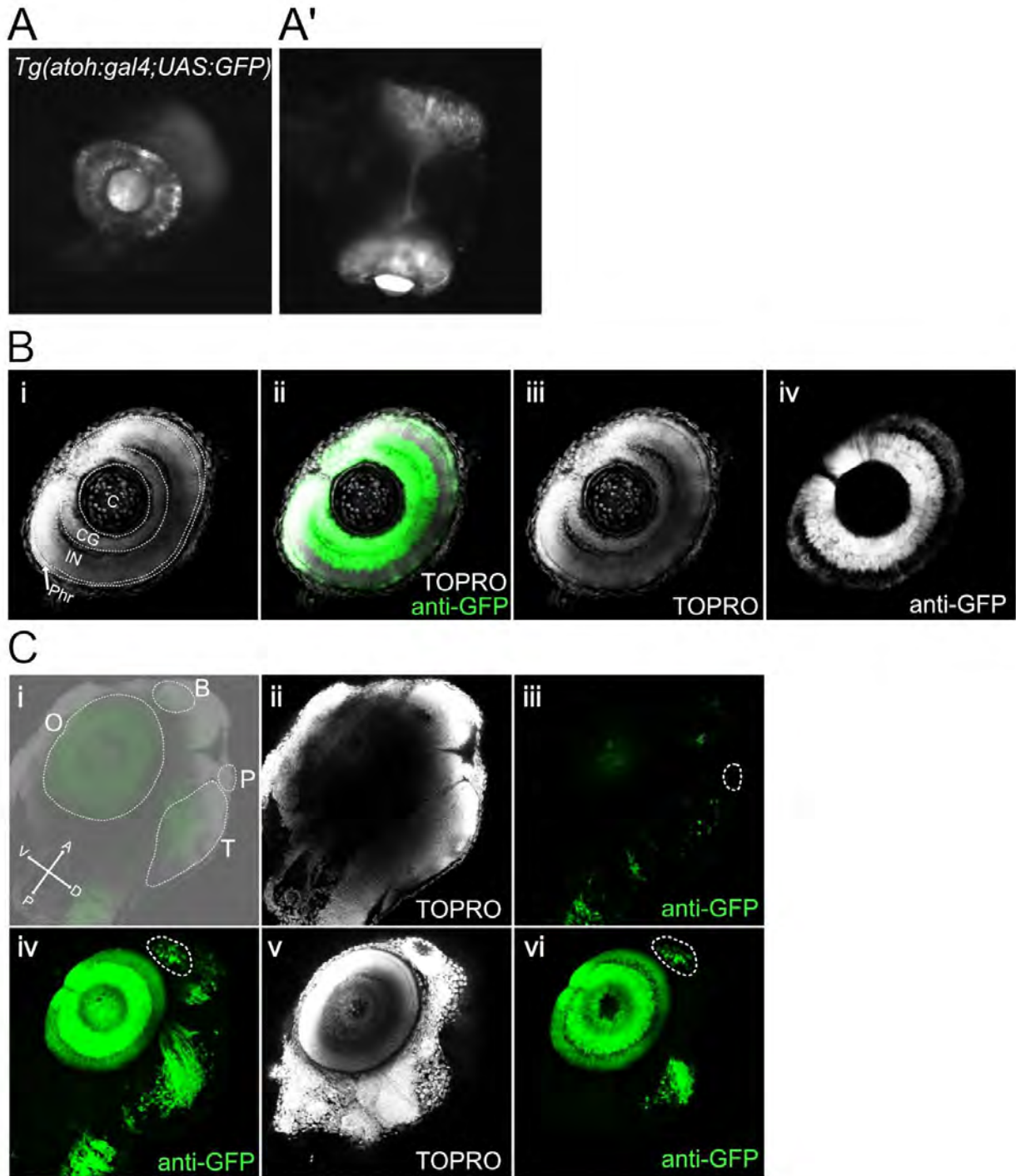
n'est observé dans la rétine des larves *lakritz*, confirmant que les RGCs *opn4xa+* ne se développent pas dans ces larves.

Les cellules *opn4xa+* de la glande pinéale ne sont donc pas affectées dans les larves *lakritz*. Nous avons ainsi choisi ce mutant pour étudier la fonction des cellules ganglionnaires de la rétine (*opn4xa+* et *opn4xa-*) et plus globalement le rôle d'une transmission synaptique extra-rétinienne dans la régulation des rythmes circadiens par la lumière.

b) La vision des larves larves *Tg(atoh:gal4;UAS:BoTxBLC-GFP)* n'est pas complètement abolie

En parallèle du mutant *lakritz*, nous avons souhaité utiliser un outil complémentaire pour adresser la fonction des RGCs et de leur transmission synaptique extra-rétinienne. Nous avons pour cela choisi d'utiliser le système GAL4/UAS, dans lequel le facteur de transcription GAL4 se fixe sur la séquence UAS (Upstream Activating Sequence) pour activer la transcription du gène en aval de l'UAS. Grâce à la lignée *Tg(atoh7:gal4s1992t)* (Bene et al., 2010), nous pouvons ainsi exprimer dans les RGCs une version optimisée de la chaîne légère de la toxine botulique via le transgène *Tg(UAS:BoTxBLC-GFP)* (Sternberg et al., 2016, Fig 1.D). Cette toxine bloque l'exocytose des vésicules synaptiques et empêche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique et toute neurotransmission provenant des cellules qui l'expriment. Le poisson transgénique *Tg(atoh7:gal4s1992t;UAS:BoTxBLC-GFP)* devrait donc permettre d'adresser le rôle de la transmission synaptique provenant de la rétine, puisque les seules cellules de la rétine capable de neurotransmission extra-rétinienne sont à priori les RGCs. A la différence du mutant *lakritz*, la rétine ne devrait cependant pas présenter de défaut de développement et les RGCs devraient toujours être présents.

Avant d'utiliser cet outil, nous avons caractérisé l'expression de la GFP dans des poissons *Tg(atoh7:gal4s1992t;UAS:GFP)* pour confirmer que le transgène *Tg(atoh7:gal4s1992t)* génère une expression dans les RGCs et pas dans d'autres structures possiblement en lien avec l'activité locomotrice ou la régulation des rythmes circadiens, comme la glande pinéale. La GFP native, imagée in vivo à 3dpf au microscope, est observée dans les RGCs et leurs axones, mais son expression ne semble pas limitée à la couche des RGCs (Fig 3.A). En effet avec une meilleure résolution grâce au microscope confocal, le marquage anti-GFP peut être visualisé dans les trois couches de la rétine (Fig 3.B). Le marquage anti-GFP



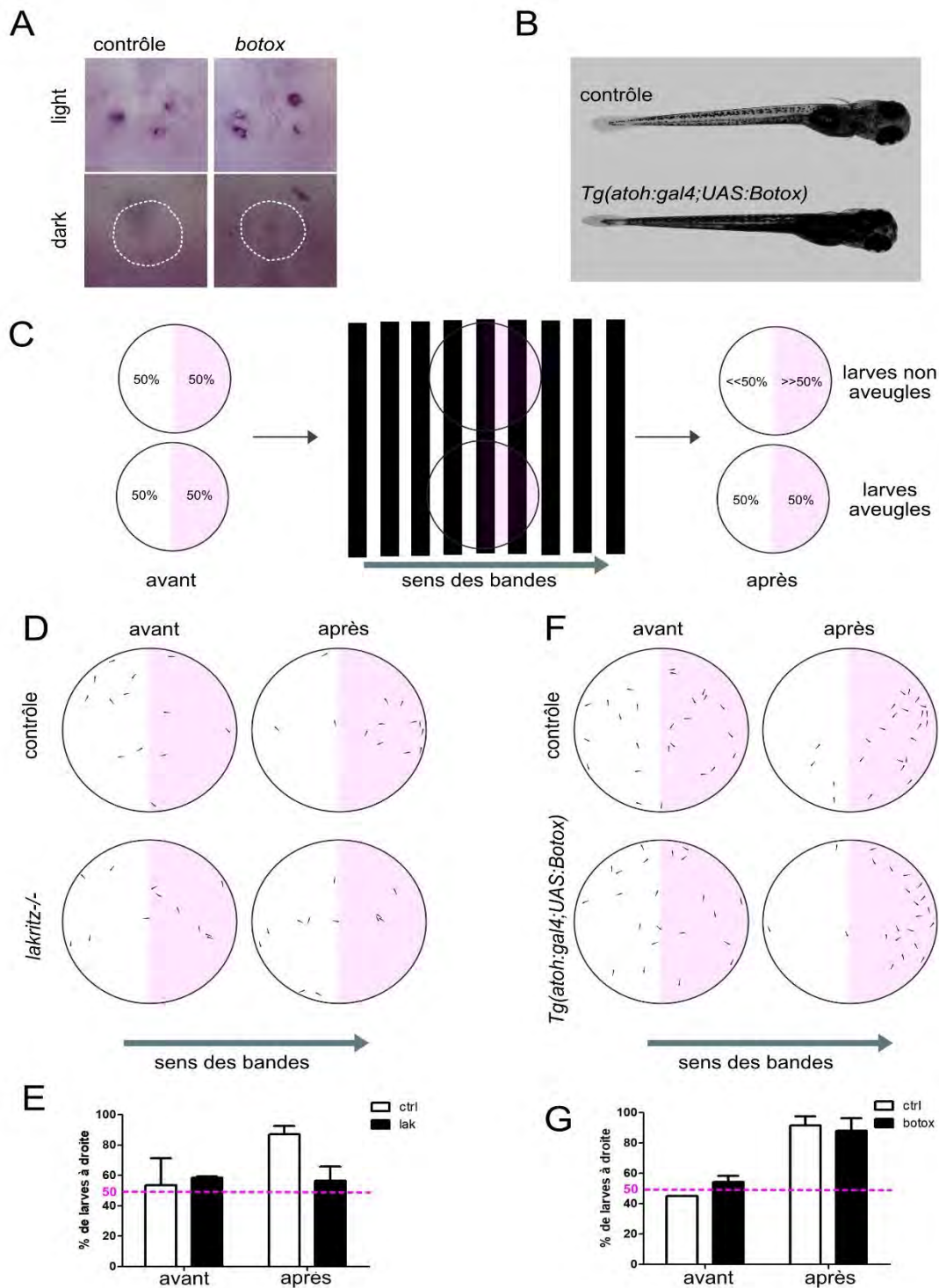
**Figure 3 : Caractérisation du pattern d'expression de la GFP exprimée à partir du transgène *Tg(atoh5:gal4s1992t)***

**A.** Vue latérale (**A**) et dorsale (**A'**) de la tête d'une larve à 3dpf au microscope, antérieur à droite. La GFP est bien exprimée dans l'œil ainsi que dans les projections des cellules ganglionnaires de la rétine. (**B-C**) vue latérale gauche à 2dpf après immuno-histochimie anti-GFP et marquage TOPRO au microscope confocal, antérieur vers le haut, postérieur vers le bas. **B.** Expression de la GFP dans l'œil au confocal (somme de 64 plans) **i**) représentation schématique des différentes structures de l'œil et couches de la rétine : cristallin (C), cellules ganglionnaires (CG), interneurones (IN), photorécepteurs (Phr). **ii**) merge du signal GFP et TOPRO. **iii**) signal TOPRO. **iv**) signal GFP. **C.** Expression de la GFP dans la tête **i**) représentation schématique des différentes structures de la tête : bulbe olfactif (B), œil (O), glande pinéale (P), tectum optique (T). (**ii-iii**) projection maximale de 9 plans du signal TOPRO (**ii**) et GFP (**iii**). La glande pinéale est délimitée par des pointillés. **iv**) projection maximale de 64 plans du signal GFP. (**v-vi**) projection maximale de 12 plans du signal TOPRO (**v**) et GFP(**vi**). Le bulbe olfactif est délimité par des pointillés.

est également retrouvé dans plusieurs structures extra-rétiniennes, dont les projections axonales des RGCs vers le tectum optique, mais aussi dans certaines cellules du bulbe olfactif et du tectum optique (Fig 3.C). Cependant aucun marquage n'est observé dans la glande pinéale et ce pattern d'expression est similaire à 2dpf, 3dpf et 7dpf.

Ainsi le transgène *Tg(ato7:gal4s1992t)* permet de produire une expression dans les RGCs. L'expression induite dans les autres couches de la rétine n'est pas problématique dans notre cas, puisqu'abolir la neurotransmission des RGCs revient normalement à abolir toute neurotransmission provenant de la rétine et de ses différents types cellulaires. De plus, ce transgène ne génère pas d'expression dans la glande pinéale, ce qui pourrait permettre de différencier un rôle de la rétine d'un rôle de la glande pinéale. Cependant il semble conduire à une expression dans plusieurs structures extra-rétiniennes, et les résultats obtenus avec des larves *Tg(ato7:gal4s1992t ;UAS:BoTxBLC-GFP)* devront être pris avec précaution.

Après avoir caractérisé l'expression de la GFP dans la lignée *Tg(ato7:gal4s1992t ;UAS:GFP)*, nous avons procédé à une caractérisation phénotypique de la lignée *Tg(ato7:gal4s1992t ;UAS:BoTxBLC-GFP)* (larves *botox*) pour valider l'utilisation de cet outil dans l'étude de la fonction des RGCs, mais aussi à moyen terme l'utilisation du système *Tg(promoteur:gal4;UAS:BoTxBLC-GFP)* pour bloquer la transmission synaptique d'autres cellules cibles. Après un pulse de 30min de lumière, nous pouvons distinguer un marquage *cfos* dans la glande pinéale des larves *botox*, ce qui suggère que les cellules *opn4xa+* de la glande pinéale sont toujours présentes (Fig 4.A). Les larves *botox*, tout comme les larves *lakritz*, présentent un aspect plus noir que les larves contrôles à partir de 3-4dpf (Fig 4.B). Cette différence de pigmentation est due à la non agrégation des mélanosomes en réponse à une lumière ou à un fond blanc en lien avec l'absence de photoréception provenant de la rétine (Kay et al., 2001; Shiraki et al., 2010). Afin de confirmer que les larves *botox* sont bien aveugles, nous avons procédé à un test de vision appelé test optomoteur (Hörnberg et al., 2013). Dans ce test, les larves sont placées dans une boîte de pétri disposée sur un écran d'ordinateur mis à l'horizontale. Cet écran permet d'afficher un stimulus visuel composé d'alternances de bandes noires et blanches verticales en mouvement. Les larves de poisson zèbre non aveugles suivent ce stimulus et s'accumulent dans la partie de la boîte de pétri correspondante à la direction du stimulus (Fig 4.C). Ainsi avant le stimulus, environ la moitié des larves contrôles sont dans la partie droite de la boîte de pétri (correspondante à la direction du stimulus) tandis qu'après le stimulus 90% des larves se placent dans cette même



**Figure 4 : caractérisation phénotypique de la lignée *Tg(ato5:gal4s1992t ;UAS:BoTxBLC-GFP)* (larves botox)**

**A.** Induction de *cfos* suite à pulse de 30min de lumière à 2dpf dans la glande pinéale de larves contrôles et *botox*. **B.** Aspect global des larves contrôles et *botox* (macroscopie, 4dpf). **C.** Représentation schématique du test optomoteur. En rose est représentée la zone considérée comme la zone droite. **(D-F)** Les larves contrôles et *lakritz*<sup>-/-</sup> ou *botox* ont été séparées sur la base de leur pigmentation. **D.** Schématisation de la position des larves contrôles et *lakritz*<sup>-/-</sup> avant et après le test optomoteur dans la boîte de pétri lors d'une expérience représentative. **E.** Quantification de la réponse au test optomoteur des larves contrôles et *lakritz*<sup>-/-</sup> (2 expériences, avec 13 ctrl et 12 *lakritz*<sup>-/-</sup> puis 12 ctrl et 12 *lakritz*<sup>-/-</sup>). **F.** Schématisation de la position des larves contrôles et *botox* avant et après le test optomoteur dans la boîte de pétri lors d'une expérience représentative **G.** Quantification de la réponse au test optomoteur des larves contrôles et *botox* (3 expériences avec 20 ctrl et *botox* puis 20 ctrl et *botox* puis 24 ctrl et *botox*).

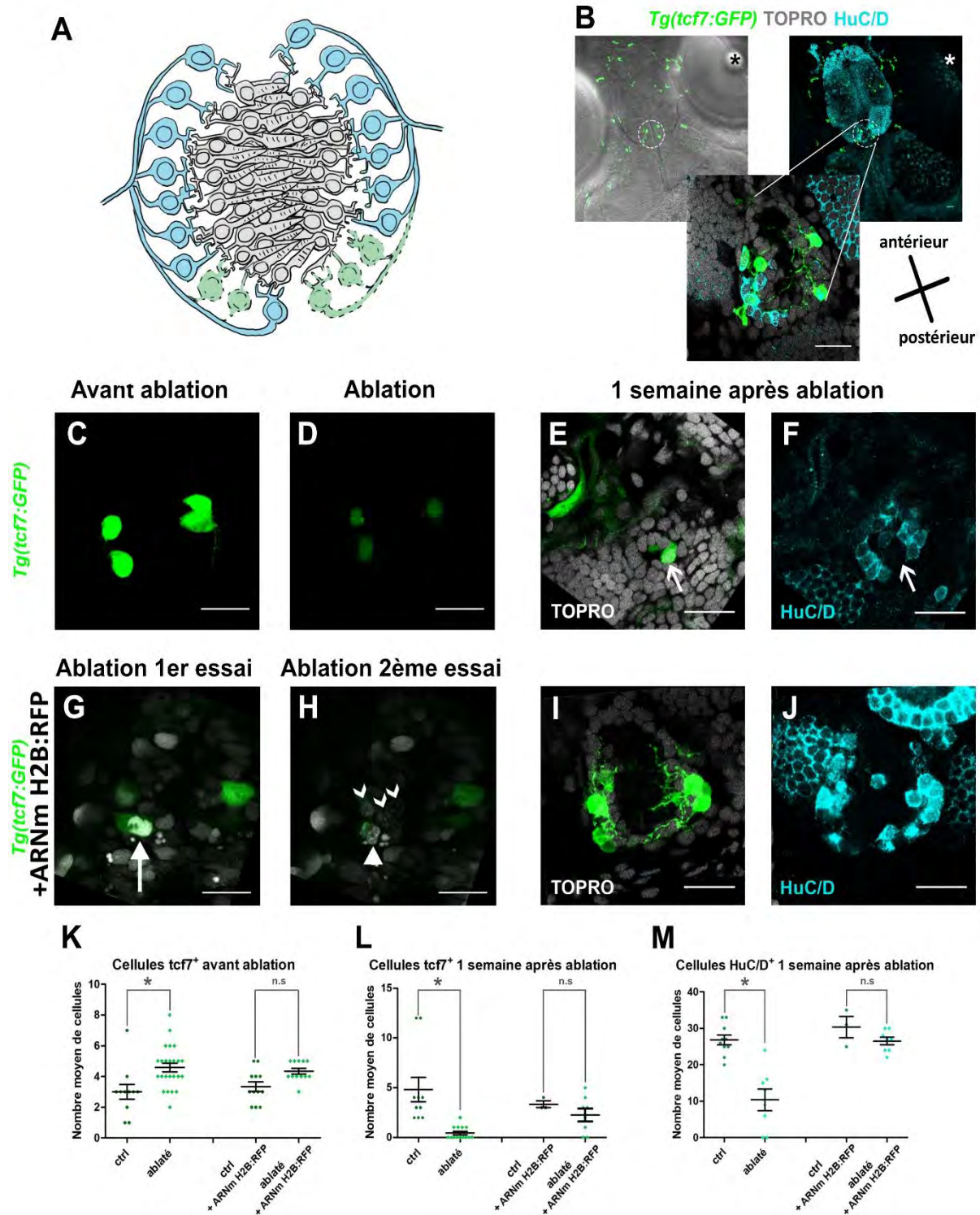
partie (Fig 4.(D-G)). Les larves aveugles, comme les larves *lakritz*, ne répondent pas à ce stimulus visuel et la moitié des larves se placent dans la partie droite de la boîte aussi bien avant qu'après le stimulus (Fig 4.D-F). Les larves *botox* ont quant à elles une réponse similaire au stimulus à celle des larves contrôles (Fig 4.E-G). Il se peut donc que certaines RGCs soient fonctionnelles dans les yeux des larves *botox* et que cela soit suffisant pour médier des réponses locomotrices visuelles.

Bien qu'elles présentent des défauts d'agrégation de leur pigment, une réponse connue pour être dépendante de l'œil, les larves *botox* répondent au test optomoteur et ne sont donc pas complètement aveugles. C'est pourquoi cet outil ne nous semble pas constituer un modèle adéquat pour étudier le rôle des cellules ganglionnaires de la rétine (*opn4xa+* et *opn4xa-*) et nous ne l'avons pas utilisé par la suite.

c) Les cellules *opn4xa+* de la glande pinéale régénèrent après ablation au microscope biphoton

En parallèle de la recherche d'un modèle permettant d'étudier le rôle des cellules *opn4xa+* de la rétine, nous avons voulu mettre au point un outil nous permettant d'étudier la fonction des cellules *opn4xa+* de la glande pinéale. Au vue du faible nombre de cellules *opn4xa+* dans la glande pinéale (4-5 cellules en moyenne) et de l'existence d'une lignée transgénique permettant de visualiser ces cellules, une stratégie intéressante était de procéder à l'ablation des cellules *opn4xa+* de la glande pinéale au microscope biphoton (Fig 1.E). La lignée utilisée pour visualiser les cellules *opn4xa+* de la glande pinéale était la lignée *Tg(tcf7 :gfp)*. Cette lignée constitue un rapporteur de l'expression du facteur de transcription *tcf7* dans laquelle l'expression de la GFP dans la glande pinéale corrèle avec l'expression d'*opn4xa* jusqu'à environ 30hpf. Après ce stade apparaissent d'autres cellules, en général faiblement marquées, qui n'expriment pas *opn4xa* (Sapède et al., 2020). Nous avons effectué l'ablation à 27hpf, stade auquel 4-5 cellules expriment *opn4xa* (ce nombre n'augmente pas ensuite en conditions normales) puis fixé les larves à 8dpf pour vérifier la bonne ablation des cellules *Tg(tcf7 :gfp)+* par un marquage anti-GFP. Nous avons également vérifié le bon état de la glande pinéale par un marquage anti-HuC/D (marqueur des neurones) et TOPRO (marquage des noyaux) pour détecter une éventuelle ablation « *off target* » (situation contrôle Fig 5.A-B). En effet la technique utilisée étant une thermoablation, la chaleur peut se propager entre les cellules et créer des dommages collatéraux sur des cellules *Tg(tcf7 :gfp)-*.





**Figure 5 : Les cellules *Tg(tcf7:gfp)*<sup>+</sup> régénèrent après une ablation à 27 heures.**

**A.** Schéma de la glande pinéale d'une larve de poisson zèbre : en gris sont représentés les photorécepteurs classiques, en bleu les neurones de projection *opn4xa-* et en vert les neurones de projection *opn4xa+*. **B.** condition contrôle : vue dorsale d'une larve *Tg(tcf7:gfp)* au 10<sup>ème</sup> jour de développement, marquage HuC/D (neurones) et ToPro (noyaux). Cette lignée permet de visualiser les photorécepteurs atypiques de la glande pinéale (en pointillés et grossissement). L'étoile indique un œil. **C, D.** Sans guide la bonne ablation des cellules est appréciée par la disparition du signal GFP. **E, F.** 1 semaine après ablation, les larves sans guide présentent une glande pinéale de petite taille (une cellule *Tg(tcf7:gfp)*<sup>+</sup> HuC/D- est marquée avec une flèche). **G, H.** Le guide permet de distinguer une simple perte de la fluorescence de la GFP (G, flèche) d'une vraie ablation (H, flèche, même cellule après le second essai d'ablation) grâce à l'aspect du noyau, ainsi que de repérer les éventuels dommages collatéraux (têtes de flèches). **I, J.** Avec guide, les cellules *Tg(tcf7:gfp)*<sup>+</sup> régénèrent (I) et la glande pinéale n'est pas endommagée (J). (C-J) échelle = 20µm, vues dorsales avec le pôle antérieur vers le haut. **K, L.** Nombre de cellules *Tg(tcf7:gfp)*<sup>+</sup> avant (K) et une semaine après ablation (L) chez les individus contrôles ou ablatés, avec ou sans injection de l'ARNm *H2B:RFP*. **M.** Nombre de cellules HuC/D<sup>+</sup> une semaine après ablation.

L'ablation avec ce protocole expérimental était difficile : plusieurs « *pulses* » de laser étaient nécessaires et ne permettaient parfois pas d'éliminer la cellule. Sans guide, le seul critère disponible est la disparition du signal GFP à la fin de l'expérience d'ablation (Fig 5.C-D), mais cela ne permet pas de faire la différence entre une vraie ablation ou une simple perte de la fluorescence de la GFP. En observant les larves fixées une semaine après l'ablation, 1 à 2 cellules *Tg(tcf7:gfp)+* sont quelques fois présentes et 60% des individus ne présentent aucune cellule *Tg(tcf7:gfp)+*, suggérant une ablation efficace (Fig 5.E-K-L). Cependant la glande pinéale de ces larves a l'air affectée (Fig 5.E-F) : en particulier, le nombre de cellules *HuC/D+* de la glande pinéale est considérablement réduit (Fig 5.F-M) suggérant que dans ces conditions les cellules *Tg(tcf7:gfp)+* sont bien éliminées, mais avec des dommages créés dans la glande pinéale.

Afin d'optimiser les conditions d'ablation, nous avons décidé d'injecter un marqueur nucléaire (l'ARNm codant pour l'histone H2B fusionnée à la RFP, *H2B:RFP*) au stade une cellule pour nous servir de guide. En effet, cela permet de visualiser la bonne élimination des cellules par l'aspect des noyaux et de visualiser d'éventuels dommages collatéraux créés lors de l'ablation (Fig 5.G-H). Une semaine après ablation, les individus ont alors un nombre de cellules *HuC/D+* semblable à ceux des contrôles (Fig 5.J-M). L'ablation est donc mieux contrôlée et spécifique avec l'aide du guide. Cependant nous pouvons constater la présence d'en moyenne 2 à 3 cellules *Tg(tcf7:gfp)+* de forte intensité dans les larves ablatées (Fig 5.I-K-L), suggérant une régénération des cellules *Tg(tcf7:gfp)+*.

Cela suggère donc que les conditions d'ablation sans guide sont trop fortes et entraînent des dommages collatéraux ablatant des progéniteurs à l'origine de la régénération de cellules *Tg(tcf7:gfp)+*. Les conditions d'ablation plus précises avec le guide permettent aux progéniteurs de ne pas être endommagés et la réapparition de cellules *Tg(tcf7:gfp)+*. Les cellules *Tg(tcf7:gfp)+* régénérées expriment la GFP avec une forte intensité, c'est pourquoi nous pensons qu'elles sont *opn4xa+*. Cependant il faudrait réaliser un marquage *opn4xa* une semaine après l'ablation pour en être sûr. La technique d'ablation au laser des cellules *Tg(tcf7:gfp)+* étant suivie d'une régénération, elle ne nous semble pas être une technique satisfaisante pour étudier le rôle de ces cellules au cours du rythme circadien, c'est pourquoi nous ne l'avons pas utilisée.



## 2. Analyse des données d'activité locomotrice : méthodes de calcul de la période (détail de la procédure utilisée dans Chaigne *et al.*,)

Afin d'étudier un rôle possible d'*opn4xa* et des RGCs dans la régulation des rythmes circadiens par la lumière, nous avons étudié un rythme circadien comportemental, le rythme circadien de l'activité locomotrice. En effet le rythme circadien de l'activité locomotrice est l'un des rythmes circadiens pour lequel il existe le plus de données concernant la larve de poisson zèbre, et un système expérimental d'acquisition et de traitement des données d'activité locomotrice avait commencé à être mis en place par Dora Sapède et Elise Cau. Afin de quantifier les différences ou l'absence de différences observées entre génotypes, nous souhaitons pouvoir extraire de ces données différents paramètres, notamment la période et la phase de l'activité locomotrice de chaque larve. C'est pourquoi nous avons cherché une méthode assez simple d'utilisation pour extraire ces paramètres.

Nous avons utilisé le site Biodare2 ([biodare2.ed.ac.uk/](http://biodare2.ed.ac.uk/)), qui permet une visualisation dynamique des données, propose de faire du « *detrending* » (pour éliminer des tendances présentes dans les données - grosses différences d'amplitude au cours du temps, petites ou grandes fréquences représentant respectivement du bruit et des tendances d'amplitude par exemple - qui rend les oscillations plus difficile à détecter ou visualiser), et permet de calculer la phase et la période avec 6 méthodes basées sur différentes techniques (Zielinski *et al.*, 2014) (Fig 6-7).

Certaines de ces méthodes (FFT-NLLS et SR) utilisent la transformation de Fourier : aussi appelée analyse spectrale, méthode basée sur l'observation de Joseph Fourier selon laquelle n'importe quelle série temporelle peut être décrite par la combinaison d'ondes sinusoïdales et cosinus de différentes fréquences. L'analyse spectrale quantifie la contribution de chaque fréquence au signal temporel et permet d'identifier la ou les fréquences dominantes dans la série temporelle grâce à leur amplitude. La fréquence étant l'inverse de la période, cela permet donc d'estimer la période de la série temporelle.

On peut diviser les 6 méthodes en trois groupes selon la technique de base utilisée.

### Trois méthodes se basent sur le spectre de fréquence :

- LSPR (Lomb Scargle Periodogram) : analyse la contribution de chaque fréquence dans la série temporelle. Pour chaque point de temps, la valeur présente dans la série de données est multipliée par la valeur de la fonction cosinoïdale à ce point de temps, et

ce résultat est ajouté pour chaque point de temps. De façon simplifiée, si la période de la fonction coisinoidale correspond à la période ayant la plus grande contribution dans la série de données, alors chaque fois que la série de donnée à sa valeur maximale, la fonction coisinoidale aussi et la multiplication et somme des deux sera importante. Lorsque la fonction coisinoidale aura une valeur négative, la série de données sera à sa valeur minimale et une petite valeur sera enlevée à la somme. Cela résultera en une valeur importante, qui représente le numérateur de la formule utilisée pour calculer le spectre de fréquence. Le dénominateur représente un facteur d'échelle qui reflète la "valeur" de la contribution de la fonction coisinoidale aux temps donnés. La même chose est faite pour la sinusoïdale de la même période, qui est ajouté au résultat de la fonction coisinoidale. Ainsi la fréquence ayant le résultat final le plus important correspond à la période dominante dans la série de données.

- MESA (Maximum Entropy Spectral Analysis) : cette méthode considère qu'une valeur à un temps  $t$  est une fonction linéaire de la combinaison des valeurs précédentes plus du bruit. Des coefficients sont ainsi utilisés dans cette fonction, choisis selon l'approche des moindres carrés. L'analyse spectrale se base sur ces coefficients pour définir la fréquence, donc la période, ayant la plus grande contribution dans la série temporelle.
- SR (Spectrum Resampling) : cette méthode utilise le spectre de fréquence généré par la transformée de Fourier (FFT). Ce spectre de fréquence est lissé (chaque point de temps est moyenné par la valeur échelonnée de ses voisines), du bruit est ajouté, puis le nouveau spectre de fréquence est à nouveau lissé, son pic maximum est enregistré, et les étapes précédentes sont répétées 1000 fois. Les 1000 pics enregistrés sont moyennés pour reporter la fréquence et donc la période.

Deux méthodes se basent sur le « curve fitting », qui consiste à essayer de trouver une courbe de période connue qui représente le mieux le jeu de données :

- MFF (mFourfit) : a été développé pour être utilisé sur des séries temporelles ayant une période stable. Cette méthode est aussi basée sur le fait que n'importe quelle série temporelle peut être décrite par la combinaison d'ondes cosinus de différentes fréquences, mais dans cette méthode les fréquences des ondes sont dépendantes les unes des autres : une fonction coisinoidale principale d'une période  $t$  est définie, puis jusqu'à 4 autres fonction coisinoidales de périodes  $t/2$  à  $t/5$  lui sont ajoutées pour améliorer le curve fitting. L'algorithme teste ainsi différentes périodes  $t$  dont les limites

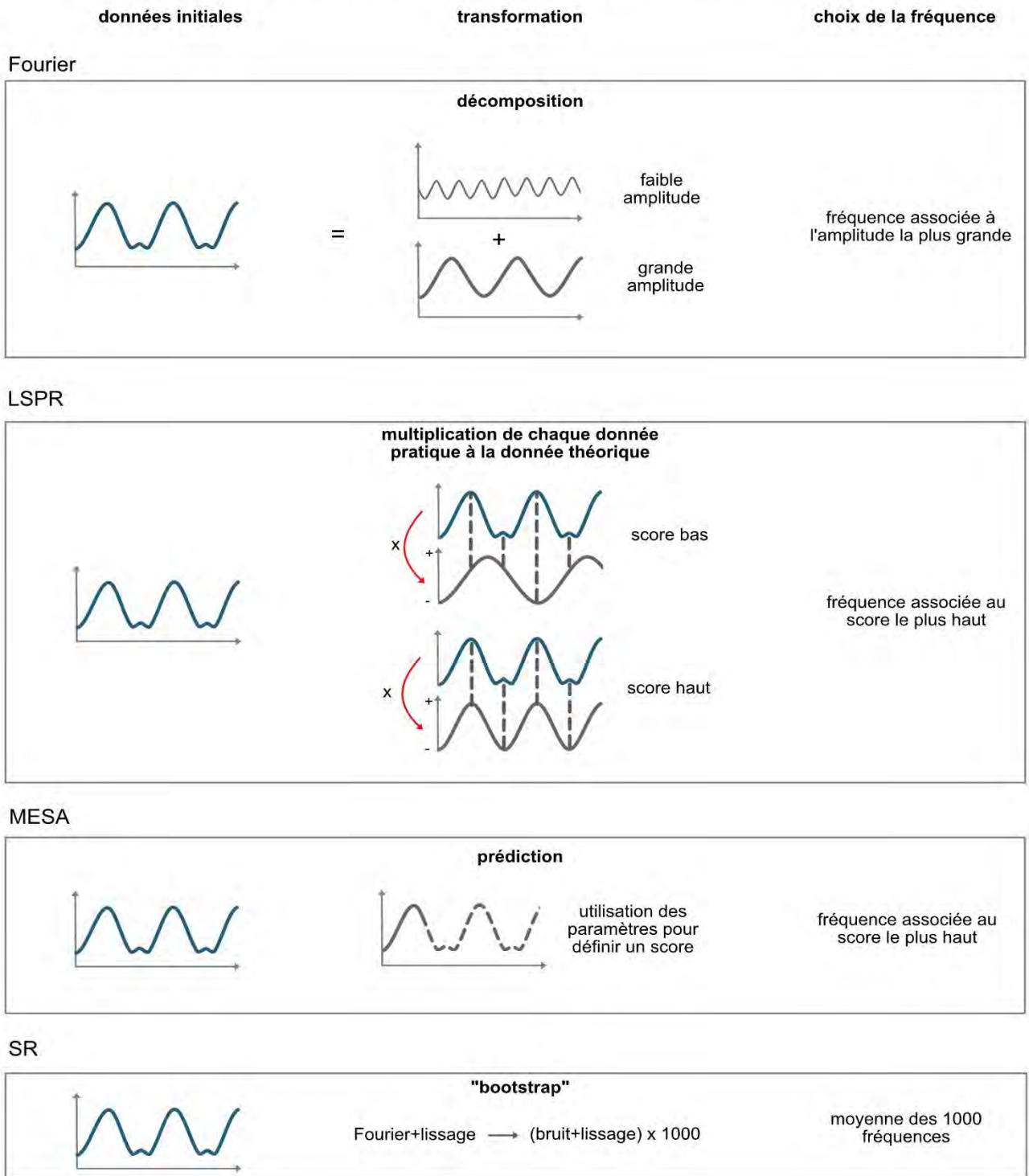
sont définies par l'utilisateur, et reporte celle pour laquelle le curve fitting donne le moins de différence entre les vraies données aux temps  $t$  et les données théoriques à ces temps (approche des moindres carrés). Le désavantage de cette méthode est qu'elle a été développée pour toujours reporter une période même si la série temporelle est arythmique, et qu'il est nécessaire d'avoir un a priori sur la plage de période que l'on lui fournit.

- FFT-NLLS (Fast Fourier Transform Non Linear Least Square) : Cette méthode ressemble au mFourfit, à la différence que les périodes de chaque fonction coisinoidale sont indépendantes, le nombre de fonction coisinoidales ajoutées peut aller jusqu'à 25, et un indice de confiance est donné pour la période, phase et amplitude. Une analyse rapide de Fourier (FFT) (voir paragraphe suivant) est utilisée pour obtenir les valeurs initiales de la période, qui sont ensuite améliorées par le NLLS (approche des moindres carrés).

La dernière méthode est le Chi-Square, appelé ici EPR (Enright Periodogram) : la série de données est coupée en sections selon une période et les superpose jusqu'à trouver la période qui donne la meilleure superposition (si les creux coïncident entre les sections, cela donnera une faible somme des données et si les pics coïncident entre sections, cela donnera une somme importante des données, ce qui au final donnera une amplitude importante. L'EPR reporte ainsi la période pour laquelle cette amplitude est la plus importante).

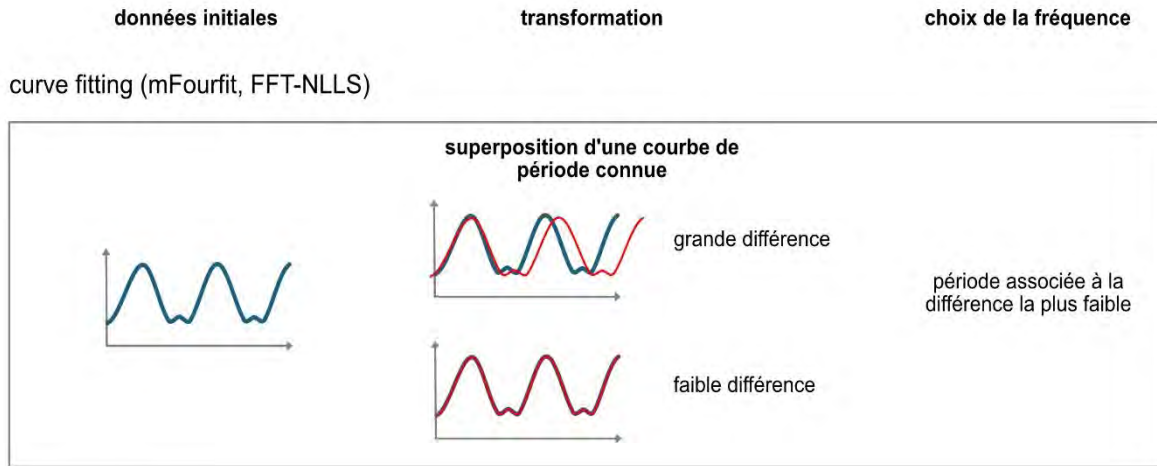
L'équipe ayant développé Biodare2 reporte le MFF, FFT-NLLS et le MESA comme les méthodes les plus précises pour calculer la période dans la plupart des conditions testées (données sur peu de temps, bruit, données non sinusoïdales) (Zielinski et al., 2014). Cependant le FFT-NLLS est susceptible aux tendances présentes dans les données, et le MFF reporte une période même si les données sont arythmiques. Biodare2 recommande d'utiliser le FFT-NLLS et le MESA, qui sont des méthodes complémentaires car ne reposant pas sur le même principe de base pour procéder au calcul de la période, et d'enlever les tendances « baseline trends » observables qui sont susceptibles d'influencer sur le calcul de période pour le FFT-NLLS.

**spectre de fréquence** fréquence = 1/période

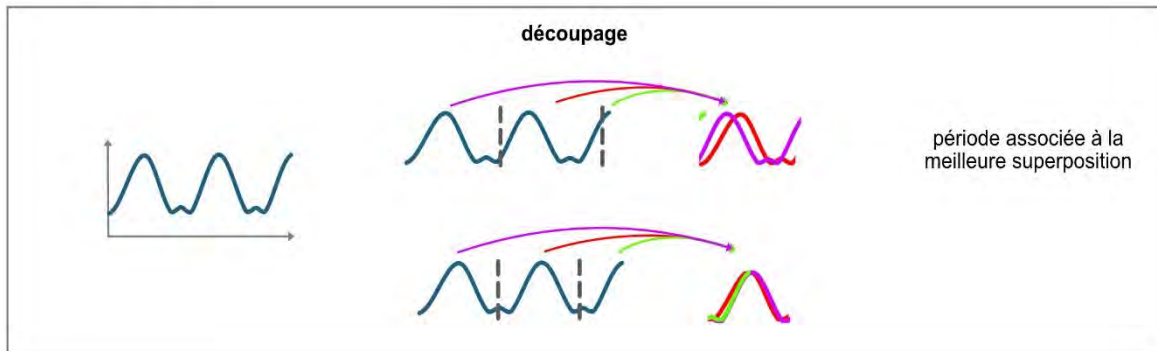


**Figure 6 : Schématisation de différentes méthodes de calcul de période basées sur le spectre de fréquence**

Présentation de la méthode de Fourier, LSPR (Lomb Scargle Periodogram), MESA (Maximum Entropy Spectral Analysis) et SR (Spectrum Resampling).



Chi-Square / EPR



**Figure 7 : Schématisation de différentes méthodes permettant de calculer la période**

Présentation du principe général de curve fitting utilisé par le mFourfit et le FFT-NLLS (Fast Fourier Transform Non Linear Least Square) ainsi que de la méthode Chi-Square aussi appelée EPR (Enright Periodogram).





## B. L'œil et la mélanopsine *opn4xa* ne sont pas nécessaires dans le photoentrainement de l'activité locomotrice chez le poisson zèbre

Grâce aux outils génétiques et techniques validés, nous avons ainsi étudié le rôle des cellules ganglionnaires (*opn4xa+* et *opn4xa-*) de la rétine (mutant *lakritz*) et de la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa+* de la glande pinéale et de la rétine (mutant *opn4xa*) dans la régulation des rythmes circadiens de l'activité locomotrice par la lumière.

Nous avons étudié le rythme circadien de l'activité locomotrice de ces mutants dans différentes conditions d'illumination (LD, DD, LL). Nous avons également mis en place un protocole de phase shift (PS) au niveau comportemental pour tester les capacités de photoentrainement de ces mutants ainsi que du double mutant *lakritz ; opn4xa-/-*, qui permet d'analyser une possible compensation entre une fonction de la rétine et un rôle de la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa+* de la glande pinéale.

Ces différentes expériences ont ainsi permis de démontrer que les cellules ganglionnaires de la rétine (*opn4xa+* et/ou *opn4xa-*) et *opn4xa* ne sont pas nécessaires pour l'alignement du rythme de l'activité locomotrice à des conditions d'illumination LD, le développement du rythme circadien de l'activité locomotrice et son maintien en conditions d'illumination constante (DD ou LL). Ces expériences révèlent cependant que les cellules ganglionnaires de la rétine sont impliquées dans le processus de masking, car les larves *lakritz* sont spécifiquement moins actives que leurs congénères durant le jour dans les expériences LD. Toutefois ce processus ne semble pas nécessiter la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa+* de la rétine ou de la glande pinéale puisque les larves *opn4xa-/-* ne présentent pas de défaut de masking détectable. Enfin les cellules ganglionnaires de la rétine et *opn4xa* ne semblent pas nécessaires pour le photoentrainement du rythme circadien de l'activité locomotrice suite à un pulse de lumière blanche en début de nuit subjective.

Les cellules *opn4xa+* de la rétine et la mélanopsine *opn4xa* ne semblent donc pas avoir un rôle majeur dans la régulation des rythmes circadiens de l'activité locomotrice par la lumière chez le poisson zèbre, contrairement aux cellules *opn4+* et à la mélanopsine *opn4* chez la souris. Cette étude soulève donc une différence d'organisation majeure du système circadien du poisson zèbre par rapport à celui des mammifères : chez le poisson zèbre, la



fonction de l'œil semble totalement dispensable pour l'alignement du rythme de l'activité locomotrice à des conditions d'illumination LD et au photoentrainement du rythme circadien de l'activité locomotrice.

## The eye and the melanopsin gene *opn4xa* are dispensable for circadian rhythms in zebrafish

Clair Chaigne<sup>1</sup>, Dora Sapède<sup>1</sup>, Xavier Cousin<sup>2</sup>, Laurent Sanchou<sup>1</sup>, Patrick Blader<sup>1</sup> and Elise Cau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Biologie Intégrative (CBI, FR 3743), Université de Toulouse, CNRS, UPS, France

<sup>2</sup>Laboratoire Ressources Halieutiques, IFREMER, Place Gaby Coll, L'Houmeau, France; MARBEC, Univ. Montpellier, CNRS, IFREMER, IRD Palavas-les-Flots, France; Univ. Paris-Saclay, AgroParisTech, INRAE, GABI, Jouy-en-Josas

\*Corresponding author: [elise.cau@univ-tlse3.fr](mailto:elise.cau@univ-tlse3.fr)

**Abstract:** Specialized Retinal Ganglion Cells expressing melanopsin (referred to as ipRGCs for intrinsically photosensitive Retinal Ganglion Cells) control photoentrainment and period length of circadian rhythms in nocturnal mammals. Here we address the conservation of these functions in the larva of a diurnal fish: the zebrafish. Since both *opn4xa* and *opn4b* are expressed in RGCs in this species, we used the *lakritz* (*lak*) mutant as to address the role of the whole RGC population. Our results show that while a functional eye is required for masking of locomotor activity, it is dispensable for the establishment of circadian rhythms of locomotor activity as well as photoentrainment to a pulse of white light produced in the early subjective night. Since *opn4xa* is also expressed in pineal projection neurons, we generated a CrispR/Cas9 *opn4xa* mutant to address the role of *opn4xa* photosensitivity including in the pineal gland. We show that *opn4xa* photosensitivity is dispensable for masking and circadian rhythms of locomotor activity as well as for photoentrainment to a pulse of white light produced in the early subjective night (CT16). Furthermore, analysis of the behaviour of *opn4xa*<sup>-/-</sup>; *lak*<sup>-/-</sup> larvae did not reveal a redundancy between the function of the eyes and the *opn4xa* photosensitivity of the pineal for photoentrainment to a pulse of white light at CT16. Altogether our results challenge the dogma that light influences circadian rhythms using the eye as a sole mediator and highlight profound differences in the circadian system and photoentrainment mechanism between nocturnal rodents and zebrafish.

## INTRODUCTION

Light has a profound influence on the physiology and behaviour of living organisms. In particular, it controls circadian rhythms which in turn regulate virtually all biological functions. Circadian rhythms are defined by their period of approximately 24 hours. Interestingly, circadian rhythms persist in constant conditions which has fostered the concept of an endogenous time-keeping mechanism: the circadian system. The circadian system requires external cues to be synchronized (or 'entrained') with the exogenous environmental conditions. In particular, light entrains the circadian system through a process referred to as photoentrainment (see (Bhadra et al., 2017) for a review).

In mammals, photoentrainment depends on a functional retina. Enucleated mice or mice lacking retinal ganglion cells (RGCs) do not entrain to LD (Light/Dark) cycles and thus behave in LD as if they were in constant darkness (Brzezinski et al., 2005; Freedman et al., 1999; Wee et al., 2002). More precisely, photoentrainment depends on a specific subtype of RGCs expressing the

photopigment melanopsin (*opn4*). These RGCs are intrinsically photosensitive to blue light and are hence referred to as ipRGCs for “intrinsically photosensitive RGCs”. ipRGCs integrate melanopsin-evoked responses together with rod and cone photoreceptor influences to transmit photic information to the brain and photoentrain circadian rhythms. Indeed, *opn4* mutant mice show a diminished phase-delay in response to a pulse of light administered at CT16 (at the beginning of the subjective night) but entrain normally to LD cycles (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002). In contrast, mice with no ipRGCs or bearing an impaired neurotransmission from ipRGCs show no entrainment to LD or ultradian rhythms as well as no phase delay following a light pulse at CT16 (Cahill, 1996; Güler et al., 2008; Kofuji et al., 2016). The difference between the phenotypes observed when only melanopsin photosensitivity is impaired compared to the models where ipRGCs inputs to the brain are lost is thought to result from the influence of rods and cones onto ipRGCs. Indeed, both rods and cones have been shown to play a role during photoentrainment and to signal onto ipRGCs (Altimus et al., 2008; Belenky et al., 2003; Calligaro et al., 2019; Dkhissi-Benyahya et al., 2007; Dollet et al., 2010; Perez-Leon et al., 2006; Wong et al., 2007). Thus ipRGCs function as a hub which integrate and transmit photic information to the brain through a direct projection to the core of the suprachiasmatic nucleus (SCN; (Baver et al., 2008; Fernandez et al., 2016; Li and Schmidt, 2018)). The SCN is thought to behave as a ‘master clock’ which synchronizes peripheral clocks present everywhere in the body. However several other brain areas are capable of generating circadian oscillations when placed in culture (see (Dibner et al., 2010) for a review). In addition to photoentrainment, ipRGCs also control the increase of period length when animals are placed in constant light (LL) (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002). ipRGCs are also required for a process of maturation of the circadian clock that sets the definitive period of locomotor rhythms in LD and DD (Chew et al., 2017).

Apart from its crucial role in the circadian system, murine ipRGCs also control masking, a direct suppressive effect of light on locomotor activity; interestingly, different ipRGCs’ subtypes mediate the direct and indirect effects of light (Rupp et al., 2019). Finally, while ipRGCs mediate circadian and direct effects of light on behaviour in nocturnal mammals, it is unclear if these roles are conserved in diurnal and non-mammalian species.

Due to its fast external development, transparency and capacity for easy genetic manipulation and high-throughput behavioural analysis, the zebrafish has emerged as a powerful non-mammalian diurnal vertebrate model for chronobiology. However, the organization of the zebrafish circadian system is thought to differ from the mammalian one. First, the pineal gland is capable of driving autonomous rhythms of melatonin production when placed in culture owing to its direct photosensitivity (Cahill, 1996) while the generation of such rhythms require the retina in mammals (see (Bailes and Lucas, 2010) for a review). Second, mutant zebrafish larvae lacking the ventral diencephalon (including the putative SCN) exhibit normal circadian rhythms of gene expression in the pineal (Noche et al., 2011). Third, all zebrafish adult organs tested, including the pineal gland, are directly photo-entrainable when placed in culture (see (Vatine et al., 2011) for a review). It therefore remains to be determined what are the respective roles of peripheral versus central photodetection (such as from retinal or pineal photoreceptors) for photoentrainment, in particular in the case of behavioural control. Further complexity arises from the large number of opsin genes in the zebrafish genome (42 in total), including 5 melanopsin genes (Davies et al., 2015). All 5 melanopsin genes are expressed in the retina, including *opn4xa* and *opn4b* in larval RGCs (Kölsch et al., 2021; Matos-Cruz et al., 2011). In addition, melanopsin expression is detected in extra-retinal tissues; for instance, *opn4xa* is expressed in a subpopulation of projection neurons in the pineal gland (Sapède et al., 2020). Thus, while both ipRGCs and pineal-ipRGCs-like cells have been described in the zebrafish larvae, the roles of these cells are currently unknown.

Since both *opn4xa* and *opn4b* are expressed in RGCs in zebrafish and since expression of the zebrafish melanopsin genes cover all retinal layers, we first analyzed the function of the retina as a whole using *lakritz* mutant larvae in which all RGCs fail to develop and in which no connection exists between the eye and the CNS (Kay et al., 2001). *lakritz* larvae entrain to LD cycles and maintain rhythms of locomotor activity with a period similar to their control siblings in DD (Dark/Dark) and LL (Light/Light). Furthermore, we detected no defect in phase shifting in response to a pulse of white light at CT16, thus suggesting that in zebrafish, a functional retina is not necessary for photoentrainment, at least using this paradigm. To test the function of the intrinsic photosensitivity of ipRGCs and ipRGCs-like-cells of the pineal gland we engineered an *opn4xa* mutant larvae. *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae successfully entrain to LD cycles and maintain rhythms of locomotor activity in DD and LL. Furthermore, a pulse of white light at CT16 induced a phase shift with a similar effect in *opn4xa*<sup>-/-</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup>;*lakritz* double mutant larvae compared to control larvae. Altogether, these results suggest that both the function of the retina and the intrinsic photosensitivity of ipRGCs-like-cells of the pineal gland are dispensable for circadian photoentrainment in zebrafish, thus further highlighting differences in the circadian system and circadian photoentrainment between mammals and zebrafish.

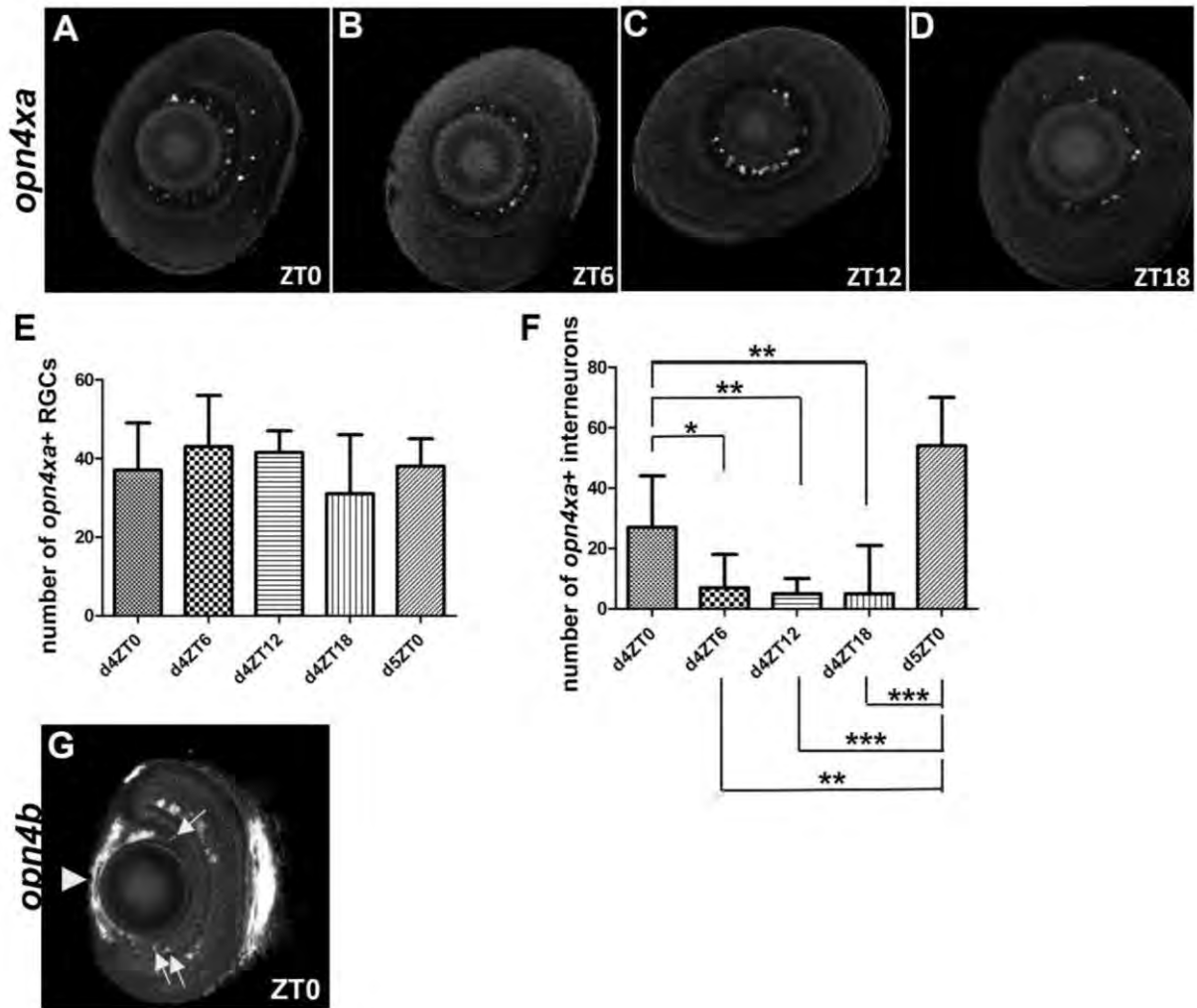
## RESULTS

### Both *opn4xa* and *opn4b* are expressed in zebrafish RGCs and interneurons

Melanopsin expressing cells play a crucial role for photoentrainment of circadian rhythms in mouse (Altimus et al., 2008; Kofuji et al., 2016; Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002) leading us to further explore their expression/function in the diurnal zebrafish. Five different melanopsin genes are present in the zebrafish genome and expressed in all retinal layers (Matos-Cruz et al., 2011). In particular, *opn4xa* and *opn4b* have been described in the RGC layer (Kölsch et al., 2021; Matos-Cruz et al., 2011). We first analyzed *opn4xa* expression in 96hpf-120hpf larvae collected every 6 hours using fluorescent in situ hybridization (Fig 1). The RGC layer contains an average 33 to 44 *opn4xa*<sup>+</sup> cells (Fig 1.A-E). Importantly the number of these cells do not vary significantly between the different time points, suggesting an absence of diel rhythm in this layer. Surprisingly, we observed a previously undescribed larval expression of *opn4xa* in the interneuron layer, with numerous cells at 4dZT0 and 5dZT0 and very few cells at the other ZT time points (Fig 1.A-D, F). This previously undescribed larval expression of *opn4xa* echoes the expression of *opn4xa* in the adult retinal interneurons (Davies et al., 2011). Moreover the rise of *opn4xa* expression in interneurons around the light transition suggests a regulation of *opn4xa* by the circadian clock in interneurons as well as a possible role for this gene in circadian control.

Using single cell RNA sequencing Kölsch et al. (2021) have described expression of *opn4b* in larval RGCs. To visualize this expression in space, we used in situ hybridization. Our analysis revealed three sites of expression for *opn4b* within the eye: an expression in the interneuron layer (Fig 1.G), an expression in the cornea (Fig 1.G, arrowheads) and an expression in a few RGCs (Fig 1.G arrows).





**Figure 1** *opn4xa* and *opn4b* are expressed in zebrafish RGCs and interneurons

(A-D) Expression of *opn4xa* at 4 days at different ZT using fluorescent in situ hybridization. Lateral view of mounted eyes imaged under the confocal microscope. The ventral side is oriented towards the left upper corner.

E) Number of *opn4xa*+ cells in the RGC layer in 96-128 hpf zebrafish larvae. All data follows a Gaussian distribution. No statistical differences were observed between the different time points using a one-way ANOVA with Bonferroni post hoc test.

F) Number of *opn4xa*+ cells in the interneuron layer in 96-128 hpf zebrafish larvae. The data at 4dZT0 does not follow a Gaussian distribution. \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.001$ . \*\*\*  $p < 0.0005$  using a Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc comparison.

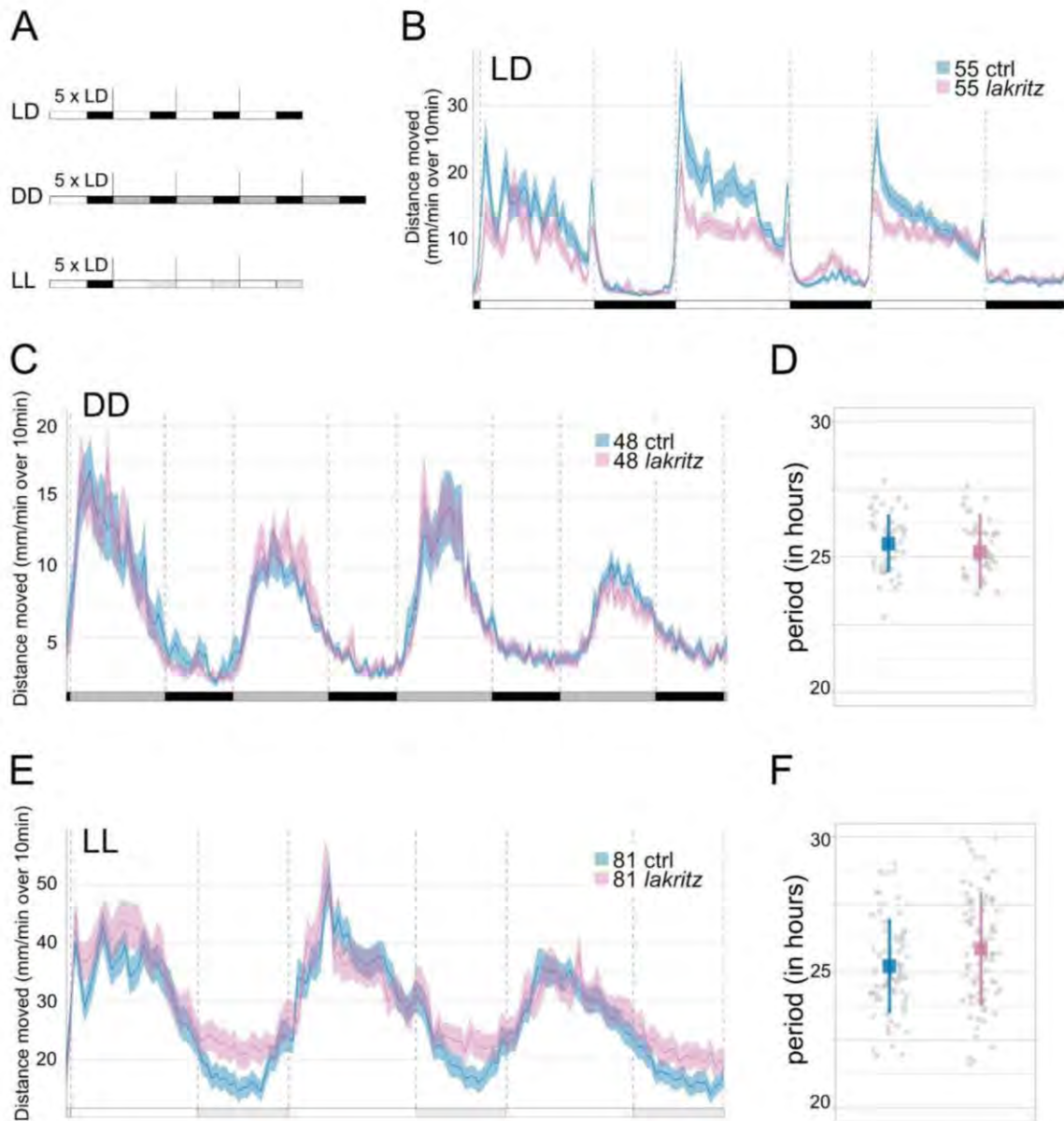
G) Expression of *opn4b* at 4 days ZT0. In addition to the previously described expression of *opn4b* in interneurons, we detected expression in the cornea (arrowhead) as well as a few RGCs (arrows). Ventral is to the left.

## Retinal Ganglion cells are dispensable for the establishment of circadian rhythms

Three out of the five melanopsin genes (*opn4xa*, *opn4a*, *opn4.1*) show a rhythmic expression in the retina ((Matos-Cruz et al., 2011), Fig 1) suggesting an interaction with the circadian system and a possible role in controlling it. Together with the well-known role of melanopsin in mammals, these observations prompted us to test a role for these genes in circadian rhythms. Because five different melanopsin genes are expressed in the zebrafish larval retina, because their expressions encompass all retinal layers ((Kölsch et al., 2021; Matos-Cruz et al., 2011), Fig 1) and because both *opn4xa* and *opn4b* are expressed in the RGC layer (Figure 1), we chose to first investigate the function of the retina as a whole using *lakritz* mutant larvae. Such larvae lack RGCs and therefore are missing a neuronal connection between the eye and the brain and have been shown to lack an optomotor response (Covello et al., 2020; Kay et al., 2001; Neuhauss et al., 1999).

Under 14:10 hr LD cycles, both control and *lakritz* larvae exhibit rhythms of locomotor activity that are aligned with the LD cycles (Fig 2B). However, compared to control larvae, *lakritz* larvae show a specific reduction of activity during the day, suggesting a masking defect in *lakritz* mutant larvae (Fig 2.B, supplemental Table 1). LD-entrained larvae placed in constant darkness (DD) or constant light (LL) exhibit rhythms of locomotor activity with similar levels of activity between control and *lakritz* larvae (Fig 2.C, E + supplemental Tables 2, 3). The reduction in activity observed in LD thus most likely reflects a masking problem rather than a defect in circadian control. Finally, the periods of the rhythms observed in free running conditions did not significantly differ between *lakritz* and control larvae both in DD (control: 25.48 +/- 1.06 hours (n=48), *lakritz*: 25.18 +/- 1.40 hours (n=48); mean+/-S.D; p=0.31; Mann-Whitney two-tailed test) and LL (control: 25.23 +/- 1.75 hours (n=76), *lakritz*: 25.86 +/- 2.10 hours (n=81); mean+/-S.D; p=0.06; Mann-Whitney two-tailed test) (Fig 2.D,F).

Altogether these results suggest that retinal ganglion cells and therefore a neuronal connection between the eye and the brain are dispensable for the establishment of circadian rhythms, their correct alignment to LD cycles and their maintenance in free running conditions (DD or LL).



**Figure 2: Locomotor activity of larvae devoid of RGCs (*lakritz*) in LD, DD and LL**

**A)** Experimental design of LD, DD and LL experiments. White rectangles represent the day period, while black rectangles represent the night period, light grey rectangles represent the subjective day period and dark grey rectangles the subjective night. For each experiment, larvae are entrained for 5 LD cycles and their locomotor activity is tracked either in LD (LD), constant darkness (DD) or constant light (LL) for 3 or 4 days.

**B)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent experiments in LD (n=55 for control and *lakritz* larvae). Error bars represent SE. The distance moved is lower in *lakritz* larvae than control larvae during the 1st (p=0.008) and 2nd days (p=0.005) but not during the 3rd day (p=0.13) nor during the night (p=0.42, p=0.51 and p=0.57 for the 1st, 2nd and 3rd nights; Mann-Whitney two-tailed test), see supplementary Table 1.

**C)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 2 independent experiments in DD (n=48 for control and *lakritz* larvae). Error bars represent SE. No differences are detected between the distance

moved of control versus *lakritz* larvae using a Mann-Whitney two-tailed test for each subjective night or day, see supplementary Table 2.

**D)** Estimation of the periods using the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk). The mean period is not significantly different between control and *lakritz* larvae in DD (control: 25.48 +/- 1.06 hours (n=48), *lakritz*: 25.18 +/- 1.40 hours (n=48); mean+/-S.D; p=0.31; Mann-Whitney two-tailed test, control vs *lakritz* larvae). Mean+/- sd (in hours) is represented. Each grey point represents a single larva.

**E)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent experiments in LL (n=81 for control and *lakritz* larvae). Error bars represent SE. The distance moved is not different between control and *lakritz* larvae for any subjective day or night (Mann-Whitney two-tailed test), see supplementary Table 3.

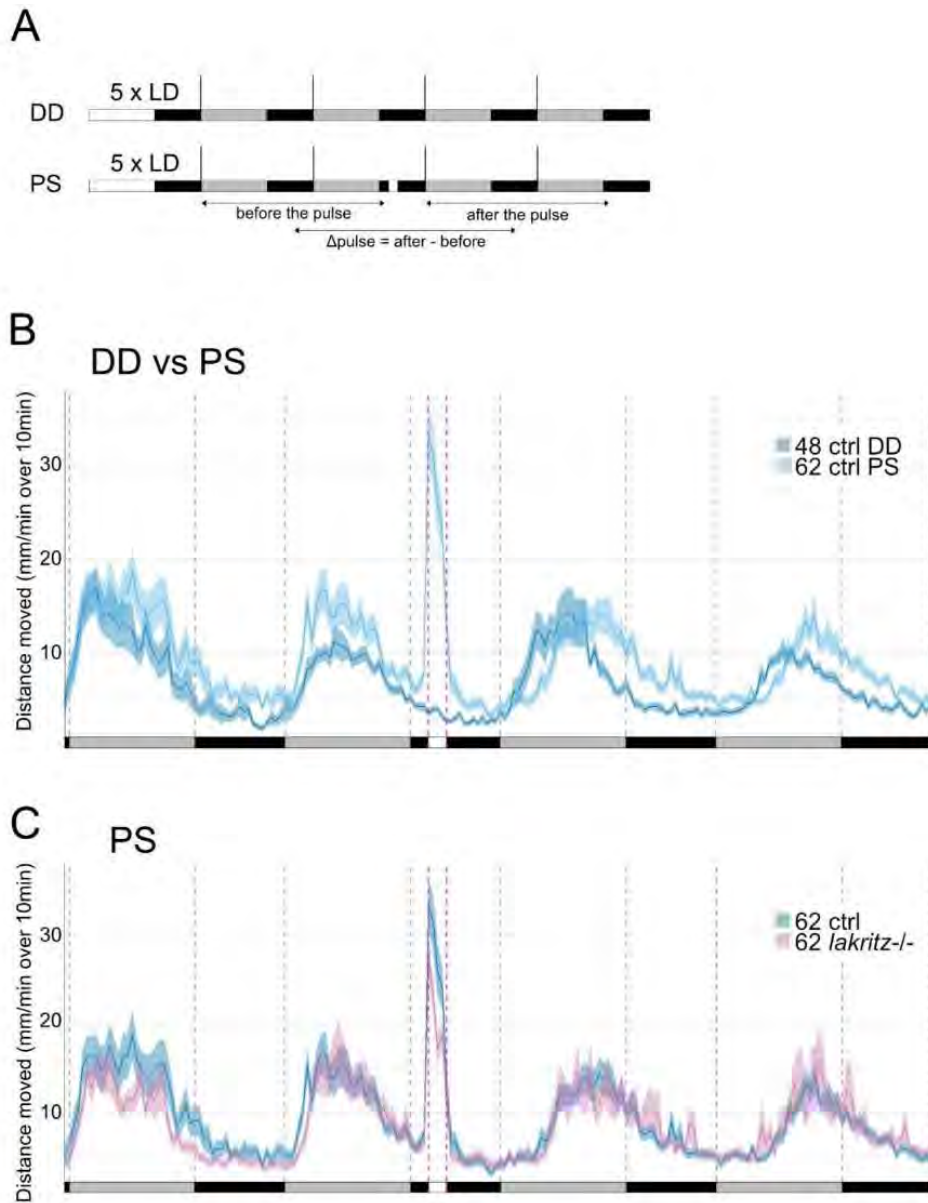
**F)** Estimation of the periods using the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk). The mean period is not significantly different between control and *lakritz* larvae in LL (control: 25.23 +/- 1.75 hours (n=76), *lakritz*: 25.86 +/- 2.10 hours (n=81); mean+/-S.D; p=0.06; Mann-Whitney two-tailed test, control vs *lakritz* larvae). Mean+/- sd (in hours) is represented. Each grey point represents a larva.

### **Retinal Ganglion Cells are dispensable for photoentrainment to a pulse of light at the beginning of the subjective night**

To test a role for RGCs in circadian photoentrainment, we assessed the phase-shifting effect of a 2-hours pulse of white light on locomotor activity in *lakritz* larvae. We chose to perform such a pulse of light at CT16, as this timing was shown to induce a robust phase shift of the molecular clock in cell cultures (Tamai et al., 2007; Vallone et al., 2004). After training for 5 LD cycles, larvae from *lakritz*+/- incrosses were filmed in DD and subjected to a pulse of light between the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> day of DD ("pulsed larvae"). Their activity was compared to the activity of larvae kept in the dark for 4 days ("DD larvae"). To analyze if a phase shift was induced, we calculated the difference of phase between the two last days ("after the light pulse") and the two first days ("before the light pulse"), named " $\Delta$ phase", and calculated the difference between the  $\Delta$ phase of pulsed versus DD larvae (Fig 3.A). We found that a 2-hours pulse of light between CT16 and CT18 induced a phase delay of locomotor activity rhythms in larvae, as the  $\Delta$ phase of pulse larvae was higher than the one of DD larvae (Fig 3.B, Table 1). *lakritz* larvae showed a reduced level of activity compared to control larvae during the pulse of white light, further validating that RGCs are involved in masking in zebrafish larvae (Fig 3.C, control: 28.33 +/- 19.26 mm/min over 10min (n=62), *lakritz*: 21.45 +/- 12.27 mm/min over 10min (n=62); mean+/-S.D; p=0.03; Mann-Whitney two-tailed test).

Interestingly, control and *lakritz* larvae exhibit a similar phase shifting effect of locomotor activity (Fig 3.C, Table 1) suggesting that RGCs, including melanopsin expressing cells, are not necessary for the circadian photoentrainment of locomotor activity to a pulse of light at the beginning of the subjective night.





**Figure 3: Larvae devoid of RGCs (*lakritz*) still photoentrain to a 2-hours pulse of white light at CT16.**

**A)** Experimental design of phase shift experiments. White rectangles represent the day or light pulse period, black rectangles represent the night period and dark grey rectangles represent the subjective day. For each experiment, larvae are entrained for 5 LD cycles and their locomotor activity is tracked either in constant darkness for 4 days (DD) or tracked in constant darkness for 4 days and subjected to a 2-hours pulse of light during the night of the 2nd day of constant darkness (PS). The phase of locomotor activity is calculated for each larva before and after the timing of the pulse for DD and PS experiments and the  $\Delta\text{phase}$  (phase after the pulse – phase before the pulse) is calculated.

**B)** Average distance moved of control larvae (mm/min over 10min) in 2 independent DD experiments (n=48) and 3 independent PS experiments (n=62). Error bars represent SE. The  $\Delta\text{phase}$  calculated using

the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk) of PS larvae is higher than DD larvae ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney two-tailed test), showing that the pulse of light induced a phase delay.

**C)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent PS experiments ( $n=62$  for control and *lakritz* larvae). Error bars represent SE. The  $\Delta$ phase of control versus *lakritz* larvae calculated using the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk) is not significantly different ( $p=0.24$ , Mann-Whitney two-tailed test). *lakritz* show lower levels of activity during the light pulse ( $p=0.03$ , Mann-Whitney two-tailed test).

Condition	n	$\Delta$ phase (Mean $\pm$ S.D, in hours)
DD control larvae	30	2.48 $\pm$ 1.61
Pulsed control larvae	44	4.74 $\pm$ 1.83
Pulsed <i>lakritz</i> larvae	32	5.12 $\pm$ 1.67

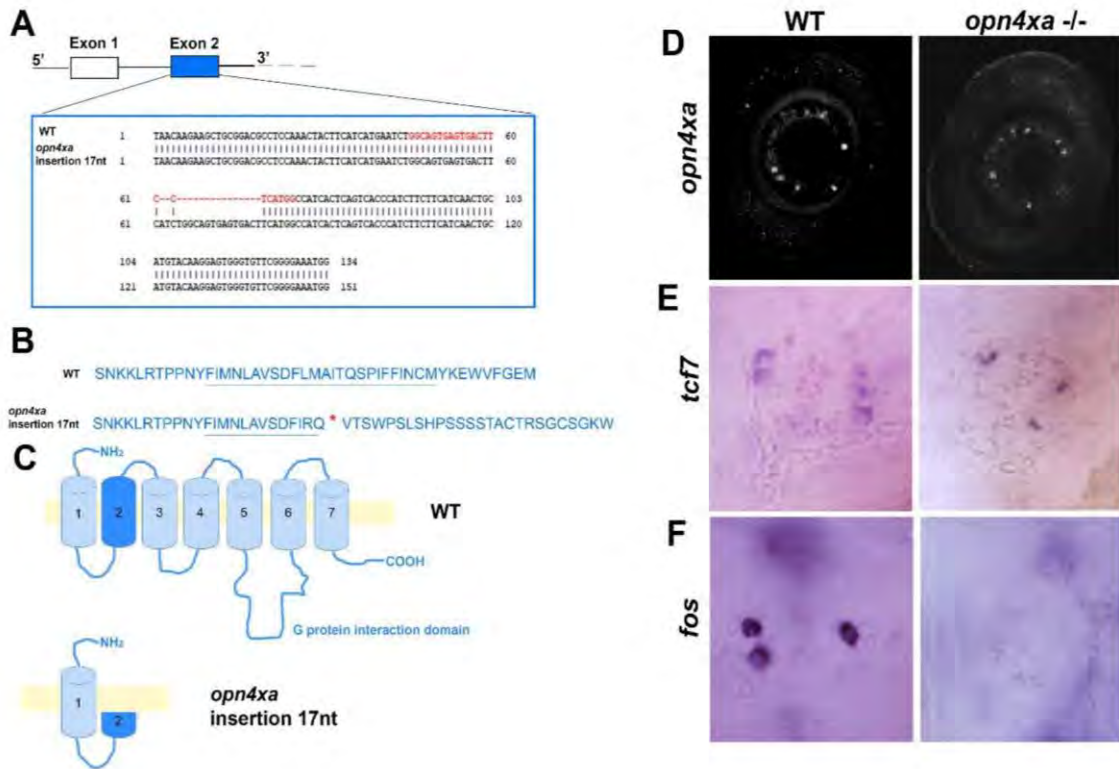
$\Delta\Delta$ phase : 2.28 hours  
 $p < 0.0001$  (Mann-Whitney two-tailed test, DD vs pulsed larvae)  
 $p = 0.24$  (Mann-Whitney two-tailed test, ctrl vs *lakritz*)

**Table 1: Quantification of the phase shifts in control (*lakritz*<sup>+/+</sup> and *lakritz*<sup>+/-</sup>) versus *lakritz* larvae kept in DD or submitted to a 2-hours pulse of white light at CT16.**

The  $\Delta$ phase is the difference between the phase of the two last cycles and the phase of the two first cycles. A phase shift is observed in DD owing to the period that is close to 25 hours which generates a  $\sim 1$  hour shift every cycle. The  $\Delta\Delta$ phase represents the difference between the  $\Delta$ phase of pulsed larvae minus the  $\Delta$ phase of larvae placed in DD. Phases were calculated with the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk).

### ***opn4xa* function is dispensable for the establishment of circadian rhythms**

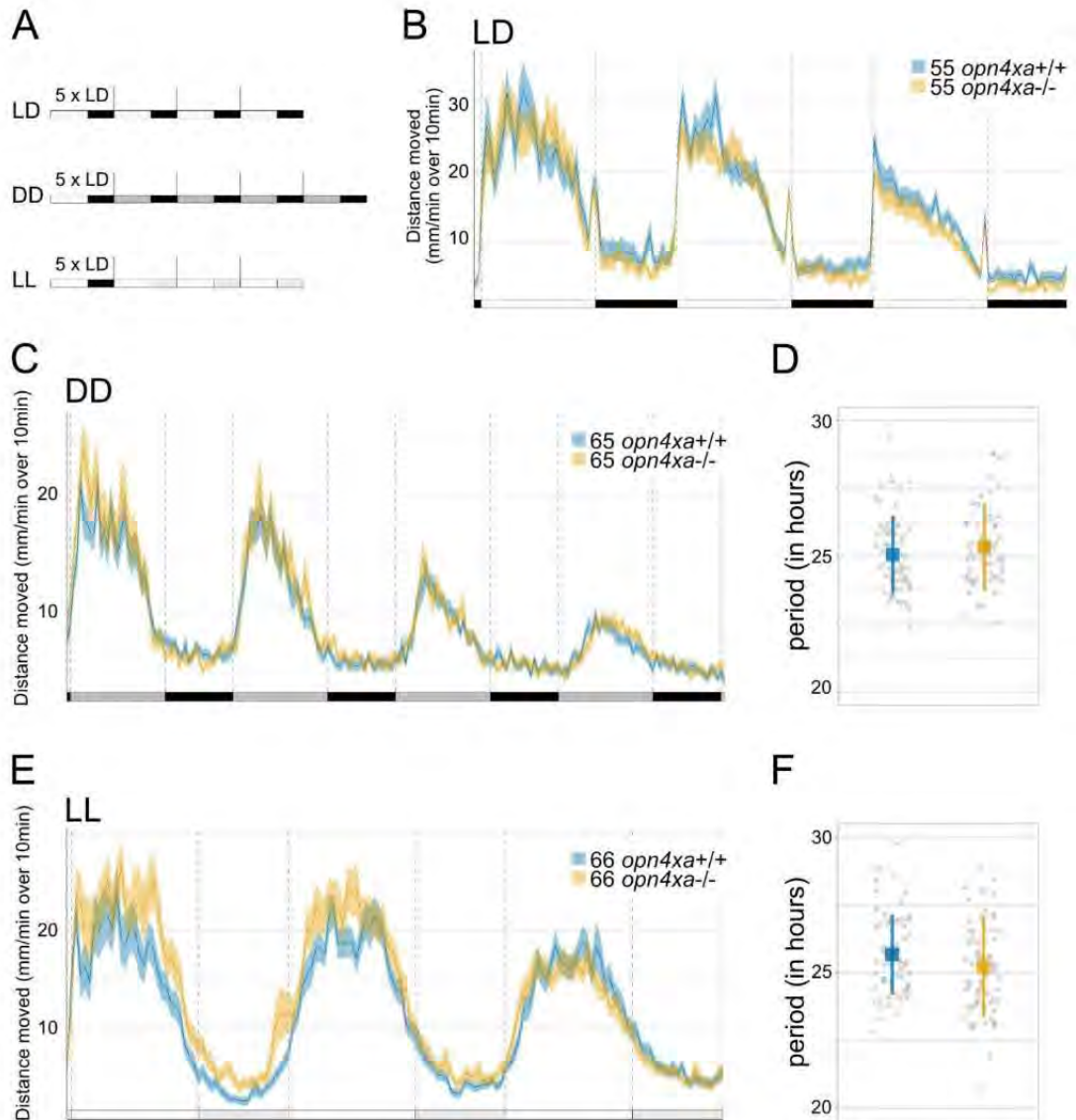
As RGCs did not seem to be necessary for the establishment of circadian rhythms nor for the generation of a phase delay subsequent to a 2-hours pulse of white light performed at the beginning of the subjective night, we wondered if these functions could be carried out by *opn4xa*<sup>+</sup> projection neurons present in the pineal gland (Sapède et al., 2020). To test for this hypothesis, we generated a mutant allele for *opn4xa* using the CRISPR/Cas9 technique. Our strategy targeted a site located in the second exon. Amongst other alleles, we selected an allele that generates a second exon bearing 17 extra nucleotides (Fig 4.A). The protein encoded from this mutant exon is predicted to be prematurely interrupted by a stop codon (Fig 4.B) which would lead to a truncation in the protein in the middle of the second transmembrane domain (Fig 4.C). Therefore, this mutant allele results in a protein devoid of a G protein interaction domain and is predicted to be a null allele. Animals homozygous for this allele were viable and fertile. In addition, *opn4xa*<sup>+</sup> cells were present in normal numbers in the retina (Fig 4.D). In the pineal gland, *opn4xa*<sup>+</sup> cells express the Wnt effector *tcf7* (Sapède et al., 2020). At 6 days post fertilization, the *opn4xa*<sup>-/-</sup> pineal gland retains a normal expression of *tcf7* (Fig 4.E, WT: 5,5  $\pm$  2,5 ( $n=4$ ), *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 6  $\pm$  3 cells ( $n=3$ ); mean  $\pm$  S.D). Upon illumination with a 30 min pulse of light, *fos* is expressed in 2-5 cells of the pineal gland which correspond to *opn4xa*<sup>+</sup> cells (Fig 4.F, Sapède et al., 2020). Interestingly, *fos* expression is dramatically reduced in the *opn4xa*<sup>-/-</sup> pineal gland after a 30 min pulse of light (Fig 4.F; at 3 days WT: 4,8  $\pm$  0,8 ( $n=9$ ), *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 0,25  $\pm$  0,7 cells ( $n=8$ ) per pineal; at 7 days T: 5,9  $\pm$  3,5 ( $n=9$ ) *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 0,4  $\pm$  0,7 cells ( $n=13$ ); mean  $\pm$  S.D) suggesting that *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae have lost intrinsic photosensitivity from pineal *opn4xa*<sup>+</sup> cells.



**Figure 4: Mutation in *opn4xa* abolishes light sensitivity in pipGCs** (A) Scheme showing the 5' part of the *opn4xa* locus and in particular the second exon targeted by the CRISPR guide RNA (target sequence is highlighted in red) as well as the WT and mutant exon2 sequences. (B) Protein sequences produced by the wt and mutant exon 2. The part corresponding to the second transmembrane domain (Matos-Cruz et al., 2011) is underlined. The red asterisk indicates a premature stop codon. (C) Models of the predicted WT and mutant predicted OPN4XA proteins. (D) (E) In situ hybridization (F) *fos* expression at 3 days wt (n=9), *opn4xa* *-/-* (n=8)

To analyze the contribution of *opn4xa* to circadian rhythms control, we analysed locomotor behaviour of *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae under various illumination regimes. Such larvae still entrained to LD cycles and did not show any difference in levels of locomotor activity compared to their wild-type siblings (Fig 5.B + supplemental Table 4). In addition, they were able to maintain rhythms of locomotor activity with a similar period as wild-type larvae in DD (Fig 5.C, D, *opn4xa*<sup>+/+</sup>: 25.05 +/- 1.43 hours (n=64), *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 25.35 +/- 1.60 hours (n=60); mean+/-SD; p=0.29; Mann-Whitney two-tailed test). Similarly, *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae placed in LL still showed circadian rhythms of locomotor activity (Fig 5.E, F, *opn4xa*<sup>+/+</sup>: 25.68 +/- 1.46 hours (n=65), *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 25.22 +/- 1.87 hours (n=66); mean+/-SD; p=0.07; Mann-Whitney two-tailed test). Altogether these results suggest that *opn4xa* is dispensable for the establishment of circadian rhythms and their maintenance in constant conditions.





**Figure 5: Locomotor activity of larvae devoid of *opn4xa*-mediated photosensitivity (*opn4xa*<sup>-/-</sup>) in LD, DD and LL**

**A)** Experimental design of LD, DD and LL experiments. White rectangles represent the day period, black rectangles represent the night period, dark grey rectangles represent the subjective day period and light grey rectangles the subjective night. For each experiment, larvae are entrained for 5 LD cycles and their locomotor activity is tracked either in LD (LD), constant darkness (DD) or constant light (LL) for 3 or 4 days.

**B)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent experiments in LD (n=55 for *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae). Error bars represent SE. The distance moved is no different in *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae during the 1st (p=0.73), 2nd days (p=0.50) and 3rd days (p=0.07) nor during the 1st (p=0.30), and 2nd nights (p=0.27) (supplemental Table 4). A lower level of activity is found in *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae during the 3rd night (p=0.01) but is visually found in only one of the 3 independent experiments (Mann-Whitney two-tailed test).

**C)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent experiments in DD (n=65 for *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae). Error bars represent SE. A lower level of activity is found in *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae during the 4th night (p<0.0001) (supplemental Table 5).

**D)** Estimation of the periods using the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk). The mean period is not significantly different between control and *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae in DD (*opn4xa*<sup>+/+</sup>: 25.05 +/- 1.43 hours (n=64), *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 25.35 +/- 1.60 hours (n=60); mean+/-SD; p=0.29; Mann-Whitney two-tailed test). Mean+/- sd (in hours) is represented. Each grey point represents a larva.

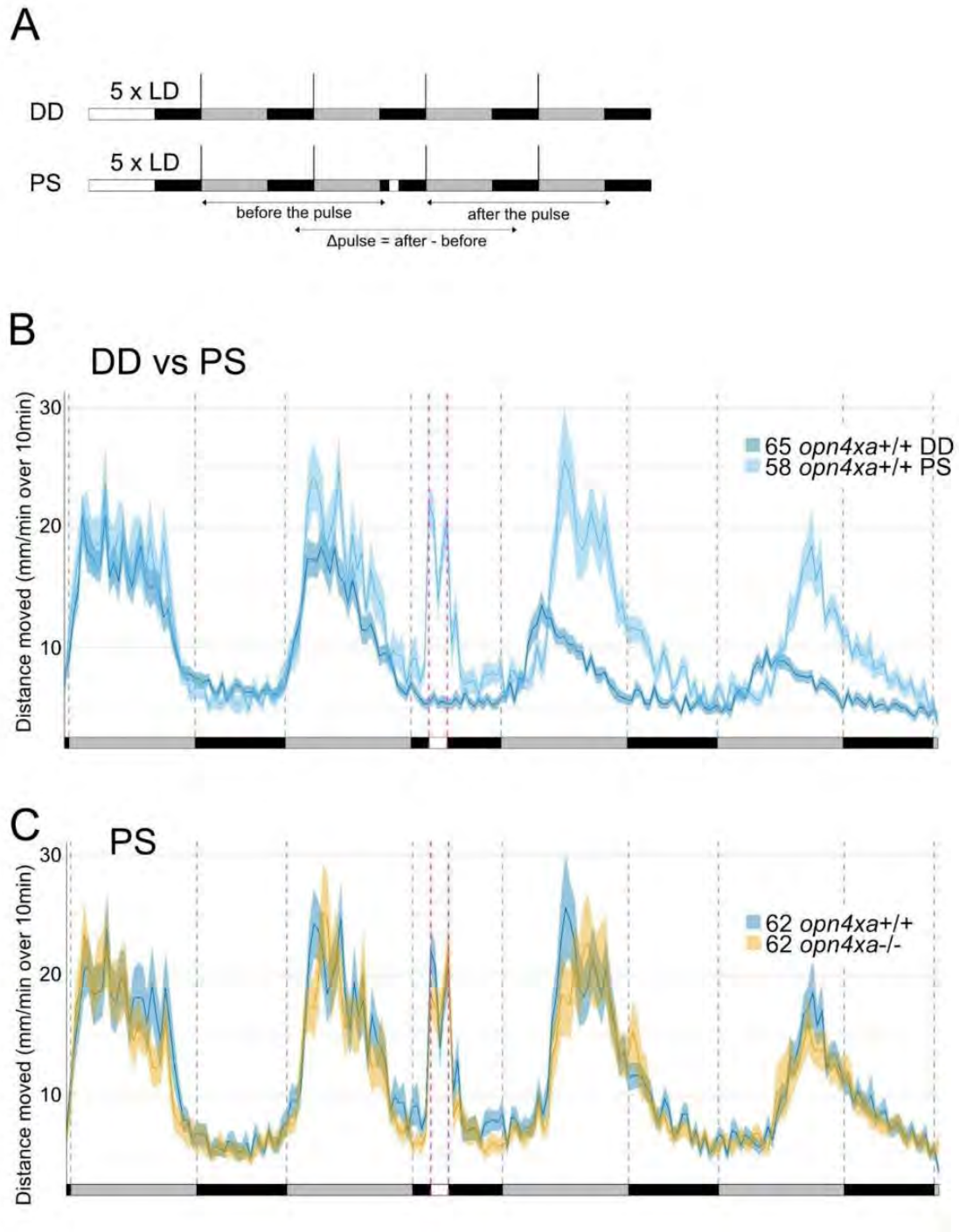
**E)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent experiments in LL (n=66 for *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae). Error bars represent SE. *opn4xa*<sup>-/-</sup> are more active than controls during the first night (p=0.02) (supplemental Table 6).

**F)** Estimation of the periods using the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk). The mean period is not significantly different between *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae in LL (*opn4xa*<sup>+/+</sup>: 25.68 +/- 1.46 hours (n=65), *opn4xa*<sup>-/-</sup>: 25.22 +/- 1.87 hours (n=66); mean+/-SD; p=0.07; Mann-Whitney two-tailed test). Mean+/- sd (in hours) is represented. Each grey point represents a larva.

### ***opn4xa* function is dispensable for photoentrainment to a pulse of white light during the beginning of the subjective night**

We next assessed the ability of a 2-hours pulse of white light to induce a phase delay in an *opn4xa*<sup>-/-</sup> background and observed that upon such a treatment *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae shift their activity to the same extent as their wild-type siblings (Fig 6.C, Table 3). Furthermore, *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae did not show any difference in the level of activity during the pulse of light compared to *opn4xa*<sup>+/+</sup> larvae, implying that *opn4xa* photosensitivity is not required for masking (Fig 6.C, *opn4xa*<sup>+/+</sup> : 20.30 +/- 10.03 mm/min over 10min (n=58), *opn4xa*<sup>-/-</sup> : 19.42 +/- 10.76 mm/min over 10min (n=58); mean+/-SD; p=0.56; Mann-Whitney two-tailed test).

These results show that the intrinsic photosensitivity of *opn4xa* expressing cells is not necessary for circadian photoentrainment nor for masking



**Figure 6: Larvae devoid of *opn4xa*-mediated photosensitivity (*opn4xa*<sup>-/-</sup>) still photoentrain to a 2 hours pulse of white light at CT16.**

**A)** Experimental design of phase shift experiments. White rectangles represent the day or light pulse period, black rectangles represent the night period and dark grey rectangles represent the subjective day. For each experiment, larvae are entrained for 5 LD cycles and their locomotor activity is tracked either in constant darkness for 4 days (DD) or tracked in constant darkness for 4 days and subjected to

a 2-hours pulse of light during the night of the 2nd day of constant darkness (PS). The phase of locomotor activity is calculated for each larva before and after the timing of the pulse for DD and PS experiments and the  $\Delta$ phase (phase after the pulse – phase before the pulse) is calculated.

**B)** Average distance moved of control larvae (mm/min over 10min) in 3 independent DD experiments (n=65) and 3 independent PS experiments (n=58). Error bars represent SE. The  $\Delta$ phase of PS larvae calculated with the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk) is higher than DD larvae ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney two-tailed test), showing that the pulse of light induced a phase delay.

**C)** Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent PS experiments (n=62 for *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae). Error bars represent SE. The  $\Delta$ phase of *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae calculated with the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk) is not significantly different ( $p = 0.32$  Mann-Whitney two-tailed test). *opn4xa*<sup>+/+</sup> and *opn4xa*<sup>-/-</sup> show similar levels of activity during the light pulse ( $p = 0.56$ , Mann-Whitney two-tailed test).

Condition	n	Mean +/- S.D (in hours)
DD control larvae	34	0.99 +/- 2.21
Pulsed control larvae	32	4.30 +/- 2.42
Pulsed <i>opn4xa</i> <sup>-/-</sup> larvae	30	4.46 +/- 4.72

$\Delta\Delta$ phase : 3.31 hours  
 $p < 0.0001$  (Mann-Whitney two-tailed test, DD vs pulsed larvae)

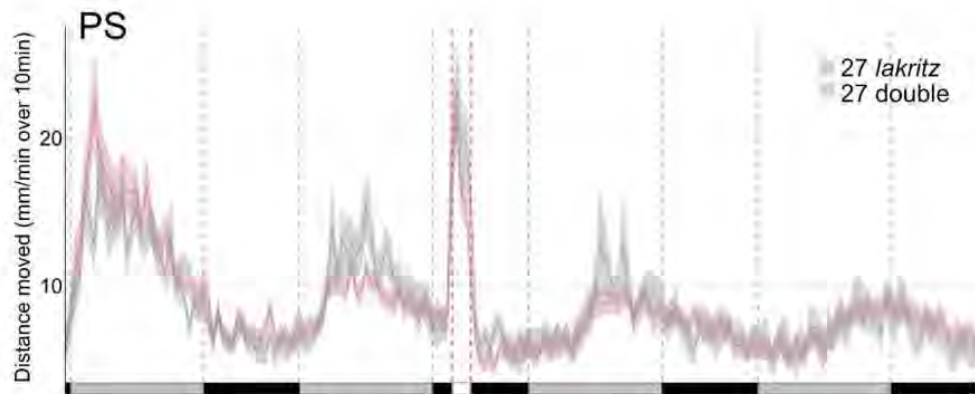
$p = 0.16$  (Mann-Whitney two-tailed test, WT vs *opn4xa*<sup>-/-</sup>)

**Table 2: Quantification of the phase shifts in *opn4xa*<sup>+/+</sup> versus *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae kept in DD or submitted to a 2-hours pulse of white light at CT16.**

As for table 1, the  $\Delta$ phase is the difference between the phase of the two last cycles and the phase of the two first cycles. A Phase shift is observed in DD owing to the period that is close to 25 hours which generates a ~1 hour shift every cycle. The  $\Delta\Delta$ phase represents the difference between the  $\Delta$ phase of pulsed larvae minus the  $\Delta$ phase of larvae placed in DD. Phases were calculated with the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk).

The results presented above suggest that neither the absence of RGCs (Fig 3) nor the loss of *opn4xa* photosensitivity (Fig 6) alter the capacity of larvae to photoentrain to a 2-hours pulse of white light performed at CT16. A trivial explanation could be a possible compensation between RGCs and melanopsin expressing cells of the pineal gland. To begin addressing this question, we tested photoentrainment properties of *lakritz; opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae. Compared to *lakritz* simple mutants, *lakritz; opn4xa*<sup>-/-</sup> double mutants did not show any attenuated phase shift response after a 2-hours pulse of light (Fig 7, *lakritz; opn4xa*<sup>+/+</sup>: 5.06 +/- 2.34 hours (n=12), *lakritz; opn4xa*<sup>-/-</sup>: 4.90 +/- 2.22 hours (n=14); mean +/- SD;  $p = 0.73$  ; Mann-Whitney two-tailed test). This suggests that other photosensitive cells and/or photosensitivity from the whole body mediate photoentrainment in zebrafish.





**Figure 7: Larvae devoid of RGCs and *opn4xa*-mediated photosensitivity (*lakritz*<sup>-/-</sup>;*opn4xa*<sup>-/-</sup>) still entrain to a two-hours pulse of white light at CT16**

Average distance moved (mm/min over 10min) of 3 independent PS experiments (n=27 for *lakritz* and n=27 *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae). Error bars represent SE. The  $\Delta$ phase of *lakritz* and *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae calculated with the FFT-NLLS method (biodare2.ed.ac.uk) is not significantly different (*lakritz;opn4xa*<sup>+/+</sup>: 5.06 +/- 2.34 hours (n=12), *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup>: 4.90 +/- 2.22 hours (n=14); mean +/- SD; p=0.73 ; Mann-Whitney two-tailed test). *lakritz;opn4xa*<sup>+/+</sup> and *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> show similar levels of activity during the light pulse (*lakritz;opn4xa*<sup>+/+</sup> : 18.23 +/- 8.65 mm/min over 10min (n=27), *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> : 19.79 +/- 12.39 mm/min over 10min (n=27); mean +/- S.D; p=0.94, Mann-Whitney two-tailed test).

## Discussion

Melanopsin expressing RGCs have been thought to be the sole mediator of masking and photoentrainment of locomotor activity for a long time. Here we show that, in contrast to this belief, mainly fostered by functional observations made in nocturnal rodents, the zebrafish eye seem dispensable for locomotor activity rhythms but is involved in masking. Since the zebrafish also possesses melanopsin expressing cells in its pineal gland (Sapède et al., 2020) we used a genetically engineered *opn4xa* mutant line to address the role of *opn4xa* photosensitivity. Our analysis suggests that *opn4xa* is neither involved in masking nor in the establishment/photoentrainment of circadian rhythms. Finally, our analysis does not support a redundant role for RGCs and *opn4xa* photosensitivity during photoentrainment of circadian rhythms.

### RGCs, but not *opn4xa*, are involved in masking

Compared to their control siblings, we found *lakritz* larvae to be less active during the light phases of LD cycles and when subjected to a pulse of light. This reveals a role for RGCs in positive masking in zebrafish larvae. In contrast, *opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae bear no defect in masking of locomotor activity in LD or during a pulse of light suggesting that *opn4xa* photosensitivity is dispensable for this type of masking. Moreover, masking is not completely abolished in *lakritz* larvae. In addition, *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> larvae show a similar activity to *lakritz*<sup>-/-</sup> larvae during a 2-hours pulse of light at CT16, therefore suggesting that there is no redundancy between the eye and *opn4xa*<sup>+</sup> cells for masking control. Other photosensitive cells are thus involved in this process. Among these could be the classical

photoreceptors of the pineal or deep brain photoreceptors, such as those involved in the locomotor response to a loss of illumination (Fernandes et al., 2012).

### **RGCs and *opn4xa* are dispensable for phase delaying circadian rhythms of locomotor activity in response to a pulse of white light**

The present study shows that neither the eye nor *opn4xa* mediated photosensitivity from the pineal gland seems necessary for the development of circadian rhythms and circadian photoentrainment. The absence of a requirement for the eye to control the circadian system in fishes is surprising given that for instance *Astyanax mexicanus* blind cavefishes are arrhythmic in DD (Beale et al., 2013) while individual *Phreatichthys andruzzii* adult cavefishes, which also exhibit a complete eye degeneration, are arrhythmic in LD when fed at random times (Cavallari et al., 2011). In light of the present study, we propose that, apart from the eye, other photosensitive structures might be affected in these fish species. Which structure could then relay light information in fishes to control circadian rhythm? The pineal gland, as it contains classical photoreceptors in addition to *opn4xa*+ projection neurons (Sapède and Cau, 2013), is an appealing candidate. Strategies aiming at genetically killing this structure or impairing its activity will surely help unravelling its function. Studies describing the effect of a surgical pinealectomy have been performed in a number of non-mammalian vertebrates. The induced phenotypes seem to strongly depend on the species. For instance in fishes, pinealectomy abolishes rhythms in the stinging catfish but not in the amur catfish nor the lake chub. Interestingly, in species where rhythms are maintained upon pinealectomy a change in period can occur (see Zhdanova and Reeb, 2005 for a review). A similar variety of phenotypes are induced upon pinealectomy in reptiles or birds. In addition to the pineal gland, reptiles have a parietal eye, a structure that is developmentally and spatially linked to the pineal gland. Interestingly simultaneous removal of the eye, the pineal gland and the parietal eye in two species of lizards (*P. Sicula* and *S. olivaceous*) do not impair rhythms of locomotor activity while on the contrary these rhythms are lost if in addition to this triple ablation, injection of dark ink between the skin and the skull is performed (Tosini et al., 2001). Similar experiments in songbirds suggest the existence of additional photosensitive structures located in the brain that control photoentrainment (Menaker and Underwood, 1976). Altogether these results highlight the existence of other brain structures mediating light inputs on the circadian system. Interestingly, melanopsin expression has been described in other brain areas in zebrafish larvae: *opn4a* is expressed within the presumptive optic area, *opn4b* is found in the ventral forebrain and the thalamic region, and *opn4.1* is detected in a specific domain located in the ventricular region at the junction between the caudal hindbrain and the anterior spinal cord (Fernandes et al., 2012; Matos-Cruz et al., 2011). Moreover, 42 opsin genes are found in the zebrafish genome among which 20 are expressed in the adult brain (Davies et al., 2015). Further studies aiming at characterizing their expression in the larval brain should help us define the best candidates. Finally, the possibility remains that photoentrainment in zebrafish occurs as a result of photosensitivity from motoneurons or muscles themselves as all cells and organs have been shown to be directly photosensitive and light-entrainable in this species (see (Vatine et al., 2011) for a review).

Altogether our results highlight profound differences in the establishment and photoentrainment of the circadian system between the diurnal zebrafish and the nocturnal rodents. A crucial, yet open question is to understand whether these differences reflect a mammal/non-mammal or a diurnal/nocturnal difference or both. The photosensitive capabilities of the zebrafish in particular and of aquatic species in general (as judged by the number of opsins found in the genome) far exceed what is observed in mammals. This could imply a greater level of complexity and robustness in circadian control in zebrafish independently of its temporal niche. However, the human brain also expresses opsins (*opn3* and *opn5*; (Halford et al., 2001; Tarttelin et al., 2003)) suggesting the existence of deep brain photoreceptors in diurnal primates and the possibility that they participate in photoentrainment.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that no competing interests exist.

### **Acknowledgements**

We are indebted to C. Rampon for allowing us to use the Ethovision Software. We thank M. Halpern and K. Soanes for sharing probes and to members of the Blader team for helpful discussions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS); the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Université de Toulouse III (UPS); Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; DEQ20131029166); Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC); Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); Association Rétina France and the Ministère de la Recherche. We would like to thank Brice Ronsin, Stéphanie Bosch and the Toulouse RIO Imaging platform; as well as Stéphane Relexans, Aurore Laire and Richard Brimicombe for taking care of the fish.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Zebrafish lines and developmental conditions**

All animals were handled in the CBI fish facility, which is certified by the French Ministry of Agriculture (approval number A3155510). The project was approved by the French Ministry of Teaching and Research (agreement number APAFIS#3653-2,016,011,512,005,922). Embryos were reared at 28 degrees in a 14 :10 hr light:dark cycle with lights on at 9:00 and lights off at 23:00.

The *lakritz* mutant line has been described previously (Kay et al., 2001), *lakritz* homozygous mutants were identified by their dark coloration. The protocol for genotyping *lakritz* individuals is available upon request.

To genotype *opn4xa* individuals, we used a classical PCR protocol with the following oligos: 5'-GGACGCCTCCAACTTC-3' (Forward) and 5'-CGAACACCCACTCCTTGAC-3' Reverse). PCR products of different sizes were obtained (110bp for the wt allele and 127bp for the mutant allele) and resolved on a 4% agarose gel.

### **Generation of an *opn4xa* mutant allele**

An *opn4xa* mutant allele was generated using the CRISPR/ Cas9 targeted genome editing. For this, a target site was designed in the second exon by manual screening for PAM sites. Transcription of the guide and coinjection of the guide mRNA with cas9 mRNA was performed as described in (Lekk et al., 2019). Screening of potential mutants was performed using T7 endonuclease (NEB) treatment of PCR products amplifying the second *opn4xa* exon (Fw : 5' CACAACATAAACTGTAAGTGCATCC 3', Rev : 5' GACACGGGTATGACTCAGGAAGG 3'). PCR products from potential carriers were subsequently subcloned and sequenced. In this manner we identified several interesting carriers among which an individual transmitting an allele bearing 17 extra nucleotides in the second exon leading to a premature interruption of the coding sequence.

For further experiments, *opn4xa* mutant animals were genotyped using a short PCR product centered on the second exon run on a 4 % gel which allows to see the 17 nt difference between the two alleles.

### **In Situ Hybridization**

In situ hybridization was performed as described previously (Cau et al., 2008). *opn4xa* and *c-fos* probes have been described previously (Matos-Cruz et al., 2011; Ellis et al., 2012). For *opn4b* we amplified the 8<sup>th</sup> and 9<sup>th</sup> exons using the following oligos : 5' CTGCCATTGCCAAGTACATC 3' and 5' TAATACGACTCACTATAGGGGATGTCCTGTGCAAGATTCC 3' followed by a transcription with T7.



### Locomotor Activity Assays

Larvae zebrafish coming from heterozygous incrosses were raised on a 14:10 hr light:dark cycle at 28°C in petri dishes with no more than 50 larvae per petri dish in a water bath inside the fish facility. On the morning of their 5<sup>th</sup> day of development ( 9:15-10:30), individual larvae were placed in each well of a 96-well plate (Whatman® UNIPLATE, 105x69mm) containing aquarium fish water and placed back in the water bath. On the evening (16:00-20:00), the plate was put in an hermetic box in a dark room maintained at approximately 27°C with a heater. The box was continuously illuminated from below with two panels of infra-red lights as well as white light controlled by a timer (280 lux at water surface) from 9:00 to 23:00. Larvae were then filmed at 30 frames per second, with a ceiling mounted infra-red camera connected to a computer on the following days (from the 6<sup>th</sup> day of development to the 9<sup>th</sup> or 10<sup>th</sup> day of development) in controlled conditions of illumination. The temperature inside the box was monitored using an electronic programmable device (I Button, Maxim). After the experiment, larvae were either genotyped by PCR for *opn4xa* and/or *lakritz* and/or simply identified for the *lakritz* mutation using the dark coloration phenotype. In addition, larvae presenting developmental defects were discarded from the subsequent analysis. Experiments in which too many larvae presented development issues or where temperature issues were present were discarded. At least three experiments were made for each type of assay.

### Locomotor Activity Analysis

After the experiment, the distance travelled per minute was extracted for each larva using the Ethovision XT13.0 (Noldus, Wageningen, the Netherlands) with the following parameters : for Detection Settings : dynamic subtraction ; subject color compared to background : Darker ; Dark : 7 to 210 ; Frame Weight : 2 ; for Track Smoothing Profiles : Minimal Distance Moved : 0.2mm - Direct (A>MDM) ; for Data Profiles : Results per time bin, Ignore last time bin if incomplete; for Analysis Profiles : Distance moved of the center-point. The obtained files were then analysed using the wakefish program (written in python by L.Sanchou) to extract an average activity of mm/min over 10min for each larva ('DM10 files'). For each experiment, the same number of homozygous mutants and wild-type or control larvae were randomly selected. The Biodare software was used to calculate periods and phases for each larva (biodare2.ed.ac.uk). We choose to use the FFT-NLLS to calculate periods and phases on DM10 files after baseline detrending, as advised (Zielinski et al., 2014). The parameters used for period calculation were as follows: baseline detrending, expected periods from 18 to 34, analysis method FFT-NLLS. The parameters used for phase calculation were as follows: baseline detrending, FFT-NLLS, phase by fit, absolute phase to window. Windows used to calculate the phase of locomotor activity "before the pulse" and "after the pulse" encompass time points from CT0 to CT15 (corresponding from 9am to midnight). Larvae with a phase<3 (that we considered to not represent the true phase) or >24 and larvae with a period<18 or >30 during one or both of the windows studied were not taken into account. Locomotor activity levels were calculated from the DM10 files by calculating means of the average activity in mm/min over 10 min over a given period for each larva. Statistical analysis were done using Prism. Graphs were generated using R studio (ggplot2 and rethomics packages (Wickham et al., 2016 ; Geissman et al., 2019)).

### REFERENCES

- Altimus, C.M., Güler, A.D., Villa, K.L., McNeill, D.S., Legates, T.A., and Hattar, S. (2008). Rods-cones and melanopsin detect light and dark to modulate sleep independent of image formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19998–20003.
- Bailes, H.J., and Lucas, R.J. (2010). Melanopsin and inner retinal photoreception. *Cell. Mol. Life Sci.*

67, 99–111.

Baver, S.B., Pickard, G.E., Sollars, P.J., and Pickard, G.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.

Beale, A., Guibal, C., Tamai, T.K., Klotz, L., Cowen, S., Peyric, E., Reynoso, V.H., Yamamoto, Y., and Whitmore, D. (2013). Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nat. Commun.* *4*, 1–10.

Belenky, M.A., Smeraski, C.A., Provencio, I., Sollars, P.J., and Pickard, G.E. (2003). Melanopsin retinal ganglion cells receive bipolar and amacrine cell synapses. *J. Comp. Neurol.* *460*, 380–393.

Bhadra, B., N, T., P, D., and M, P.B. (2017). Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human.

Brzezinski, J.A., Brown, N.L., Tanikawa, A., Bush, R.A., Sieving, P.A., Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., and Glaser, T. (2005). Loss of Circadian Photoentrainment and Abnormal Retinal Electrophysiology in *Math5* Mutant Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 2540–2551.

Cahill, G.M. (1996). Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res.* *708*, 177–181.

Calligaro, H., Coutanson, C., Najjar, R.P., Mazzaro, N., Cooper, H.M., Haddjeri, N., Felder-Schmittbuhl, M.-P., and Dkhissi-Benyahya, O. (2019). Rods contribute to the light-induced phase shift of the retinal clock in mammals. *PLoS Biol.* *17*, e2006211.

Cau, E., Quillien, A., and Blader, P. (2008). Notch resolves mixed neural identities in the zebrafish epiphysis. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 2391–2401.

Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Fröhlich, N., Lopez-Olmeda, J.F., Foà, A., Berti, R., Sánchez-Vázquez, F.J., Bertolucci, C., and Foulkes, N.S. (2011). A Blind Circadian Clock in Cavefish Reveals that Opsins Mediate Peripheral Clock Photoreception. *PLoS Biol.* *9*.

Chew, K.S., Renna, J.M., McNeill, D.S., Fernandez, D.C., Keenan, W.T., Thomsen, M.B., Ecker, J.L., Loevinsohn, G.S., VanDunk, C., Vicarel, D.C., et al. (2017). A subset of ipRGCs regulates both maturation of the circadian clock and segregation of retinogeniculate projections in mice. *eLife* *6*, e22861.

Covello, G., Rossello, F.J., Filosi, M., Gajardo, F., Duchemin, A., Tremonti, B.F., Eichenlaub, M., Polo, J.M., Powell, D., Ngai, J., et al. (2020). Transcriptome analysis of the zebrafish *atoh7*<sup>-/-</sup> Mutant, *lakritz*, highlights *Atoh7*-dependent genetic networks with potential implications for human eye diseases. *FASEB BioAdvances* *2*, 434–448.

Davies, W.I.L., Zheng, L., Hughes, S., Tamai, T.K., Turton, M., Halford, S., Foster, R.G., Whitmore, D., and Hankins, M.W. (2011). Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *68*, 4115–4132.

Davies, W.I.L., Tamai, T.K., Zheng, L., Fu, J.K., Rihel, J., Foster, R.G., Whitmore, D., and Hankins, M.W. (2015). An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. *Genome Res.* *25*, 1666–1679.

Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 517–549.

Dkhissi-Benyahya, O., Gronfier, C., De Vanssay, W., Flamant, F., and Cooper, H.M. (2007). Modeling the role of mid-wavelength cones in circadian responses to light. *Neuron* *53*, 677–687.

Dollet, A., Albrecht, U., Cooper, H.M., and Dkhissi-Benyahya, O. (2010). Cones Are Required for Normal Temporal Responses to Light of Phase Shifts and Clock Gene Expression. *Chronobiol. Int.* *27*, 768–781.

Fernandes, A.M., Fero, K., Arrenberg, A.B., Bergeron, S.A., Driever, W., and Burgess, H.A. (2012). Deep brain photoreceptors control light seeking behavior in zebrafish larvae. *Curr. Biol. CB* *22*, 2042–2047.

Fernandez, D.C., Chang, Y.-T., Hattar, S., and Chen, S.-K. (2016). Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 6047–6052.

Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., Schantz, M. von, Muñoz, M., David-Gray, Z., and Foster, R. (1999). Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science*.

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., et al. (2008). Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature* *453*, 102–105.

Halford, S., Freedman, Melanie S., Bellingham, J., Inglis, S.L., Poopalasundaram, S., Soni, B.G., Foster, R.G., and Hunt, D.M. (2001). Characterization of a Novel Human Opsin Gene with Wide Tissue Expression and Identification of Embedded and Flanking Genes on Chromosome 1q43. *Genomics* *72*, 203–208.

Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2001). Retinal Ganglion Cell Genesis Requires *lakritz*, a Zebrafish *atonal* Homolog. *Neuron* *30*, 725–736.

Kofuji, P., Mure, L.S., Massman, L.J., Purrier, N., Panda, S., and Engeland, W.C. (2016). Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) Are Necessary for Light Entrainment of Peripheral Clocks. *PLOS ONE* *11*, e0168651.

Kölsch, Y., Hahn, J., Sappington, A., Stemmer, M., Fernandes, A.M., Helmbrecht, T.O., Lele, S., Butrus, S., Laurell, E., Arnold-Ammer, I., et al. (2021). Molecular classification of zebrafish retinal ganglion cells links genes to cell types to behavior. *Neuron* *109*, 645–662.e9.

Lekk, I., Duboc, V., Faro, A., Nicolaou, S., Blader, P., and Wilson, S.W. (2019). *Sox1a* mediates the ability of the parapineal to impart habenular left-right asymmetry. *eLife* *8*, e47376.

Li, J.Y., and Schmidt, T.M. (2018). Divergent projection patterns of M1 ipRGC subtypes. *J. Comp. Neurol.* *526*, 2010–2018.

Matos-Cruz, V., Blasic, J., Nickle, B., Robinson, P.R., Hattar, S., and Halpern, M.E. (2011). Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS One* *6*, e25111.

Menaker, M., and Underwood, H. (1976). Extraretinal Photoreception in Birds. *Photochem. Photobiol.* *23*, 299–306.

Neuhauss, S.C.F., Biehlmaier, O., Seeliger, M.W., Das, T., Kohler, K., Harris, W.A., and Baier, H. (1999). Genetic Disorders of Vision Revealed by a Behavioral Screen of 400 Essential Loci in Zebrafish. *J. Neurosci.* *19*, 8603–8615.

Noche, R.R., Lu, P.-N., Goldstein-Kral, L., Glasgow, E., and Liang, J.O. (2011). Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci.* *12*, 7.

Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., and Kay, S.A. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* *298*, 2213–2216.

Perez-Leon, J.A., Warren, E.J., Allen, C.N., Robinson, D.W., and Brown, R.L. (2006). Synaptic inputs to retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Eur. J. Neurosci.* *24*, 1117–1123.

Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C., and O’Hara, B.F. (2002). Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* *298*, 2211–2213.

Rupp, A.C., Ren, M., Altimus, C.M., Fernandez, D.C., Richardson, M., Turek, F., Hattar, S., and Schmidt, T.M. (2019). Distinct ipRGC subpopulations mediate light’s acute and circadian effects on body temperature and sleep. *eLife* *8*, e44358.

Sapède, D., and Cau, E. (2013). The pineal gland from development to function. *Curr. Top. Dev. Biol.* *106*, 171–215.

Sapède, D., Chaigne, C., Blader, P., and Cau, E. (2020). Functional heterogeneity in the pineal projection neurons of zebrafish. *Mol. Cell. Neurosci.* *103*, 103468.

Tamai, T.K., Young, L.C., and Whitmore, D. (2007). Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 14712–14717.

Tarttelin, E.E., Bellingham, J., Hankins, M.W., Foster, R.G., and Lucas, R.J. (2003). Neuropsin (Opn5): a novel opsin identified in mammalian neural tissue 1. *FEBS Lett.* *554*, 410–416.

Tosini, G., Bertolucci, C., and Foà, A. (2001). The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiol. Behav.* *72*, 461–471.

Vallone, D., Gondi, S.B., Whitmore, D., and Foulkes, N.S. (2004). E-box function in a period gene repressed by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4106–4111.

Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., and Foulkes, N.S. (2011). It’s time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* *585*, 1485–1494.

- Wee, R., Castrucci, A.M., Provencio, I., Gan, L., and Van Gelder, R.N. (2002). Loss of Photic Entrainment and Altered Free-Running Circadian Rhythms in *math5*<sup>-/-</sup> Mice. *J. Neurosci.* 22, 10427–10433.
- Wong, K.Y., Dunn, F.A., Graham, D.M., and Berson, D.M. (2007). Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J. Physiol.* 582, 279–296.
- Zielinski, T., Moore, A.M., Troup, E., Halliday, K.J., and Millar, A.J. (2014). Strengths and Limitations of Period Estimation Methods for Circadian Data. *PLOS ONE* 9, e96462.



**Supplemental data:****Legend for the following supplemental tables**

Tables showing the average distance travelled (mm/min) over a 10 min window averaged during the day (D) or the night (N periods). D1 corresponds to the first day. The p value and statistical significance using a two-tailed Mann-Whitney test is indicated.

**Supplemental table 1: activity of *lakritz* versus control larvae in LD.**

condition	ctrl (n=55)	<i>lakritz</i> (n=55)	p value
D1	13.95 +/- 9.76	9.72 +/- 8.73	<b>** 0.008</b>
N1	2.92 +/- 2.28	2.85 +/- 2.57	n.s 0.42
D2	16.90 +/- 10.25	11.18 +/- 7.40	<b>*** 0.0005</b>
N2	4.04 +/- 2.22	4.98 +/- 4.22	n.s 0.51
D3	13.19 +/- 8.56	10.88 +/- 7.07	n.s 0.13
N3	3.56 +/- 2.17	3.95 +/- 2.94	n.s 0.57

**Supplemental table 2: activity of *lakritz* versus control larvae in DD**

condition	ctrl (n=48)	<i>lakritz</i> (n=48)	p value
D1	11.16 +/- 10.86	10.83 +/- 8.36	n.s 0.82
N1	3.37 +/- 4.31	2.70 +/- 2.02	n.s 0.76
D2	7.91 +/- 4.29	8.67 +/- 6.64	n.s 0.85
N2	3.26 +/- 1.50	3.44 +/- 2.14	n.s 0.90
D3	9.37 +/- 8.63	9.32 +/- 6.33	n.s 0.76
N3	4.07 +/- 1.83	4 +/- 2.45	n.s 0.40
D4	6.94 +/- 2.99	6.27 +/- 3.29	n.s 0.05
N4	4.48 +/- 2.11	4.33 +/- 2.32	n.s 0.50

**Supplemental table 3: activity of *lakritz* versus control larvae in LL**

condition	ctrl (n=81)	<i>lakritz</i> (n=81)	p value
D1	34.18 +/- 21.69	37.37 +/- 26.95	n.s 0.50
N1	17.90 +/- 15.82	22.74 +/- 20.38	n.s 0.42
D2	36.10 +/- 19.08	35.57 +/- 23.48	n.s 0.61
N2	21.18 +/- 18.32	24.91 +/- 21.59	n.s 0.47
D3	30.03 +/- 17.35	30.59 +/- 20.83	n.s 0.91
N3	17.76 +/- 15.52	21.76 +/- 19.23	n.s 0.48

**Supplemental table 4: activity of *opn4xa* versus control larvae in LD**

condition	wt (n=48)	<i>opn4xa</i> <sup>-/-</sup> (n=48)	p value
D1	22.16 +/- 10.02	22.42 +/- 13.12	n.s 0.73
N1	9.41 +/- 6.45	7.94 +/- 4.99	n.s 0.30
D2	20.46 +/- 7.96	19.49 +/- 8.25	n.s 0.50
N2	7.27 +/- 4.86	6.32 +/- 4.53	n.s 0.27
D3	14.35 +/- 5.19	12.52 +/- 6.12	n.s 0.07
N3	5.59 +/- 3.41	4.19 +/- 3.09	<b>* 0.01</b>



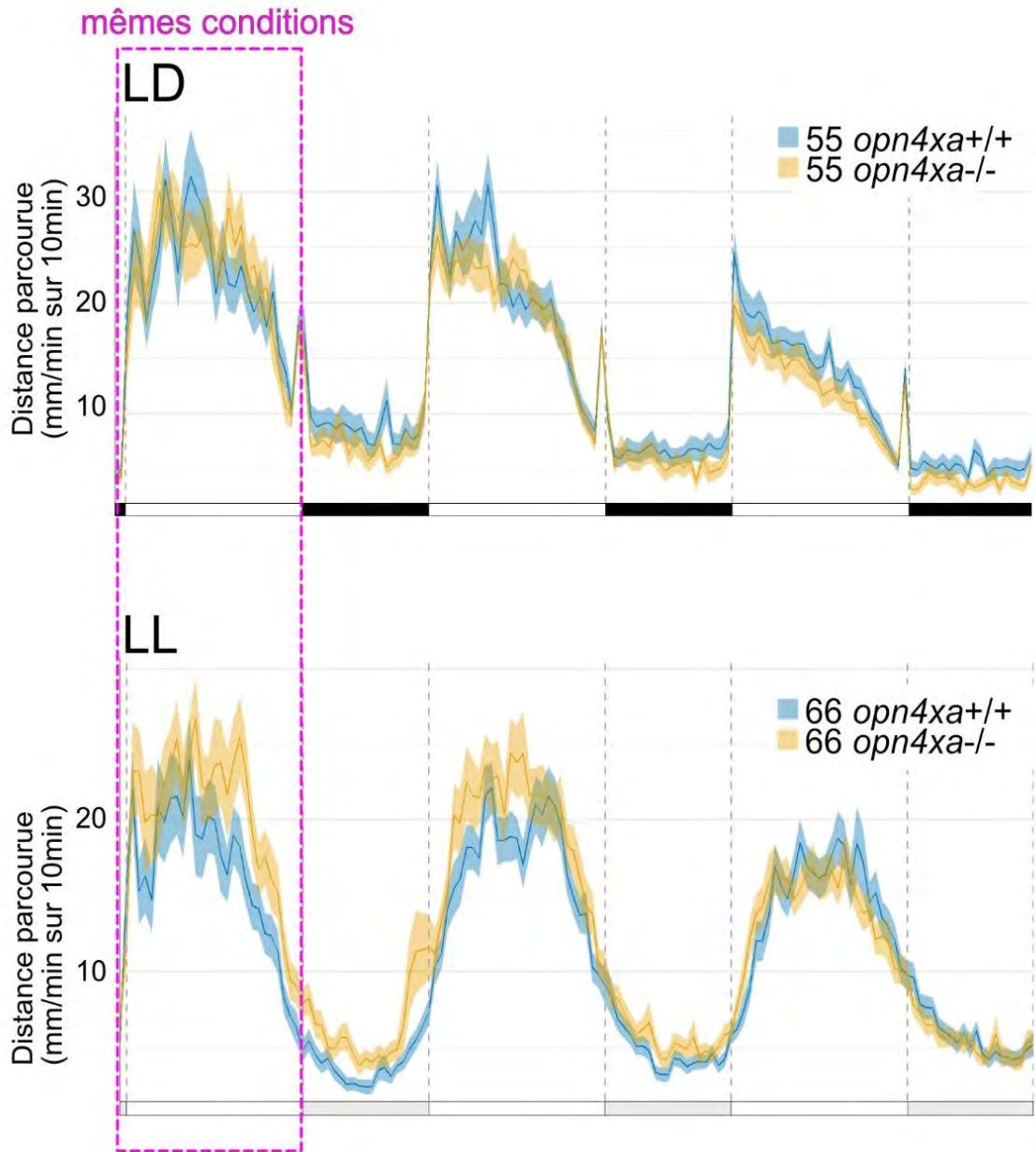
**Supplemental table 5: activity of *opn4xa* versus control larvae in DD**

condition	wt (n=65)	<i>opn4xa</i> <sup>-/-</sup> (n=65)	p value
D1	14.73 +/- 7.04	16.26 +/- 10.22	n.s 0.41
N1	6.54 +/- 1.96	6.15 +/- 2.27	n.s 0.35
D2	12.52 +/- 5.10	13.23 +/- 6.58	n.s 0.32
N2	5.62 +/- 2.06	6.04 +/- 2.59	n.s 0.38
D3	8.94 +/- 2.24	9.09 +/- 2.93	n.s 0.58
N3	5.49 +/- 2.09	5.45 +/- 2.21	n.s 0.63
D4	7.15 +/- 2.35	7.34 +/- 2.33	n.s 0.69
N4	7.34 +/- 2.33	5.30 +/- 2.01	**** <0.0001

**Supplemental table 6: activity of *opn4xa* versus control larvae in LL**

condition	wt (n=66)	<i>opn4xa</i> <sup>-/-</sup> (n=66)	p value
D1	16.56 +/- 9.57	20.15 +/- 12.25	n.s 0.07
N1	3.84 +/- 2.99	6.22 +/- 5.60	* 0.02
D2	16.67 +/- 7.79	19.22 +/- 11.49	n.s 0.26
N2	4.90 +/- 3.30	5.92 +/- 4.48	n.s 0.36
D3	14.27 +/- 7.16	13.94 +/- 7.26	n.s 0.82
N3	5.92 +/- 4.09	5.63 +/- 3.75	n.s 0.70





**Figure 8 : La différence du niveau d'activité observée en LL entre les larves *opn4xa+/+* et *opn4xa-/-* est observée dès le premier jour**

LD : résultat de 3 expériences indépendantes. LL : résultat de 4 expériences indépendantes.

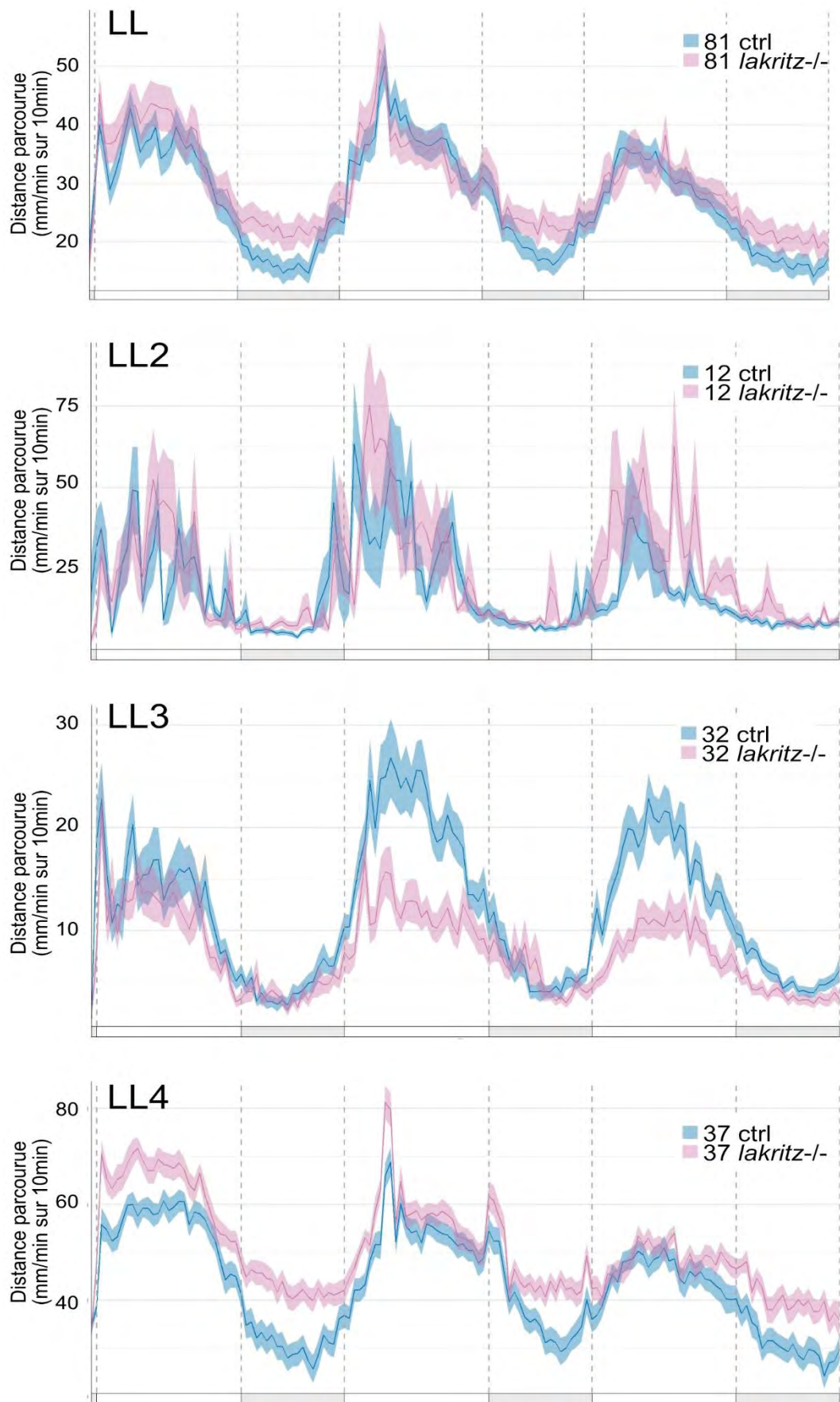
## C. Résultats complémentaires partie 2

### 1. Différence du niveau d'activité des larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> en LL

Dans les expériences LL, nous pouvons observer une différence du niveau d'activité entre les larves *opn4xa*<sup>+/+</sup> et *opn4xa*<sup>-/-</sup> (Fig 8). Cependant nous ne pouvons pas conclure que cette différence de niveau d'activité est liée aux conditions d'illuminations, car :

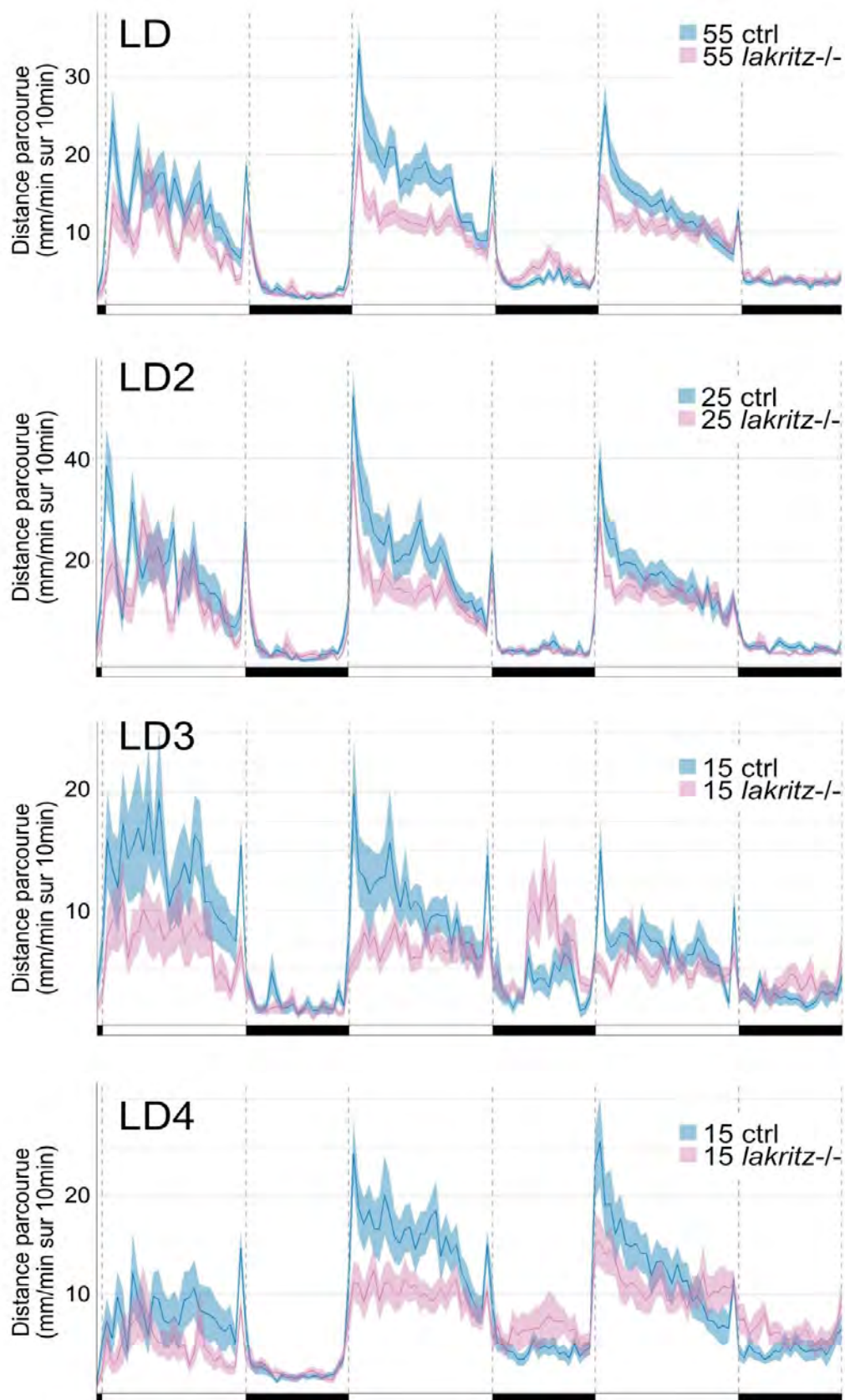
- Une grande variabilité du niveau d'activité est observée spécifiquement dans nos expériences LL : par exemple, les larves *lakritz* sont hyperactives dans une expérience, hypoactives dans une autre et ont un niveau d'activité similaire aux contrôles dans une dernière expérience (Fig 9). L'hypoactivité que nous observons pour les larves *lakritz* en LD se retrouve quant à elle dans les 3 expériences réalisées (Fig 10).
- La différence du niveau d'activité des larves n'est pas observée dans toutes nos expériences LL *opn4xa* (Fig 11)
- La différence du niveau d'activité entre les larves *opn4xa*<sup>+/+</sup> et *opn4xa*<sup>-/-</sup> est observée dès le premier jour, pendant lesquelles les larves sont encore dans les mêmes conditions que le LD (Fig 8)

C'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi sur l'analyse de cette différence du niveau d'activité.



**Figure 9 : Le niveau d'activité entre des larves de différents génotypes est très variable en LL**  
 LL : résultat des 3 expériences présentées ci-dessous (LL2, LL3, LL4).





**Figure 10 : Le niveau d'activité entre des larves de différents génotypes est stable en LD**  
 LD : résultat des 3 expériences présentées ci-dessous (LD2, LD3, LD4).

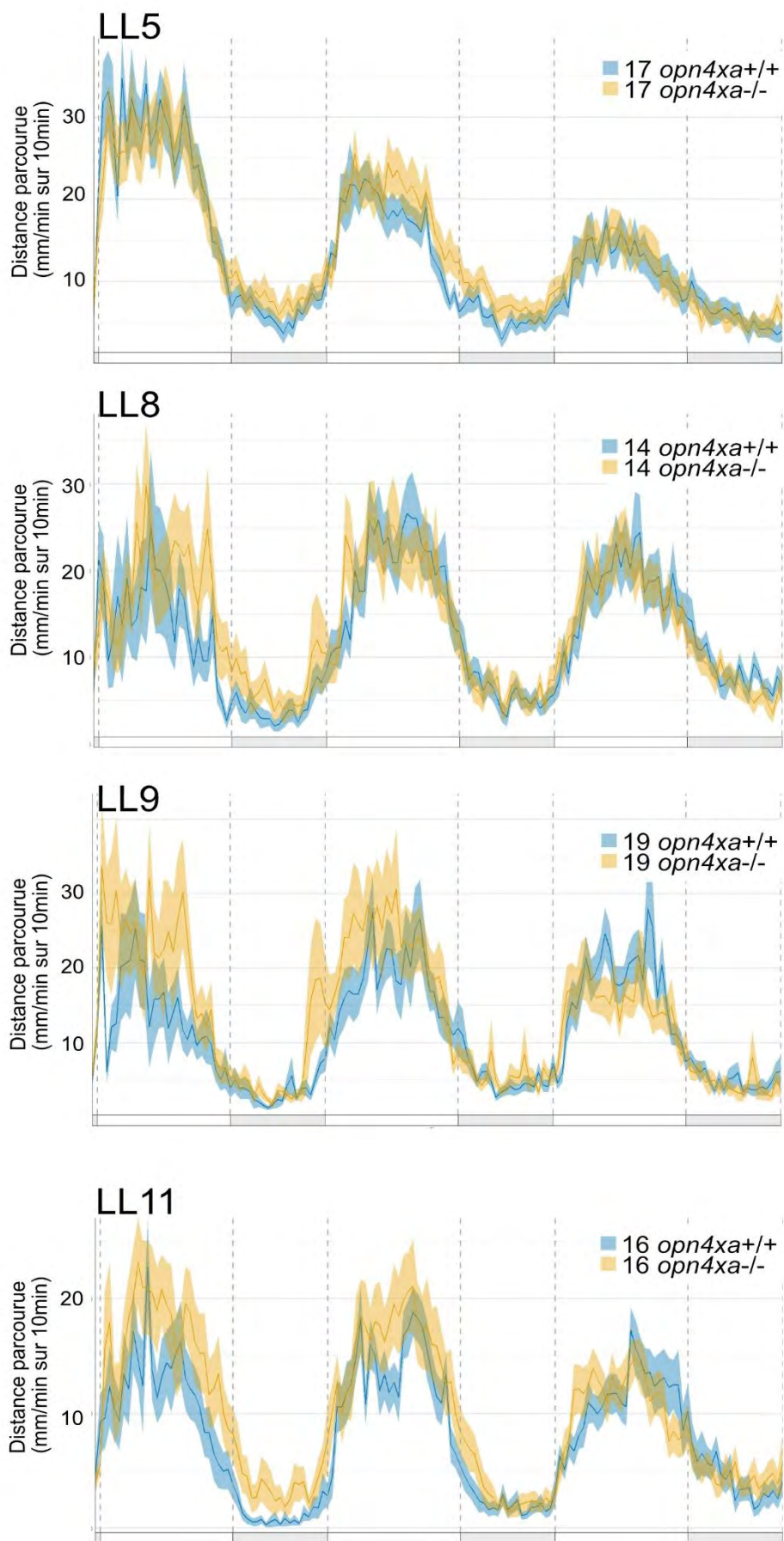


Figure 11 : La différence du niveau d'activité n'est pas observée de manière stable en LL

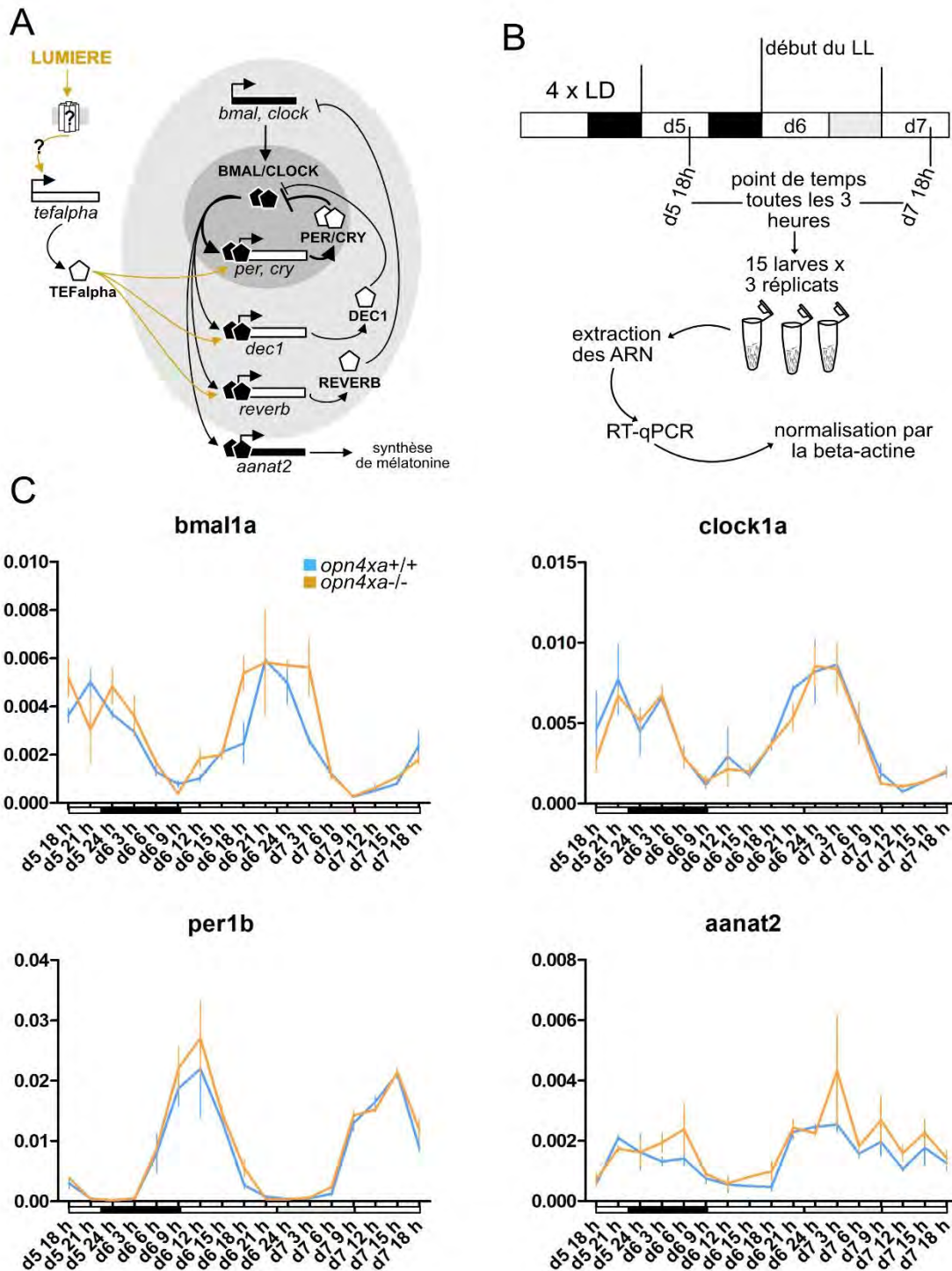
## 2. L'horloge circadienne n'est pas affectée de manière drastique au niveau moléculaire dans les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> en LD ou en LL

En parallèle de l'étude des rythmes circadiens au niveau comportemental, nous avons voulu tester les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> en LD et LL pour leurs rythmes circadiens au niveau moléculaire.

Nous avons analysé l'expression de différents gènes liés à l'horloge moléculaire et/ou des gènes dont l'expression est décrite comme activée par la lumière (spécifiés par \*) : *bmal1a*, *clock1a*, *per1b*, *aanat2* (gène cible de l'horloge codant pour une enzyme de la voie de synthèse de la mélatonine), *per1a*<sup>\*</sup>, *per2*<sup>\*</sup>, *cry1a*<sup>\*</sup>, *reverb1*<sup>\*</sup> (gène d'une boucle accessoire de l'horloge), *dec1*<sup>\*</sup> (gène d'une boucle accessoire de l'horloge), *tefalpha*<sup>\*</sup> (gène codant pour un facteur de transcription qui pourrait être le lien entre la lumière et l'activation d'autres gènes par la lumière) (Fig 12.A). Nous avons ainsi étudié par RT-qPCR l'expression des transcrits de ces gènes de d5 18h (avant le début de l'exposition au régime LL) à d7 18h et ce toutes les 3 heures (Fig 12.B) Nous avons ensuite comparé cette expression entre les larves wild-type et *opn4xa*<sup>-/-</sup> avec une ANOVA à deux facteurs (temps et génotype) en LD (de d5 18h à d6 18h) et LL (de d6 18h à d7 18h).

Tous les gènes étudiés sont exprimés de façon rythmique, aussi bien pour les larves wild-type que *opn4xa*<sup>-/-</sup> (Fig 12.C, Fig 13, Tables 1-2). De façon globale, l'expression de ces gènes ne semble pas affectée de façon drastique chez les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>. L'ANOVA détecte cependant des différences en LD pour les gènes *bmal1a* (interaction temps x génotype, test post hoc significatif pour le temps d6 18h), *cry1a* (influence du génotype mais pas de temps reporté comme significatif par le test post hoc), et en LL pour les gènes *bmal1a* (influence du génotype mais pas de temps reporté comme significatif par le test post hoc), *dec1* (influence du génotype et interaction temps x génotype, temps d7 12h et d7 18h reportés comme significatif par le test post hoc) et *per1b* (influence du génotype mais pas de temps reporté comme significatif par le test post hoc). Ces différences sont subtiles et pourraient refléter une altération de l'expression de ces gènes dans un organe ou un tissu spécifique.



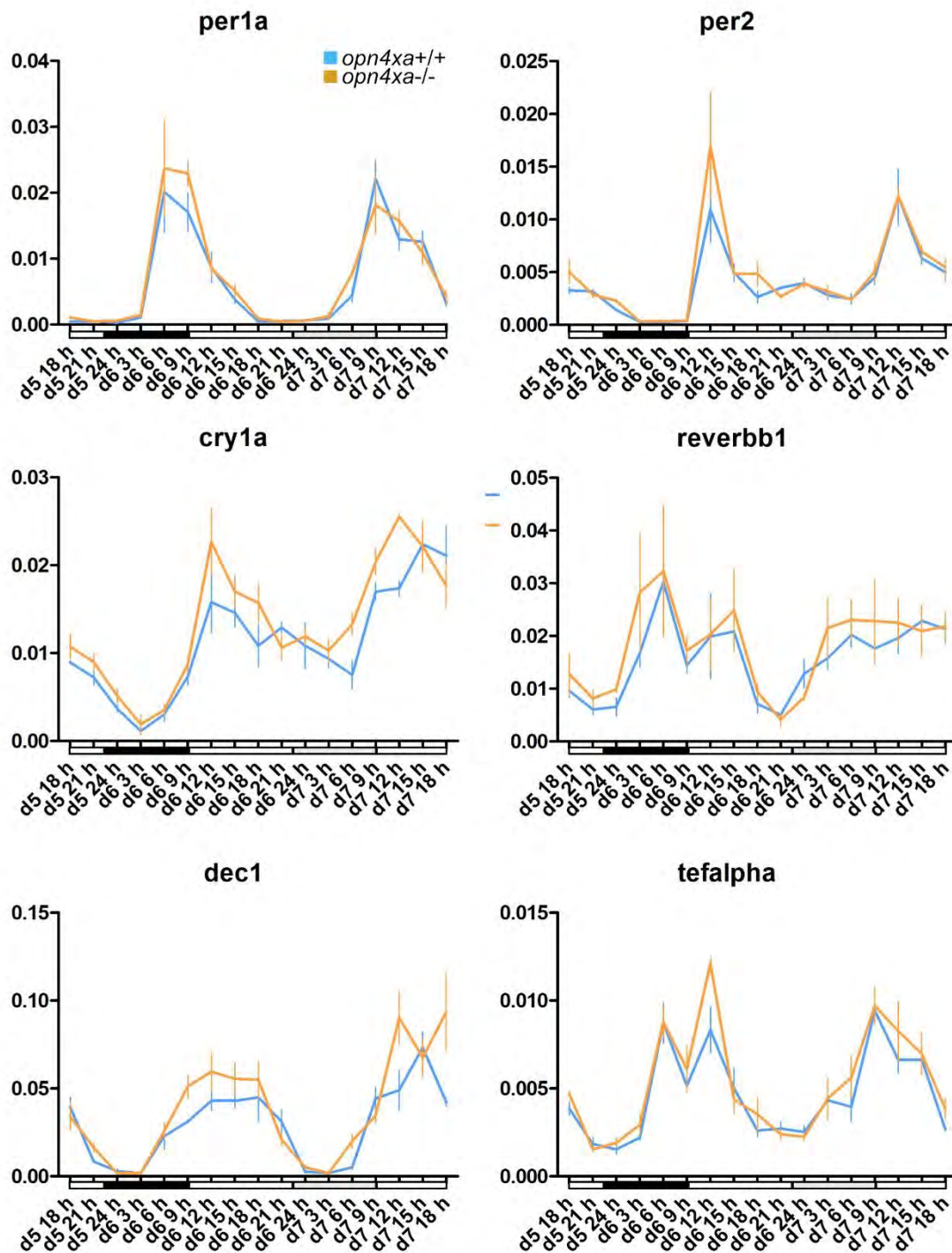


**Figure 12 : L'horloge circadienne moléculaire n'est pas affectée dans les larves *opn4xa-/-* (partie 1)**

A. Schématisation de l'horloge circadienne au niveau moléculaire (boucle principale en gris foncé, boucles accessoires en gris clair). L'expression de *dec1*, *reverb* et *aanat2* est induite par BMAL/CLOCK. DEC1 inhibe l'activité de BMAL/CLOCK. REVERB inhibe la transcription de *bmal* et *clock*. La lumière induit l'expression de *tefalpha*, gène codant pour un facteur de transcription qui pourrait être le lien entre la lumière et l'activation de gènes induits par la lumière (en blanc).

B. Les larves *opn4xa+/+* et *opn4xa-/-* sont récoltées de d5-18h à d7-18h toutes les 3 heures pour étudier l'expression de différents gènes en lien avec l'horloge circadienne par RT-qPCR.

C. Expression de *bmal1a*, *clock1a*, *per1b* et *aanat2* au cours du temps mesuré par RT-qPCR entre les larves *opn4xa+/+* (en bleu) et *opn4xa-/-* (en orange).



**Figure 13 : L'horloge circadienne moléculaire n'est pas affectée dans les larves *opn4xa-/-* (partie 2)**

Expression de *per1a*, *per2*, *cry1a*, *reverbb1*, *dec1*, *tefalpha*, des gènes induits par la lumière, au cours du temps mesuré par RT-qPCR entre les larves *opn4xa+/+* (en bleu) et *opn4xa-/-* (en orange)

Gène	p value temps	p value génotype	p value temps x génotype	Bonferonni
<i>aanat2</i>	****	ns	ns	
<i>per1a</i>	****	ns	ns	
<i>per2</i>	****	ns	ns	
<i>bmal1a</i>	****	ns	*	**d6 18h
<i>clock1a</i>	****	ns	ns	
<i>reverbb1</i>	**	ns	ns	
<i>tefalpha</i>	****	ns	ns	
<i>dec1</i>	****	ns	ns	
<i>per1b</i>	****	ns	ns	
<i>cry1a</i>	***	**	ns	ns

**Table 1 : résultats de l'ANOVA à deux facteurs suivi du test de Bonferonni lors de la condition LD (de d5 18h à d6 18h) de l'expression des gènes étudiée par RT-qPCR**

Gène	p value temps	p value génotype	p value temps x génotype	Bonferonni
<i>aanat2</i>	***	ns	ns	
<i>per1a</i>	****	ns	ns	
<i>per2</i>	****	ns	ns	
<i>bmal1a</i>	****	*	ns	ns
<i>clock1a</i>	****	ns	ns	
<i>reverbb1</i>	****	ns	ns	
<i>tefalpha</i>	****	ns	ns	
<i>dec1</i>	****	*	*	* d7 12h, ** d7 18h
<i>per1b</i>	****	***	ns	
<i>cry1a</i>	****	ns	ns	



**Table 2 : résultats de l'ANOVA à deux facteurs suivi du test de Bonferonni lors de la condition LD (de d5 18h à d6 18h) de l'expression des gènes étudiée par RT-qPCR**

### 3. Zantiks

Durant le déroulement de ce projet de thèse, l'équipe de P.Blader a fait l'acquisition d'une nouvelle machine de comportement, la Zantiks, qui offre la possibilité d'utiliser des lumières de différentes longueurs d'onde avec un contrôle temporel très précis ainsi qu'un système de tracking interne permettant un gain de temps sur le traitement des données d'activité. Ce système, plus sophistiqué que la Zebrabox et moins coûteux que les machines de comportement offrant des possibilités similaires (Viewpoint ou Daniovision), permet d'effectuer un panel d'expériences plus large et ce de manière plus autonome et rapide (Table 3).

Le contrôle de la Zantiks se fait entièrement par un logiciel accessible via un navigateur web en utilisant des scripts simples écrits avec le langage Zanscript. Cela a comme avantage de permettre un contrôle très précis des conditions de l'expérience et des données générées, mais a comme désavantage qu'une fois l'expérience terminée, il n'est pas possible de changer les paramètres utilisés (par exemple pas de possibilité d'avoir la distance parcourue par seconde si on avait défini comme paramètre d'enregistrer la distance parcourue par minute). De plus, bien que l'on puisse regarder le flux vidéo et le tracking effectué en direct (défini par une croix sur le flux vidéo), il n'est possible d'enregistrer que de courts films (de quelques minutes) car ceux-ci sont directement stockés de façon interne sur la Zantiks avec une capacité de stockage limitée. Il est donc difficile de vérifier le tracking effectué ultérieurement et de le comparer avec celui effectué par le logiciel Ethovision.

Cependant après plusieurs tests, nous avons conclu que le tracking de l'activité locomotrice effectué par la Zantiks n'était pas suffisamment performant pour être exploité pour des expériences de comportement sur de longues durées.

	<b>Caractéristiques techniques</b>	<b>Propriétés lumineuses</b>	<b>Contrôle de la température</b>	<b>Tracking Interne</b>	<b>Enregistrement de films</b>
 <p>zebrabox</p>	Boîte hermétique équipée d'une caméra infrarouge reliée à un ordinateur	Lumière blanche en dessous de la plaque de comportement, contrôle temporel peu précis via un minuteur externe	Pas de contrôle interne de la température	Non, films enregistrés sur disque dur externe à tracker via un logiciel externe	Oui, enregistrement possible de films de plusieurs heures sur un disque dur externe relié à l'ordinateur
 <p>zantiks</p>	Boîte hermétique avec lumière, température et tracking à contrôler via le software interne (script Zanscript)	Contrôle temporel précis de la lumière ; LEDS RGB au-dessus de la plaque de comportement	Système interne de contrôle de la température précis (ventilation interne) et possibilité d'enregistrer la température. Nécessité de fermer la plaque de comportement avec un film adhésif transparent pour limiter l'évaporation due à la ventilation. Nécessité d'utiliser le système de ventilation car la machinerie interne génère une hausse de la température (environ 31°C à l'intérieur de la machine)	Oui : paramètres de tracking à définir avant l'expérience (tracking par seconde, par minute,... ; paramètres de détection des larves ; calibrations internes régulières requises pendant l'expérience) ; tracking non satisfaisant sur du long terme	Non, possibilité de faire de faire des films de quelques minutes (enregistrement des films sur le disque dur interne de la Zantiks)

**Table 3 : Comparaison des propriétés de la Zebrabox et de la Zantiks**

#### 4. Déplacer la plaque de comportement influe sur le comportement des larves

Lors de l'étude dans Chaigne *et al*, ..., nous avons pu établir que les RGCs et *opn4xa* n'étaient pas nécessaires pour médier un décalage de phase (phase shift) de l'activité locomotrice induit par un pulse de lumière blanche administré en début de nuit. Nous supposons donc que les RGCs et *opn4xa* ne sont soit pas impliqués dans le processus de photoentrainement, soit que d'autres cellules et opsines compensent leur perte. Par conséquent nous avons voulu tester les capacités de photoentrainement de nos larves *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> avec un pulse de lumière bleue pour être dans des conditions réduisant la possibilité d'une compensation par d'autres opsines n'étant pas activées par la lumière bleue.

Nous avons ainsi souhaité exploiter les capacités de la Zantiks, une machine intégrant un suivi de l'activité locomotrice et la possibilité d'utiliser des lumières de différentes longueurs d'onde (verte, bleue, rouge) avec un timing très précis. Cependant après plusieurs tests, nous avons conclu que le tracking de l'activité locomotrice effectué par la Zantiks n'était pas suffisamment performant pour être exploité pour des expériences de comportement sur de longues durées. Nous avons donc voulu réaliser le tracking dans la Zebrabox et déplacer la plaque contenant les larves pour réaliser un pulse de lumière bleue (Table 3, Fig 14.A). Avant de procéder à ces expériences, nous avons avant tout d'abord vérifié si le fait de déplacer la plaque de comportement de la Zebrabox à la Zantiks puis de la Zantiks à la Zebrabox (expérience DDT) n'induisait pas en lui-même un phase shift, comme cela a été montré pour le transfert d'explants de rétine d'un incubateur à un autre (Calligaro *et al.*, 2020).

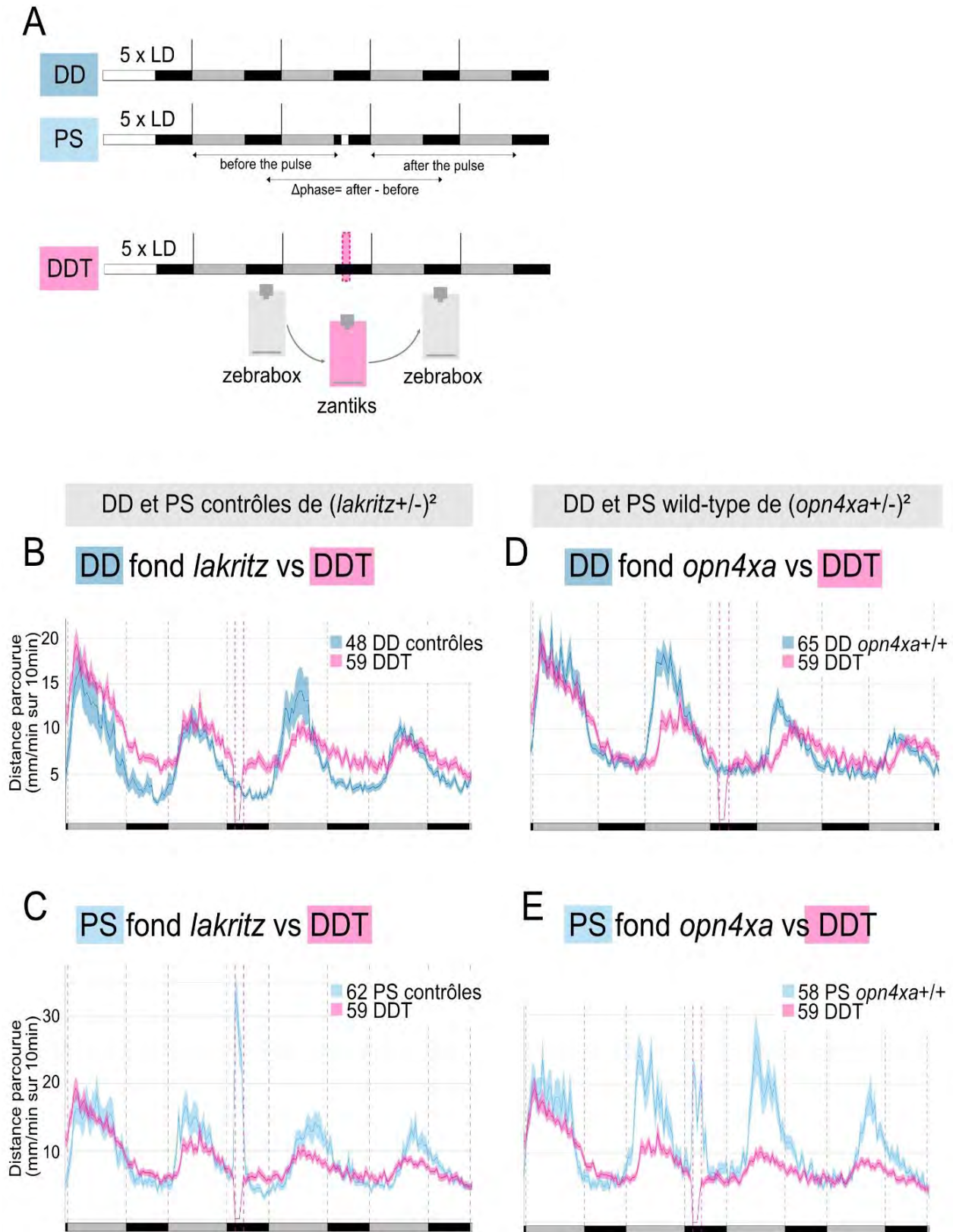
Nous avons comparé des pools de larves contrôles d'une expérience DDT avec des larves contrôles d'expériences DD et PS (Fig 14.(C-F)). Nous avons ensuite calculé la différence de phase avant et après le moment du transfert avec les méthodes FFT-NLLS et MESA de Biodare2 ( $\Delta$ phase).

Nous observons que les courbes DDT et DD sont décalées après le moment du transfert. Le transfert induit donc un phase shift, mais légèrement plus faible que celui induit par le pulse de lumière blanche, car nous observons un léger décalage des courbes DDT et PS après le moment du transfert. Le calcul de phase avec la méthode FFT-NLLS confirme le fait que le transfert induise un délai de phase, puisque le test de Kruskal-Wallis reporte un  $\Delta$ phase différent entre le DDT et le DD des fonds *lakritz* et *opn4xa* ainsi qu'un  $\Delta$ phase non différent

entre le DDT et le PS des deux fonds. De plus le calcul de phase avec la méthode MESA reporte un  $\Delta$ phase différent entre le DDT et le DD du fond *opn4xa* et un  $\Delta$ phase non différent entre le DDT et le PS du fond *opn4xa* (Table 4). Pour le fond *lakritz*, le test de Kruskal-Wallis ne reporte pas de différence de  $\Delta$ phase entre le DD et le PS du fond *lakritz* calculé avec la méthode MESA, ce qui implique que cette méthode n'est peut-être pas appropriée pour le calcul de phase.

Ces résultats indiquent donc que le fait de déplacer la boîte de comportement dans la Zantiks influe sur le comportement des larves (décalage de phase). Ce décalage induit par le transfert peut être dû au mouvement provoqué par le déplacement de la plaque qui réveille inévitablement les larves, ou à un phase shift induit par une différence de température à l'intérieur des deux boîtes de comportement. En effet l'une ne possède pas de système de contrôle de la température (Zebrabox) tandis que l'autre a un système de contrôle de la température qu'il est nécessaire de mettre en marche car son système électrique produit de la chaleur (Zantiks), et il est possible que la température ne soit pas exactement au même niveau entre les deux boîtes. Pour procéder à un test de phase shift avec une lumière bleue, il faudra donc soit modifier la Zantiks pour améliorer son tracking, soit y ajouter un système permettant de filmer les larves pendant plusieurs jours, ou encore modifier la Zebrabox pour y inclure la possibilité d'utiliser des lumières de différentes longueurs d'onde.





**Figure 13 : Déplacer les larves de la Zebrabox à la Zantiks induit un phase shift**

**A.** Protocole expérimental des expériences DD, PS, et DDT (DD avec déplacement dans la Zantiks). **(B-F)** Les pointillés roses correspondent au moment du pulse ou déplacement dans la Zantiks. **(B-C)** Comparaison de l'expérience DDT avec les expériences DD et PS des contrôles du fond *lakritz*. **(E-F)** Comparaison de l'expérience DDT avec les expériences DD et PS des contrôles du fond *opn4xa*.

### DDT (vs DD et PS ctrl *lakritz*)

Condition	FFT-NLLS : $\Delta$ phase moyenne+/-S.D en heures (n)	MESA : $\Delta$ phase moyenne+/- S.D en heures (n)
DDT	3.86 +/- 2.15 (22)	3.56 +/- 4.44 (19)
DD	2.48 +/- 1.61 (30)	4.16 +/- 3.47 (18)
PS	4.74 +/- 1.83 (44)	5.23 +/- 2.26 (31)

Condition	FFT-NLLS	MESA
DDT vs DD	*	n.s
DDT vs PS	n.s	n.s
DD vs PS	***	n.s

### DDT (vs DD et PS ctrl *opn4xa*)

Condition	FFT-NLLS : $\Delta$ phase moyenne+/-S.D en heures (n)	MESA : $\Delta$ phase moyenne+/- S.D en heures (n)
DDT	3.86 +/- 2.15 (22)	3.56 +/- 4.44 (19)
DD	0.99 +/- 2.21 (34)	0.82 +/- 1.96 (22)
PS	4.30 +/- 2.42 (32)	4.55 +/- 2.64 (20)

Condition	FFT-NLLS	MESA
DDT vs DD	***	*
DDT vs PS	n.s	n.s
DD vs PS	***	***

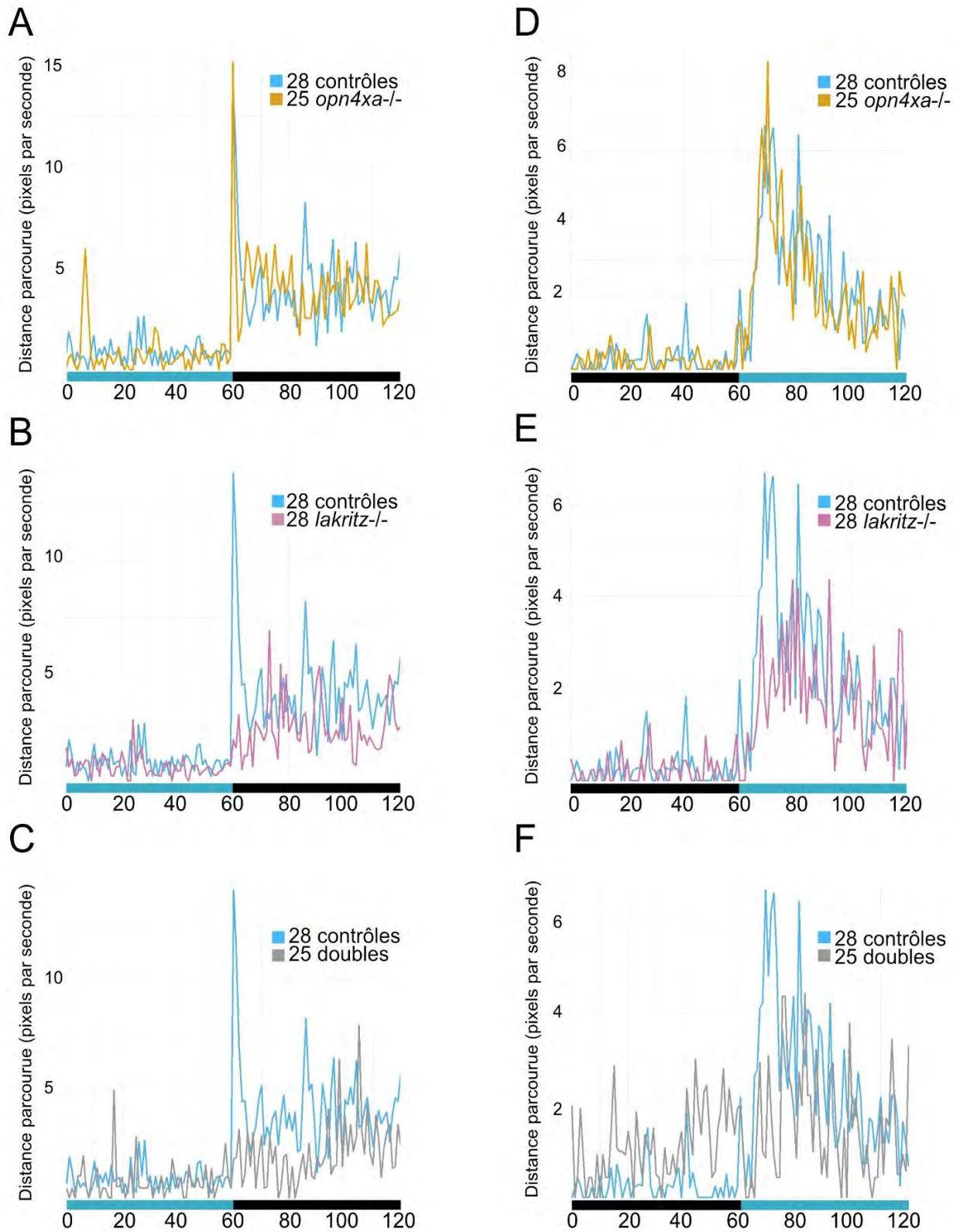
#### Table 4 : Calcul du phase shift induit par le déplacement des larves

$\Delta$ phase des expériences de DDT (déplacement des larves), DD et PS des différents fonds génétiques calculés avec le FFT-NLLS et le MESA (biodare2.ed.ac.uk) et du résultat du test de Kruskal-Wallis suivi du test de Dunns (DDT vs DD vs PS). En gris sont représentés les résultats statistiques qui montrent que le déplacement a un effet sur le comportement des larves.

## 5. Les RGCs, mais pas le gène *opn4xa*, sont impliqués dans la réponse locomotrice à une transition lumineuse

Lors d'une transition lumineuse (« light-off » pour lumière vers obscurité et « light-on » pour obscurité vers lumière), les larves de poisson zèbre ont une réponse locomotrice immédiate appelée startle response. Les startle response de type light-on et light-off sont abrogées dans les larves *chk* (qui présentent une absence d'œil mais dans lesquelles d'autres structures sont aussi possiblement affectées) et la startle response light-off n'est pas retrouvée dans les larves énucléées (la startle response light-on n'ayant pas été testée dans ces larves) (Emran et al., 2007; Fernandes et al., 2012). Suite à la startle response se déroule une réponse à court terme dans la minute qui suit la transition lumineuse, qui semble elle aussi impliquer l'œil : dans l'étude d'Emran avec le mutant *chk*, cette réponse à court terme light-on et light-off est complètement absente tandis que dans l'étude de Fernandes avec les larves énucléées elle est diminuée pour la transition light-off. Il est à noter que la pinéale semble également impliquée dans la réponse à court terme light-off puisque les larves où les photorécepteurs classiques de la glande pinéale ont été ablatées de façon génétique ont une activité légèrement moindre que les larves contrôles dans la minute qui suit la transition (Fernandes et al., 2012).

L'œil est donc impliqué dans la réponse à une transition lumineuse, et nous nous sommes demandé.e.s si les cellules *opn4xa+* de l'œil pourraient être les médiatrices de ce processus. De plus des expériences préliminaires effectuées par Elise Cau suggéraient que le gène *opn4xa* été impliqué dans la réponse à des transitions light-on : dans des expériences d'illuminations ultradiennes (alternances de 1h de lumière et 1h d'obscurité sur plusieurs jours), les larves *opn4xa-/-* semblaient avoir une réponse locomotrice atténuée lors des transitions obscurité vers lumière. Cependant l'appareillage utilisé pour ces expériences n'était pas assez précis pour pouvoir conclure que la réponse locomotrice était en lien avec une transition lumineuse, car le contrôle temporel de l'illumination devait se faire via un minuteur externe à la boîte de comportement qui permet un contrôle temporel au quart d'heure près environ. De plus nous avons remarqué en regardant le tracking en temps réel effectué par le logiciel Ethovision que les transitions lumineuses engendraient de gros problèmes de détection des larves, et donc un tracking non exploitable au moment des transitions lumineuses. Les données générées ne permettaient donc pas d'identifier les startle responses ou même les réponses à la transition lumineuse à court ou moyen terme.



**Figure 14 : La réponse locomotrice à une transition lumineuse n'est pas affectée chez les larves *opn4xa-/-***

(A-F) Réponse locomotrice à une transition LIGHT OFF avec lumière bleue (A-C) ou à une transition LIGHT ON avec lumière bleue (D-F) de larve issues d'un croisement (*opn4xa+/-;lakritz+/-*)<sup>2</sup>. Les larves contrôles sont *opn4xa+/-;lakritz+/-* ou *+/-* ; les larves *opn4xa-/-* sont *opn4xa-/-;lakritz+/-* ou *+/-* ; les larves *lakritz-/-* sont *opn4xa+/-;lakritz-/-* ; les larves doubles sont *opn4xa-/-;lakritz-/-*.

Pour savoir si le gène *opn4xa*, et potentiellement les cellules *opn4xa+* de la rétine sont impliquées dans la réponse à une transition lumineuse, nous avons utilisé la Zantiks. Bien que les données effectuées par le tracking interne ne soit pas satisfaisantes pour des expériences de longue durée, nous avons tout de même observé que les données extraites à partir de ce même tracking au niveau des transitions lumineuses sur de courts temps étaient exploitables. Nous avons confirmé que ces données de tracking étaient en concordance avec la réponse des larves que nous pouvions observer à l'œil sur les courtes vidéos faites aux moments des transitions lumineuses dans les expériences d'où provenaient ces données (très grossièrement, mouvement ou absence de mouvement). Nous avons ainsi observé la light-on et light-off response de larves issues d'un croisement (*opn4xa+/- ;lakritz+/-*)<sup>2</sup> dans deux expériences de phase shift avec lumière bleue (1 transition light-on à minuit soit CT15 et 1 transition light-off à 2h du matin soit CT17 entre 6dpf et 7dpf) ainsi que dans une expérience de LD avec lumière blanche (3 transitions de chaque type entre 5 et 7dpf à 9h du matin soit ZT0 et 23h soit ZT14), aucun double mutant dans cette expérience). Les résultats obtenus étant similaires dans les deux types d'expériences, seuls les résultats des deux expériences de phase shift sont représentées dans la Figure 15.

La réponse à une transition light-off des larves contrôles est en accord avec ce qui est montré dans l'étude d'Emran. Ainsi, lorsque la lumière s'éteint, les larves contrôles présentent immédiatement un pic d'activité, puis un niveau d'activité plus élevé qu'avant la transition, ce que nous observons à la fois sur les vidéos et à partir des données de tracking (Fig 15.A-C-E). Cette réponse ne semble pas affectée chez les larves *opn4xa-/-* qui présentent un profil similaire aux larves contrôles (Fig 15.A). Les larves *lakritz*, tout comme les doubles mutants (*opn4xa-/- ;lakritz*) ne présentent pas de pic d'activité (absence de startle response light-off), ce qui est en accord avec les résultats de l'étude d'Emran et de Fernandes (Fig 15.C-E). Dans la minute qui suit la transition, les larves *lakritz* et double mutantes ont un niveau d'activité légèrement plus bas que les contrôles, en accord avec l'étude de Fernandes mais contredisant l'étude d'Emran dans laquelle pour les larves *chk* cette réponse est complètement abolie (Fig 15.C-E). Cela confirme que l'œil ne semble pas être la seule structure affectée dans le mutant *chk*.

Si le profil de la réponse à une transition light-off correspond à ce qui a été précédemment publié, nos larves ne présentent pas un pic soudain d'activité locomotrice suite à une transition light-on (lumière bleue ou blanche), aussi bien dans nos données que

sur les vidéos (Emran et al., 2007; Liu et al., 2015; Zhang et al., 2016b) (Fig 15.B-D-F). Nous observons cependant une augmentation de l'activité locomotrice dans la minute qui suit la transition, qui ne semble pas affecté chez les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> et qui semble légèrement diminuée chez les larves *lakritz* et double mutantes (Fig 15.B-D-F). La différence dans la réponse à la transition lumineuse light-on de nos larves est peut-être dû à un fond génétique différent par rapport aux autres publications : en effet nos larves ont un fond génétique TLAB et leur profil de réponse light-on est plus similaire aux larves TLAB de 9dpf de Liu, qui ont une startle response (absente dans nos larves) puis une augmentation de leur niveau d'activité global par rapport à celui d'avant la transition (présente dans nos larves) (Liu et al., 2015). Nous ne pensons pas que cela soit due à une différence de lumière utilisée, car en visualisant les vidéos réalisées dans la Zebrabox où la lumière blanche est différente de celle de la Zantiks (niveau d'illumination semblables – 300 lux pour la Zebrabox et 340 lux pour la Zantiks – mais utilisation de deux systèmes différents – ampoule blanche pour la Zebrabox et mélange de LED RGC pour la Zantiks-), nous n'observons pas les larves effectuer de startle responses suite à une transition light-on contrairement à la transition light-off où elle est très marquée.

Nos résultats confirment donc que l'œil est nécessaire pour la réponse immédiate à une transition light-off (avec lumière bleue ou blanche) et est impliqué dans la réponse à court terme pour cette même transition, mais ne semble pas nécessiter la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa*<sup>+</sup> de la rétine ou de la glande pinéale. L'œil semble également impliqué dans la réponse à une transition light-on, mais tout comme pour la transition light-off cela ne semble pas nécessiter la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa*<sup>+</sup> de la rétine ou de la glande pinéale.

## D. Matériel et Méthodes des résultats complémentaires

### **Elevage des poissons zèbre**

Les animaux ont été élevés dans une eau à 27°C en cycle jour/nuit de 14h/10h (lumière à 9h du matin) selon les conditions décrites dans la littérature (Westerfield, 1993). Après fécondation les embryons sont récoltés et placés dans une étuve à 28°C jusqu'au stade souhaité. Les embryons destinés à l'ablation ont été placés à 31°C pendant une journée afin d'accélérer leur développement et l'apparition de cellules *Tg(tc7:gfp)+* fortes.

### **ISH**

Les hybridations in situ ont été réalisées selon les mêmes protocoles que dans Sapède et al., 2020 et Chaigne et al., en préparation.

### **RT-qPCR**

Les ARNs totaux de 3 pools de 15 larves ont été extraits au Trizol (selon le protocole de Claudia Rödel, 2012, TRIZOL® LS Reagen protocol -Ambion, Cat#10296-) aux temps précisés. L'ADNc a été synthétisé à partir de 200ng d'ARN et la qPCR a été réalisée avec le mix Syber Green et la machine CFX96 (Biorad). La quantité d'ARN a été normalisée par la  $\beta$ -actine. Les amorces utilisées sont données en suivant.

#### ***dec1***

sens: 5'-CGCTGGATATCTCTGACATGCAAGG-3'

anti-sens: 5'-CGTGAGTTTAAGGTGTTCCGGGCAG-3'

#### ***per1a***

sens: 5'-GAGACGACGGAAAGCAAGAG-3'

anti-sens: 5'-GCTCTGAACTTCCGCTCAAA-3'

#### ***per2***

sens : 5'-GCTTCACCACACCATACAGG-3'

anti-sens : 5'-GTCTGACGGGGACGAGTCT-3'

#### ***cry1a***

sens : 5'-AGGCGTGGAGGTGATAGTTC-3'

anti-sens : 5'-TGCTGATGAGGGTCTGGAGG-3'

#### ***per1b***

sens : 5'-ATGTGCAGGCTGTAGATCCC-3'



anti-sens : 5'-CCGTCAGTTTCGCTTTTCTC-3'

### ***aanat2***

sens: 5'-GACGCCATCAGTGTGTTTG-3'

anti-sens : 5'-ATGGACAGCTCAGGACACTG-3'

### ***clock1a***

sens : 5'-CGCAAGCACAAAGAAATTG-3'

anti-sens : 5'-CCAGCATCAGCTGTGTGAAC-3'

### ***bmal1a***

sens : 5'-TGTAACGCAATGTCTCGCAAG-3'

anti-sens : 5'-GGGCCCTCGTAATGTCTTC-3'

### ***β-actine***

sens : 5'-GCCTGACGGACAGGTCAT-3'

anti-sens : 5'-ACCGCAAGATTCCATACCC-3'

### ***tefalpha***

sens : 5'-TCGCCTCTTCTACAGTTCACA-3'

anti-sens : 5'-TTCCCCATCTGCTCTTGTTT-3'

### ***reverbB1***

sens : 5'-ATCCGTCGGCATGTCAAGAG-3'

anti-sens : 5'-CTGGAGCTGACTGTTGTTTCATC-3'

## **Génotypage**

Le génotypage pour *opn4xa* a été réalisé en utilisant un protocole PCR classique (Quillien et al., 2011) avec les oligos suivants : 5'-GGACGCCTCCAAACTACTTC-3' (sens) et 5'-CGAACACCCACTCCTTGAC-3' (anti-sens). Des produits PCR de 110pb pour l'allèle wt et de 127pb pour l'allèle mutant ont été obtenus et détectés sur gel très résolutif (agarose 4%).

## **Ablation**

Les larves anesthésiées à la tricaine ont été montées dans de l'agarose 0.8% avant d'être analysées au microscope biphoton Leica SP5. L'ablation a été faite à l'objectif à eau X25, zoom 8 avec les paramètres suivants : gain 23%, offset 60% et temps de 10 à 80 ms. A la fin des ablations, celles-ci ont été vérifiées par imagerie en microscopie confocale sur le même microscope que pour l'ablation.

## **Immunofluorescence**

Les embryons ont été fixés (PFA 4% pendant au moins 2h) une semaine après l'ablation. Après dépigmentation (10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5% KOH) une immunofluorescence a été effectuée contre la GFP et HuC/D dans des individus *Tg(tcf7:gfp)*+/- avec les anticorps primaires anti GFP (Torrey Pines Biolabs) et anti HuC/D (Molecular Probes) et les anticorps secondaires anti rabbit et anti mouse couplés à alexa 488 et 533 respectivement. Un marquage des noyaux a été effectué en utilisant la ToPro (Molecular Probes). Les individus ont ensuite été montés sur lame avec du glycérol 70% pour observation en microscopie confocale (Leica SP5).

## **Test optomoteur**

Le test optomoteur a été effectué sur la base d'un test décrit précédemment (Hörnberg et al., 2013). Le même nombre de larves contrôles et mutantes/transgéniques (identifiées grâce à leur pigmentation) de 5dpf (« days post fertilization » pour jours après fécondation) ont été placées dans deux boîtes de pétri distinctes avant l'expérience. Les deux boîtes de pétri ont été disposées sur un écran d'ordinateur mis à l'horizontal puis laissées sur l'écran pendant 10 minutes dans le noir pour habitude. Le stimulus visuel ensuite affiché à l'écran consistait en une alternance de bandes blanches et noires faites sous Powerpoint (19.05cm de hauteur x 1.6cm de largeur, 4 diapositives avec des bandes décalées de 0.64cm tournant en boucle avec 0.30sec entre chaque diapositive). Une photo avant et après le stimulus (d'une durée de 1 à 10min) ont été prises à l'aide d'un smartphone. Le nombre de larves situées à gauche et à droite de la boîte de pétri par rapport au stimulus a ensuite été compté puis le pourcentage de larves placées à droite de la boîte de pétri (% de larves répondant au stimulus) a été calculé.

## **Acquisition des données d'activité locomotrice (Fig 16)**

6 jours avant le début de l'expérience (soit d-1 pour « day- 1 »), des adultes hétérozygotes sont croisés afin d'avoir au sein d'une même expérience des larves contrôles ou wild-type et mutantes provenant du même fond génétique (Fig A.a). Des adultes ayant déjà effectués au moins une première ponte (Jason Rihel, communication personnelle) sont croisés, avec si possible un seul couple par bac pour avoir le plus de traçabilité des embryons pondus dans l'expérience (couples différents, adultes zebra ou léo, mauvais développement d'une ponte en particulier, etc...). Dans le cas où les adultes ne pondent pas bien, l'utilisation d'un bac en forme de plage avec plusieurs couples dans un même bac peut améliorer les

pontes. Un séparateur (séparation des mâles et femelles d'un bac) peut être utilisé pour éviter les pontes nocturnes.

Le lendemain matin (soit d1) les œufs pondus sont récoltés (Fig 16.A.b). Il est important de mettre moins de 50 embryons par boîte pour limiter les problèmes de développement, et si possible garder le maximum d'embryons provenant d'une même ponte (Fig 16. A.c). Les embryons se développent dans un bain marie à l'animalerie à 28°C en cycle LD (lumière vers 9h15 et obscurité vers 23h15, soit 14h de lumière et 10h d'obscurité) pour qu'ils développent un rythme circadien de l'activité locomotrice robuste (Fig 16.A.d). Au moins 4 cycles LD depuis la ponte sont nécessaires pour observer par la suite un rythme robuste de l'activité locomotrice dans la majorité des larves (Hurd and Cahill, 2002). Il est important que les larves soient au même stade de développement au cours des différents types d'expériences (LD, LL, DD, etc...) car le stade de développement influence l'activité locomotrice. *Les expériences préliminaires au laboratoire avaient été faites soit après 6 cycles LD (pour les expériences se déroulant ensuite sur deux jours) ou après 5 cycles LD (pour les expériences se déroulant ensuite sur trois jours). Nous avons alors choisi d'élever les embryons pendant 5 cycles LD au cours de leur développement pour garder une continuité avec les expériences préliminaires faites au laboratoire sur trois jours.*

Le matin du 5<sup>ème</sup> cycle LD (soit d5), les larves qui ne présentent pas de problème de développement (larves hors de leur chorion, présence d'une vessie natatoire, observation de nage) sont sélectionnées et placées délicatement dans la plaque de comportement pour habitation (Fig 16. A.e). Une seule larve est placée par puit afin de pouvoir tracker le mouvement de larves individuelles après l'expérience. La plaque est ensuite replacée dans le bain marie jusqu'à la fin de l'après-midi pour que les larves continuent à se développer dans une température stable. *Les expériences préliminaires avaient été faites avec une plaque 24 puits à puits ronds et côtés opaques, mais nous avons constaté que cela n'était pas optimal. En effet nous avons peu de larves contrôles/wild-type et mutantes et étions obligé.e.s de faire beaucoup d'expériences pour comparer les larves entre elles. Il existait en plus de fortes variations entre les différentes expériences, ce qui rendait la comparaison de larves issues d'expériences différentes et de génotypes différents difficile. C'est pourquoi nous avons testé l'utilisation d'une plaque 96 puits (à puits carrés et complètement transparent) (Whatman® UNIPLATE, 105x69mm) pour pouvoir comparer le maximum de contrôles/wild-type avec des mutants au sein d'une même expérience. Cela limite ainsi le nombre d'expériences à faire et donc la variabilité dûe à la comparaison d'expériences différentes, mais au détriment d'un*

*tracé individuel d'activité locomotrice beaucoup moins robuste qu'avec la plaque 24 puits. Cela est certainement dû au fait que les puits sont plus petits dans la plaque 96 puits, ce qui limite les mouvements des larves, mais également à la forme des puits, puisque nous observons que les larves ont tendance à se placer dans les coins des puits carrés tandis qu'elles nagent en rond dans les puits ronds. Malgré ces limites, nous avons choisi de continuer à utiliser la plaque 96 puits pour tout simplement pouvoir procéder à des conclusions plus fiables sur des différences observées entre génotypes.*

En fin d'après-midi, la plaque est placée dans la Zebrabox (toujours en cycle LD) (Fig 16.A.f). Cette Zebrabox est une boîte en bois quasi hermétique équipée d'une caméra infrarouge sur le dessus de la boîte, reliée à un ordinateur pour enregistrer les films (30 frames par secondes), qui seront sauvegardés sur un disque dur externe. La Zebrabox est également équipée d'une lumière infrarouge (pour détecter les larves même dans le noir) et blanche en dessous de la plaque de comportement. Le cycle d'illumination en lumière blanche est contrôlé par un minuteur branché à une prise électrique (minuteur à picots de tranches de 15min pour éteindre ou allumer la lumière). Ce minuteur doit être placé au plus loin de la Zebrabox pour le que le bruit produit n'influe pas sur le comportement des larves. Puisque la Zebrabox ne contient pas de système de contrôle de la température, celle-ci est située dans une petite pièce obscure équipée d'un radiateur réglé à 27°C. La température est enregistrée toutes les heures à l'aide d'une sonde placée dans la Zebrabox.

Le lendemain juste avant le début du d6 (soit avant 9h du matin), l'acquisition des données commence en débutant l'enregistrement des films dans les conditions d'illuminations désirées (Fig 16.A.g).

*Les expériences préliminaires qui avaient été faites sur deux jours (de d7 jusqu'au matin de d9) ne permettaient pas de procéder par la suite à des calculs de période robustes, nous avons donc procédé à des expériences plus longues sur trois ou quatre jours (de d6 jusqu'au matin de d9 ou d10) qui permettent des calculs de période et de phase plus précis, mais tout en ce que les larves n'arrivent pas à un stade de développement où il est nécessaire de les nourrir (épuisement de leur stock de vitellus) pour avoir le moins d'influence sur leur comportement. A la fin de l'expérience, les larves pour lesquelles des problèmes morphologiques sont observés (queue tordue, absence de vessie natatoire, etc...), les puits présentant une évaporation trop importante de l'eau ainsi que les puits ne comportant pas de larve ou plus d'une larve sont enlevés de l'analyse par la suite.*

## Traitement des données d'activité locomotrice

Après l'acquisition des données (film des larves), le traitement de ces données est effectué pour extraire l'activité locomotrice de chaque larve et procéder à des calculs de période et/ou phase sur cette activité. En parallèle le génotypage de chaque larve est effectué si besoin (par PCR et/ou de par l'aspect de leur pigmentation) (Fig 16.B-C).

Le logiciel Ethovision permet de détecter chaque larve à partir des films et d'en extraire différents paramètres, dont la distance parcourue par temps donné (Fig 16.B.a). Ainsi la distance parcourue en millimètre par minute de chaque larve est calculée avec les paramètres suivants établis sur la base des expériences préliminaires et ajustés pour conserver les mêmes paramètres pour toutes les expériences :

- Detection Settings (paramètres de détection des larves) :
- Dynamic Substraction (examine le contraste absolu entre les pixels d'une image de référence et la nouvelle image numérisée, tout en mettant à jour l'image de référence sur chaque échantillon ; méthode recommandée lorsqu'il y a des différences d'illuminations au sein de l'expérience et ne requiert pas d'avoir une image de la plaque de comportement sans larve)
- Subject Color compared to background : darker (les larves sont plus sombres que le fond); Dark : 7 to 120 (paramètres de « noirceur » des larves)
- Frame Weight : 2
- Track Smoothing Profiles :
- Minimum Distance Moved : 0.2mm (distance minimale pour considérer que la larve bouge ; attention paramètre nécessaire pour ne pas observer de mouvements "fantômes »)
- Direct (A>MDM)
- Data Profiles :
- Results per time bin (time bin d'une minute)
- Ignore last time bin if incomplete
- Analysis Profiles :
- Distance moved of the center-point

Ethovision génère alors des fichiers Excel donnant la distance parcourue en millimètres par minute pour chaque larve.

Les fichiers d'une même expérience sont ensuite légèrement modifiés avec un script R (remplacer « 1 », « 2 », « 3 », ... par « Arena 1 », « Arena 2 », « Arena 3 », ...) pour ensuite être

traités par le programme wakefish de Laurent Sanchou (programme en python) pour avoir un seul fichier Excel donnant la distance parcourue en millimètre par minute sur 10 minute pour chaque larve (Fig 16.B.b). Les données correspondantes aux larves et puits présentant des problèmes sont enlevées et le bon génotype est associé à chaque larve pour ensuite pouvoir visualiser les données individuelles ou les données moyennées par génotype avec Excel ou R (Fig 16.B.c).

Après avoir calculé la période et/ou la phase de chaque larve, les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Prism. Nos données n'étant pas paramétriques, nous avons utilisé des tests non paramétriques.

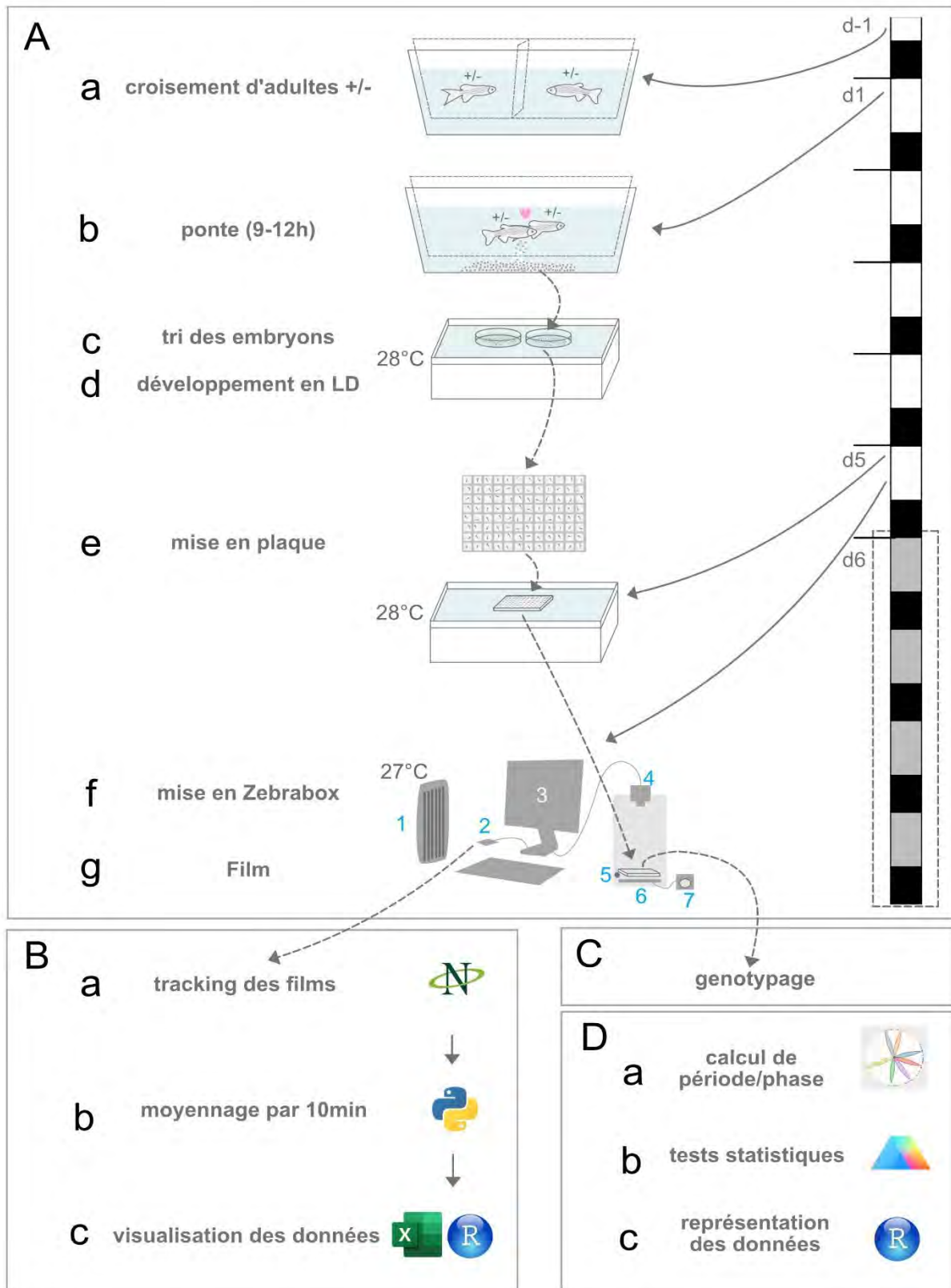
Les données sont représentées avec le logiciel R, et plus particulièrement la librairie ggplot2 pour représenter les périodes et la suite de librairies rethomics pour les données d'activité locomotrice, qui permet d'ajouter des annotations précises sur les conditions d'illuminations utilisées (Geissmann et al., 2019).

## **Startle**

Les embryons issus de croisements de poissons (*opn4xa*<sup>+/-</sup> ; *lakritz*<sup>+/-</sup>)<sup>2</sup> ont été élevés dans un cycle LD de 14h/10h dans une eau à 27°C pendant 5 cycles LD. Chaque larve a été placée dans un puit d'une plaque 96 puits (Whatman UNIPLATE) le soir du 5<sup>ème</sup> cycle LD (4dpf), puis la plaque a été introduite dans la boîte de comportement Zantiks MWP (Zantiks Ltd., Cambridge, UK). Les larves ont été mises en condition de noir constant à partir de 23h lors du 5<sup>ème</sup> cycle LD et leur comportement a été tracké par la Zantiks en unité arbitraire par seconde. Un pulse de lumière bleue a été administré de minuit à 2h dans la nuit entre le 6dpf et 7dpf. Le comportement des larves au moment des transitions lumineuses +/- 60 secondes a ensuite été extrait grâce à un script R. Les larves *lakritz* ont été identifiées sur la base de leur pigmentation, et le génotype pour *opn4xa* a été identifié par PCR.

## **Test d'une expérience de phase shift avec lumière bleue**

L'activité locomotrice et son analyse ont été réalisées, à quelques différences près, selon le protocole utilisé dans Chaigne et al. La température de la pièce a été maintenue entre 28 et 29°C tout au long de l'expérience par un système de climatisation. Afin de procéder au test, la plaque contenant les larves a été transférée à la main à CT16 (1 heure du matin) de la Zebrabox à la zantiks, où la température a été maintenue à 29°C, puis replacée dans la Zebrabox à CT18 (3 heures du matin) entre le deuxième et troisième jour en DD.



**Figure 15 : processus d'acquisition, traitement et représentation de l'activité locomotrice**

**A.** Processus d'acquisition des données (1 : radiateur à 27°C ; 2 : disque dur externe utilisé pour sauvegarder les films ; 3 : logiciel pour enregistrer les films ; 4 : caméra infrarouge ; 5 : sonde de température ; 6 : lumières infrarouge et blanche ; 7 : minuteur pour contrôler la lumière blanche). **B.** Processus de traitement des données. **C.** En parallèle du traitement des données, les larves sont génotypées par PCR ou par leur pigmentation. **D.** Représentation des données.







# DISCUSSION



Chez les mammifères, l'œil représente la seule structure impliquée dans un des effets directs de la lumière sur l'activité locomotrice, le masking, et le photoentrainement. Ces processus nécessitent une population particulière de RGCs, appelés ipRGCs ou photorécepteurs atypiques, définis par l'expression de la mélanopsine, et impliquent à la fois l'intégration de l'information lumineuse provenant des photorécepteurs classiques de la rétine par les ipRGCs et la photosensibilité intrinsèque des ipRGCs médiée par la mélanopsine. Bien que l'expression de la mélanopsine ait été observée chez tous les vertébrés étudiés, son rôle et le rôle des cellules qui l'expriment ont seulement été adressé chez des modèles mammifères nocturnes, comme la souris, et ne sont pas connus chez les vertébrés diurnes et les vertébrés non mammifères. De plus les vertébrés non mammifères possèdent d'autres structures photosensibles en plus de l'œil (œil pariétal, glande pinéale et photorécepteurs du cerveau). De ce fait nous pouvons nous demander si l'œil et les cellules à mélanopsine ont un rôle aussi crucial entre vertébrés diurnes et nocturnes ou entre vertébrés non mammifères et mammifères dans la médiation des effets directs et circadiens de la lumière sur le comportement.

Nous avons ainsi étudié certaines cellules à mélanopsine ainsi que le rôle de l'œil et de la mélanopsine chez un vertébré non mammifère diurne utilisé en chronobiologie, le poisson zèbre. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la réponse à la lumière des cellules à mélanopsine de la glande pinéale (cellules *opn4xa*), puis re-caractérisé l'expression de deux mélanopsines décrites comme étant exprimées dans les RGCs (*opn4xa* et *opn4b*). Nous avons ensuite exploré la nécessité de l'œil et de la mélanopsine *opn4xa* dans la régulation d'effets directs de la lumière sur l'activité locomotrice : le masking et la réponse à une transition lumineuse, ainsi que dans des effets de la lumière sur le rythme circadien de l'activité locomotrice : le développement de ce rythme, l'effet d'une lumière constante sur ce rythme et le photoentrainement de ce rythme.



# I. Caractérisation de deux mélanopsines exprimées dans les RGCs chez la larve de poisson zèbre : *opn4xa* et *opn4b*

## La mélanopsine *opn4xa* définit une nouvelle population de neurones de projection de la glande pinéale

Dans une étude précédente, la mélanopsine *opn4xa* avait été décrite comme exprimée dans quelques cellules placées autour de la glande pinéale, mais pas au sein de celle-ci au vu de l'absence de co-marquage entre *opn4xa* et *otx5* (Matos-Cruz et al., 2011). Cependant *otx5* ne représente pas un marqueur pan-pinéal puisqu'il n'est exprimé que dans les photorécepteurs classiques de cette structure. En combinant des hybridation *in situ* pour *opn4xa* avec un immuno-marquage anti-GFP dans les lignées *Tg(aanat2:GFP)* ou *Tg(elavl3:GFP)*, qui marquent respectivement les photorécepteurs classiques (PhR) et les neurones de projection (PN) de la glande pinéale, nous avons observé qu'*opn4xa* n'est pas exprimé dans les PhR mais dans les PN de la glande pinéale.

Nous avons ensuite caractérisé la réponse des PN *opn4xa*<sup>-</sup> et *opn4xa*<sup>+</sup> suite à un pulse de 30 minutes de lumière (réponse LIGHT ON) ou d'obscurité (réponse LIGHT OFF) avec l'expression du marqueur précoce d'activité *fos*. Les PN *opn4xa*<sup>-</sup> montrent ainsi une réponse LIGHT OFF, tandis que les PN *opn4xa*<sup>+</sup> sont les seuls PN à être activés par un pulse de lumière. Ils sont ainsi activés par une lumière blanche, bleue ou verte mais pas par une lumière rouge. Cette activation n'est pas observée dans les mutants *opn4xa*<sup>-/-</sup>, révélant qu'*opn4xa* confère une photosensibilité intrinsèque aux PN.

- ***opn4xa* définit donc une nouvelle population de neurones de projection de la glande pinéale, représentant les seuls neurones de projection de type LIGHT ON de la glande pinéale et caractérisés par une photosensibilité intrinsèque médiée par la mélanopsine *opn4xa*. La glande pinéale de la larve de poisson zèbre contient donc des cellules semblables aux ipRGCs.**

## **Les mélanopsines *opn4xa* et *opn4b* sont exprimées dans les RGCs et les interneurons de la rétine**

Chez la larve de poisson zèbre, les 5 gènes de mélanopsines sont exprimés dans la rétine, mais seul *opn4xa* avait été décrit comme exprimé dans les RGCs par hybridation *in situ* (Matos-Cruz et al., 2011). Une étude récente utilisant du séquençage des transcrits de cellules uniques suggère cependant qu'en plus d'*opn4xa*, la mélanopsine *opn4b* est également exprimée dans les RGCs (Kölsch et al., 2021). Nous avons ainsi ré-étudié l'expression de ces deux mélanopsines par hybridation *in situ* et avons observé qu'*opn4xa* et *opn4b* sont tous deux exprimés à la fois dans des interneurons et des RGCs. Nous observons un plus grand nombre de cellules *opn4xa* que de cellules *opn4b*, indiquant que certains RGCs n'expriment que *opn4xa*. Cependant Les transcrits pour *opn4xa* et *opn4b* étant trop faiblement exprimés dans l'œil, une double hybridation *in situ* pour *opn4xa* et *opn4b* est impossible et nous ne savons donc pas si ces mélanopsines sont co-exprimées ou si elles délimitent deux populations distinctes d'ipRGCs. Nous ne savons également pas si les cellules *opn4xa* et *opn4b* ont une réponse de type LIGHT ON ou LIGHT OFF et si l'expression de la mélanopsine leur confère une photosensibilité intrinsèque.

- **Il existe donc une grande diversité de cellules à mélanopsine dans la rétine de la larve de poisson zèbre, dont des ipRGCs exprimant *opn4xa* et/ou *opn4b*.**



## II. Modèles génétiques pour étudier le rôle des cellules à mélanopsine et de la mélanopsine *opn4xa*

### **Les cellules *opn4xa* de la glande pinéale ne sont plus photosensibles dans le mutant *opn4xa*<sup>-/-</sup>**

La mélanopsine *opn4xa* étant exprimée dans des ipRGCs et des cellules de la pinéale semblables aux ipRGCs, il nous a semblé intéressant d'étudier son rôle chez le poisson zèbre. A cette fin, un mutant *opn4xa*<sup>-/-</sup> a été généré au laboratoire par CRISPR/Cas9. Ce mutant présente une insertion de 17 nucléotides conduisant à un codon stop prématuré dans le second exon du gène. Ce mutant est prédit comme étant un mutant nul, et en effet bien qu'on observe toujours la présence de cellules *opn4xa* dans la rétine et la glande pinéale des larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>, aucun marquage *fos* n'est observé dans la glande pinéale de ces mêmes larves après un pulse de lumière de 30 minutes. Les cellules *opn4xa* de la glande pinéale, et possiblement de la rétine, ne sont donc plus photosensibles dans le mutant *opn4xa*<sup>-/-</sup>.

- **Le mutant *opn4xa*<sup>-/-</sup> permet donc d'étudier le rôle de la photosensibilité intrinsèque médiée par *opn4xa* dans des ipRGCs de la rétine et des cellules semblables aux ipRGCs de la glande pinéale.**

### **Les cellules *opn4xa* de la glande pinéale ne sont pas affectées dans le mutant *lakritz***

Comme différentes mélanopsines sont exprimées dans l'œil du poisson zèbre, dont *opn4xa* et *opn4b* dans les RGCs, nous avons d'abord voulu étudier le rôle global de l'œil grâce au mutant *lakritz*. Ce mutant présente un défaut de développement des RGCs et aucune connexion neuronale n'est présente entre l'œil et le cerveau. Les larves *lakritz* ont également un défaut d'agrégation des pigments, qui est une réponse des mélanophores à la lumière, et ne répondent pas au test optomoteur, utilisé comme test de vision (Kay et al., 2001; Hörnberg et al., 2013). Le mutant *lakritz* devrait donc permettre d'étudier la fonction des RGCs plus globalement la fonction neuronale de l'œil. Comme les mutations qui affectent l'œil affectent souvent la glande pinéale chez le poisson zèbre, et que des cellules à mélanopsine sont

présentes dans la glande pinéale, nous avons vérifié que les cellules *opn4xa* de la glande pinéale n'étaient pas affectées dans le mutant *lakritz*. Nous avons observé par hybridation *in situ* que les cellules *opn4xa* sont toujours présentes dans la glande pinéale mais pas dans la rétine du mutant *lakritz* et qu'elles activent toujours l'expression de *fos* suite à un pulse de lumière de 30 minutes. Ainsi les cellules à mélanopsine de la rétine, mais pas celles de la glande pinéale, sont affectées dans le mutant *lakritz*.

- **Le mutant *lakritz* représente donc un bon modèle pour étudier la fonction des RGCS (mélanopsine+ et mélanopsine-), et plus globalement la fonction neuronale de l'œil chez le poisson zèbre.**
- **Cependant puisque les larves *lakritz* présentent un défaut d'agrégation de leurs pigments, on peut se demander si les phénotypes comportementaux observés donc directement dus à la fonction de l'œil ou indirectement liée à une moins bonne pénétration de la lumière dans d'autres structures photosensibles.** Pour vérifier si le phénotype n'est pas lié à la pigmentation, il faudrait alors utiliser des larves non pigmentées. L'utilisation du PTU (composant chimique inhibant le développement des pigments) étant toxique et ayant un effet sur le comportement, une combinaison avec des mutants non pigmentés comme les mutants *nacre* ou *crysta*, qui ont une réponse au test optomoteur intacte, pourrait être envisagée (Antinucci and Hindges, 2016).

### **Les larves *Tg(atoh:gal4 ;uas:botox)* ne sont pas complètement aveugles**

En complément du mutant *lakritz*, nous avons voulu mettre au point un modèle permettant de bloquer la transmission synaptique provenant des RGCs. Nous avons pour cela utilisé le système *uas/gal4* pour exprimer la toxine botulique (*Tg(uas:botox)*) via le *Tg(atoh:gal4)* exprimé dans les RGCs. Bien que l'on observe un défaut d'agrégation des pigments dans les larves double transgéniques, nous avons observé que ces larves répondent toujours au test optomoteur, et qu'elles ne sont donc pas complètement aveugles.

- **Puisqu'elles ne sont pas complètement aveugles, les larves *Tg(atoh:gal4 ;uas:botox)* ne représentent pas un modèle adéquat pour étudier le rôle de la signalisation provenant des RGCs. Certains RGCs semblent échapper à ce système : cela remet donc en cause l'utilisation du *Tg(uas:botox)* pour bloquer la transmission synaptique**

et/ou le *Tg(atoh:gal4)* pour mener une expression dans les RGCs et/ou le système *uas/gal4*.

## **Les cellules *Tg(tcf7:gfp)* de la glande pinéale régènèrent après ablation au microscope biphoton**

Puisque les cellules *opn4xa* sont présentes en très faible nombre dans la glande pinéale et que nous disposons d'une lignée transgénique permettant de visualiser ces cellules (*Tg(tcf7:gfp)*), il est possible de réaliser l'ablation des cellules *opn4xa* de la glande pinéale au microscope biphoton. Nous avons cependant observé que l'ablation est suivie d'une régénération de cellules *Tg(tcf7:gfp)*. Bien que cela soit une donnée intéressante, cette régénération est problématique dans notre cas.

- **Puisque des cellules *Tg(tcf7:gfp)*, que nous pensons être des cellules *opn4xa*, régènèrent après ablation au microscope biphoton, ce système ne nous semble pas adapté pour étudier le rôle des cellules *opn4xa* de la glande pinéale.**



### III. Implication de l'œil et de la mélanopsine *opn4xa* dans les effets directs de la lumière

#### **L'œil, mais pas *opn4xa*, est impliqué dans un des effets directs de la lumière sur l'activité locomotrice : le masking**

Chez les mammifères, le masking (effet direct de la lumière sur l'activité locomotrice) est médié par les ipRGCs, et le masking d'un autre comportement chez la larve de poisson zèbre (la position dans une colonne d'eau médiée par une lumière bleue) a été proposé comme impliquant des RGCs exprimant la mélanopsine *opn4xa* (Lin and Jesuthasan, 2017). Nous avons donc étudié si le masking de l'activité locomotrice suite à une lumière blanche impliquait l'œil et la mélanopsine *opn4xa*.

Nous avons ainsi observé que les larves *lakritz* ont une activité locomotrice diminuée par rapport aux larves contrôles spécifiquement lors de période d'illumination du cycle LD et lors d'un pulse de lumière blanche. Cependant nous ne détectons pas ces défauts dans les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>. Cela révèle donc que l'œil est impliqué dans le masking de l'activité locomotrice, comme chez les mammifères, mais que la photosensibilité médiée par *opn4xa* dans les RGCs et la glande pinéale n'est pas nécessaire dans ce processus. Bien qu'il soit affecté, le masking est toujours présent dans les larves *lakritz* puisque nous observons toujours une élévation de l'activité locomotrice lors d'un pulse de lumière. Cela signifie donc que ce n'est pas la seule structure photosensible impliquée dans ce processus, contrairement à l'œil des mammifères. En plus de l'œil, les photorécepteurs classiques de la glande pinéale ou d'autres photorécepteurs présents dans le cerveau pourraient médier le masking chez le poisson zèbre.

- **Le rôle de l'œil dans le masking de l'activité locomotrice est donc conservé chez le poisson zèbre, mais ce n'est pas la seule structure impliquée dans ce processus contrairement aux mammifères. La photosensibilité médiée par *opn4xa* dans l'œil et la glande pinéale n'est pas nécessaire dans le processus de masking.**

#### **L'œil, mais pas *opn4xa*, est impliqué dans un des effets directs de la lumière sur l'activité locomotrice : la réponse à une transition lumineuse**

Lors d'une transition lumineuse, on peut observer une réponse locomotrice des larves de poisson zèbre. La réponse locomotrice immédiate suite à une transition lumineuse lumière vers obscurité (startle response LIGHT OFF) nécessite la fonction de l'œil, puisqu'elle est complètement absente chez les larves énuclées (Fernandes et al., 2012). La startle LIGHT ON pourrait également impliquer l'œil puisque les larves *chk*, qui n'ont pas d'œil mais sont également affectées pour d'autres structures, n'ont pas de réponse LIGHT ON ou LIGHT OFF. La réponse locomotrice à court terme suite à une transition LIGHT OFF (dans la minute qui suit la transition lumineuse) implique plusieurs structures, dont la glande pinéale, l'œil, et la région *otpa+* de l'hypothalamus. Nous avons donc testé si l'œil et la photosensibilité médiée par *opn4xa* étaient impliqués dans la réponse à une transition lumineuse LIGHT ON et LIGHT OFF à court terme et moyen terme avec une lumière blanche ou bleue.

Nous avons observé que la réponse immédiate LIGHT OFF est absente chez les larves *lakritz*, ce qui confirme que l'œil est nécessaire dans ce processus, mais est intacte dans les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>. Ainsi la photosensibilité intrinsèque des cellules de l'œil via *opn4xa* n'est pas nécessaire dans ce processus. La réponse à court terme LIGHT OFF est quant à elle diminuée chez les larves *lakritz*, en accord avec le fait que l'œil n'est pas la seule structure impliquée dans ce processus. Cependant cette réponse est intacte chez les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>, ce qui signifie que la photosensibilité intrinsèque des cellules *opn4xa* de l'œil et de la glande pinéale ne sont pas nécessaires. Enfin la réponse LIGHT ON de nos larves wild type n'est pas assez marquée pour statuer sur une réponse immédiate ou à court terme et conclure avec certitude sur la présence ou non d'un phénotype. La réponse globale LIGHT ON semble cependant diminuée chez les larves *lakritz* mais n'est pas affectée chez les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>.

- **L'œil est nécessaire pour la réponse immédiate à une transition LIGHT OFF blanche ou bleue, mais ce processus ne nécessite pas la photosensibilité intrinsèque de l'œil et de la glande pinéale médiée par *opn4xa*.**
- **L'œil est une des structures impliquées dans la réponse à court terme à une transition LIGHT OFF blanche ou bleue, mais ne nécessite pas *opn4xa*.**

## IV. Implication de l'œil et de la mélanopsine *opn4xa* dans les effets circadiens de la lumière

### **L'œil et la mélanopsine *opn4xa* ne sont pas nécessaires pour le développement du rythme circadien de l'activité locomotrice**

Chez le poisson zèbre, une transition lumineuse au cours du développement est nécessaire pour l'établissement de l'horloge circadienne moléculaire et du rythme circadien de l'activité locomotrice (Hurd and Cahill, 2002; Dekens and Whitmore, 2008). Nous avons donc testé si la photodétection provenant de l'œil et la mélanopsine *opn4xa* étaient nécessaires pour le développement d'un rythme circadien de l'activité locomotrice capable de persister de façon robuste en conditions constantes. Ainsi nous avons observé que les larves *lakritz* et les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> ont une activité locomotrice rythmique en LD, et ce rythme est maintenu en DD pendant au moins quatre jours avec une période similaire aux larves contrôles. De plus nous n'avons pas observé de défauts majeurs de l'horloge moléculaire, étudiée par RT-qPCR à partir de pools de larves entières, ni en LD, ni en LL.

- **Ni la photodétection provenant de l'œil et ni celle médiée par *opn4xa* ne sont nécessaires pour l'établissement du rythme circadien de l'activité locomotrice et ne semblent donc pas nécessaire pour le bon développement de l'horloge circadienne.**

### **Rôle de l'œil et de la mélanopsine *opn4xa* en lumière constante (LL)**

Chez les mammifères nocturnes, la période de l'activité locomotrice en DD est de moins de 24h, ce qui reflète la période endogène de l'horloge circadienne, et elle est de plus de 24h en LL, témoin de l'effet de la lumière constante sur l'horloge circadienne. La mélanopsine est impliquée dans ce processus, puisque les souris *opn4*<sup>-/-</sup> ont un allongement de la période moindre en LL par rapport aux souris contrôles (Panda et al., 2002). Nous avons donc étudié le rythme de l'activité locomotrice des larves *lakritz* et des larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> en LL pour voir si une lumière constante était capable d'avoir un effet similaire sur l'horloge circadienne de ces larves.

Dans les conditions utilisées, nous n'observons pas de différence de période de nos larves mutantes par rapport aux larves contrôles, cependant nous n'observons pas non plus de différence de période évidente entre nos conditions DD et LL chez nos larves contrôles. Il est possible que nos expériences LL ne durent pas assez longtemps pour qu'une lumière constante ait un effet sur l'horloge circadienne chez les larves wild type. En effet un léger décalage des rythmes d'activité locomotrice apparaît lors du 3<sup>ème</sup> jour de nos expériences entre les larves *opn4xa*<sup>+/+</sup> et *opn4xa*<sup>-/-</sup>, qui pourrait révéler un phénotype apparaissant plus tardivement. Cependant ce décalage apparaît plus spécifiquement dans les expériences individuelles LL présentant une différence du niveau d'activité entre les larves *opn4xa*<sup>+/+</sup> et *opn4xa*<sup>-/-</sup>. Puisque la différence de niveau d'activité apparaît dès le premier jour de l'expérience LL et que l'on n'observe pas de différence de niveau d'activité dans nos expériences LD, il est donc difficile de savoir si la différence du niveau d'activité et le décalage du rythme de l'activité lors du 3<sup>ème</sup> cycle sont réellement en lien avec les conditions d'illumination.

- **Nos expériences LL n'étant pas assez robustes, il est difficile de conclure si l'œil et la mélanopsine *opn4xa* sont impliqués ou non dans la médiation de l'effet d'une lumière constante sur l'horloge circadienne et l'activité locomotrice.**

### **L'œil et la mélanopsine *opn4xa* ne sont pas nécessaires pour le photoentrainement de l'activité locomotrice**

Chez les souris, l'œil et les ipRGCs sont nécessaires au photoentrainement du rythme de l'activité locomotrice, en effet les souris énuclées ou ne possédant pas de RGCs sont en free run en LD (Freedman et al., 1999; Wee et al., 2002; Brzezinski et al., 2005). C'est le cas également des souris dont les ipRGCs ont été génétiquement ablatés ou dont la neurotransmission a été abolie (Güler et al., 2007; Kofuji et al., 2016). Ce photoentrainement implique la mélanopsine, puisque le décalage de phase induit par un pulse en début de nuit est diminué chez les souris *opn4*<sup>-/-</sup> (Panda et al., 2002). Nous avons ainsi testé la nécessité de l'œil (larves *lakritz*) et de la mélanopsine *opn4xa* (larves *opn4xa*<sup>-/-</sup>), exprimée dans l'œil et la glande pinéale, deux structures candidates de la médiation du photoentrainement chez le poisson zèbre, dans le photoentrainement de l'activité locomotrice. Pour ce faire, nous avons



étudié l'activité locomotrice des larves mutantes en LD et développé un protocole de phase shift de l'activité locomotrice utilisant un pulse de lumière de 2 heures en début de nuit.

Nous avons observé que les larves *lakritz* ont une activité locomotrice entraînée au cycle LD, et qu'un pulse de lumière induit un décalage de phase de l'activité locomotrice de la même manière que chez les larves contrôles. Ainsi la fonction de l'œil ne semble pas importante dans le photoentrainement de l'activité locomotrice chez la larve de poisson zèbre, contrairement à ce qui est le cas chez les mammifères. De plus les larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> et *lakritz;opn4xa*<sup>-/-</sup> ne montrent pas de défaut de décalage de phase de l'activité locomotrice. Cela signifie donc que la photosensibilité médiée par *opn4xa* ne semble pas nécessaire dans le photoentrainement, et qu'une compensation entre une fonction de l'œil et une fonction d'*opn4xa* de la glande pinéale n'explique pas l'absence de phénotype.

- **La fonction de l'œil et la photosensibilité médiée par *opn4xa* ne semblent pas nécessaires pour le photoentrainement de l'activité locomotrice chez le poisson zèbre. Cela appuie une profonde différence dans le processus de photoentrainement entre les mammifères et le poisson zèbre.**

En résumé, chez le poisson zèbre nous avons observé dans nos expériences que l'œil est un des médiateurs du masking et de la réponse à une transition lumineuse, et n'est pas nécessaire pour le photoentrainement de l'activité locomotrice. La mélanopsine *opn4xa*, exprimée dans l'œil et la glande pinéale, n'est pas nécessaire dans le masking, la réponse à une transition lumineuse et le photoentrainement de l'activité locomotrice. Enfin une compensation entre l'œil et la photosensibilité de la glande pinéale médiée par *opn4xa* n'explique pas l'absence de rôle apparent de l'œil et de la mélanopsine *opn4xa* dans le photoentrainement.

Ces travaux démontrent ainsi une profonde différence dans la médiation des effets directs et circadiens de la lumière entre les mammifères et le poisson zèbre, et amènent ainsi plusieurs questions :

Quel sont les autres rôles possibles des cellules à mélanopsine *opn4xa* et *opn4b* chez le poisson zèbre ?

Quelles structures pourraient être impliquées dans le photoentrainement chez le poisson zèbre ?

Est-ce que la différence de la médiation des effets directs et circadiens de la lumière peut être étendue aux autres vertébrés non mammifères ?

## V. Quels sont les autres rôles possibles des cellules à mélanopsine chez le poisson zèbre ?

Comme expliqué en introduction, les cellules à mélanopsine *opn4xa* et *opn4b* de la rétine pourraient être impliquées dans la préférence des larves pour un compartiment fortement éclairé. En effet l'ablation chimique de tous les RGCs ou des RGCs *eomesa* (dont certains expriment *opn4xa* et/ou *opn4b*) abolit cette préférence (Kölsch et al., 2021).

Le changement de pigmentation induit par la lumière (agrégation ou dispersion des pigments) est un autre processus qui pourrait impliquer *opn4xa* et *opn4b* dans la rétine ou directement dans les mélanophores. En effet une énucléation abolit l'agrégation des pigments, mais pas la dispersion des pigments, qui semble médiée par une photosensibilité intrinsèque aux mélanophores puisqu'elle persiste dans les queues isolées. L'expression d'*opn4xa* et d'*opn4b* a également été décrite dans la queue de poisson zèbre (Shiraki et al., 2010).

Ainsi il serait intéressant d'étudier si la préférence pour un compartiment fortement éclairé et le changement de pigmentation sont intacts chez des larves *opn4xa*<sup>-/-</sup> et/ou *opn4b*<sup>-/-</sup>.

Afin d'avoir une idée non biaisée du rôle des cellules à mélanopsine chez le poisson zèbre, une des possibilités est de caractériser les cibles de ces cellules, soit à l'aide de lignées transgéniques (comme la lignée *Tg(tcf7:gfp)* pour les cellules *opn4xa* de la glande pinéale), ou en comparant la différence d'activité des neurones de différentes structures suite à un pulse de lumière blanche ou bleue entre des larves wild types et mutantes pour la mélanopsine étudiée grâce à du calcium imaging (Kettunen, 2020). Cependant cela nécessite d'identifier des cibles ayant un rôle déjà défini, ou de définir le rôle de cette structure.

L'utilisation du calcium imaging permettrait également de mieux caractériser la réponse à la lumière des cellules à mélanopsine afin de connaître leur timing d'activation (activation immédiate, à court ou long terme ?), si elles répondent à une lumière de faible ou de forte intensité, si leur réponse est soutenue au cours de l'illumination ou non, si leur réponse varie au cours du développement, si leur réponse est modifiée par la présence ou non des photorécepteurs classiques de la rétine ou de la glande pinéale, etc... Cela permettrait

ainsi de guider la recherche du rôle des cellules à mélanopsine dans certains comportements (comportement immédiatement induit par la lumière, comportement induit par une lumière de faible ou forte intensité, etc...)

Enfin puisqu'*opn4xa* semble être la première mélanopsine à être exprimée (elle est exprimée dès 1dpf dans la glande pinéale), cette mélanopsine et/ou les cellules qui l'expriment auraient possiblement un rôle dans des stades de développement beaucoup plus précoces que ceux que nous avons étudiés. Ainsi elles pourraient par exemple avoir un rôle dans le développement de structures photosensibles, dont la glande pinéale, ou le développement de leurs circuits neuronaux (les ipRGCs des mammifères sont par exemple nécessaires pour la bonne position des photorécepteurs de la rétine et la bonne connexion de l'œil avec le cerveau (Chew et al., 2017; Tufford et al., 2018).

## VI. Quelles sont les structures impliquées dans le photoentrainement chez le poisson zèbre ?

### Rôle de l'œil et de la mélanopsine *opn4xa* dans le photoentrainement

Nos travaux montrent que l'œil et la mélanopsine *opn4xa* ne semblent pas essentiels dans le développement, l'influence de la lumière, et le processus de photoentrainement des rythmes circadiens chez le poisson zèbre. Cependant comme avec tout résultat négatif, nous ne pouvons pas conclure que cette structure et cette mélanopsine ne sont pas impliquées dans ces processus, pour des raisons techniques et biologiques :

- nous n'avons observé ces processus qu'au niveau d'un comportement, l'activité locomotrice, à certains stades de développement. L'œil et la mélanopsine *opn4xa* pourraient avoir un rôle dans un autre comportement, ou à un stade de développement plus précoce, ou dans un processus plus local (régulation de l'horloge circadienne au niveau de la glande pinéale par exemple).
- nous sommes limités sur la durée des expériences de comportement (expériences possibles jusqu'à ce que les larves ne puissent plus se nourrir de leur vitellus), et il est possible que des phénotypes apparaissent de façon plus tardive dans nos larves mutantes en DD ou en LL.
- nous n'avons testé le photoentrainement qu'avec un protocole, à savoir un pulse de lumière blanche d'une longue durée (2 heures) appliqué en début de nuit à un certain stade de développement. Nous ne pouvons ainsi pas exclure qu'avec d'autres conditions (longueur d'onde, intensité de la lumière, durée du pulse, moment d'administration du pulse au niveau du temps circadien et au niveau du stade de développement des larves) ou un autre type de protocole (par exemple élever les œufs et embryons en noir constant et les soumettre à un pulse de lumière blanche ou bleue à certains stades de développement pour observer si le rythme circadien de l'activité locomotrice se développe) un phénotype pourrait être observé dans nos larves mutantes.
- l'œil et la mélanopsine *opn4xa* font peut-être partie d'un système robuste impliquant plusieurs structures photosensibles dans lequel n'enlever qu'une de ces structures

n'induirait aucun changement ou un changement trop faible pour être détecté dans nos expériences du fait d'une puissance statistique trop faible.

## **Structures candidates du photoentrainement chez le poisson zèbre**

Les autres structures potentiellement impliquées dans le photoentrainement de l'activité locomotrice sont nombreuses chez le poisson zèbre. Elles incluent bien entendu la glande pinéale, puisque dans notre étude nous n'avons testé que le rôle de la photosensibilité de la glande pinéale médiée par *opn4xa*. On pourrait alors tester le rôle de la glande pinéale en combinant une ablation des photorécepteurs classiques grâce au transgène *Tg(aanat2:ntr)* avec le mutant *opn4xa*<sup>-/-</sup> (Gandhi et al., 2015), ou utiliser un *Tg(flh:ntr)*, exprimé dans la notochorde et la glande pinéale. Puisque à priori aucun autre type de neurone de projection n'est photosensible, cela éliminerait toute photosensibilité provenant de la glande pinéale. Les autres structures exprimant des mélanopsines sont aussi des candidates intéressantes : *opn4a* est exprimé dans la région préoptique, *opn4b* dans le cerveau antérieur et la région thalamique, et *opn4.1* dans un domaine localisé entre la région ventriculaire à la jonction entre le cerveau postérieur et la moelle épinière antérieure (Matos-Cruz et al., 2011). D'autres opsines sont exprimées dans le cerveau de poisson zèbre, mais leur patron d'expression n'est pour l'instant pas défini chez la larve (Davies et al., 2015). Afin de définir d'autres régions candidates, il serait possible d'étudier l'induction de l'expression de gènes de l'horloge (comme *per2* ou *cry1a*) dans le cerveau suite à pulse de lumière, comme celui utilisé dans nos expériences de phase shift.

Enfin, puisque qu'une la plupart des tissus du poisson zèbre expriment au moins une opsine que ses organes et cellules en culture sont directement photoentrainables, le photoentrainement de l'activité locomotrice du poisson zèbre pourrait impliquer des photorécepteurs hors du cerveau, par exemple directement au sein de la moelle épinière ou des muscles.

## **Comment définir les structures/cellules/opsines impliquées dans le photoentrainement chez le poisson zèbre ?**

Si le processus de photoentrainement du système circadien du poisson zèbre est très robuste et implique différentes structures photosensibles se pose la question de comment

mettre en évidence ces structures. En effet on s'attend alors à ce qu'enlever un type d'opsine/cellule/structure n'induit qu'un subtil changement qui demanderait une puissance statistique plus importante que celle dont nous disposons actuellement dans nos expériences comportementales (puissance statistique dans le sens différence minimale que nous serions à même de détecter dans nos expériences).

Il conviendrait ainsi d'enlever le maximum de structures/cellules candidates à la fois et d'ensuite réduire petit à petit le nombre de structures/cellules candidates à enlever pour parvenir aux structures/cellules impliquées selon les phénotypes obtenus. Une approche complémentaire consisterait à cibler les photopigments. Il a récemment été montré qu'il était possible d'effectuer par CRISPR/Cas9 des KO directement en FO, et ce jusqu'à trois KO en simultané (Kroll et al., 2021). Ainsi il serait intéressant de tenter un KO simultané des 5 mélanopsines (5 KO en FO ou 3 KO en FO dans un double mutant) et étudier si le photoentrainement est intact avec une lumière blanche ou bleue.

Une autre possibilité serait de construire un modèle de poisson zèbre complètement aveugle en trouvant un élément affectant la voie de phototransduction de toutes les opsines, mais qui n'affecterait aucun autre RCPG (récepteur à 7 domaines transmembranaires) puis d'étudier sa capacité de sauvetage en le faisant réexprimer dans certaines structures, d'une manière similaire à la façon dont ont été identifiés les rôles de chaque groupe de neurones clock chez la drosophile.

Enfin on pourrait tester non pas si certaines cellules sont nécessaires dans le photoentrainement, mais tester si elles sont suffisantes pour médier un photoentrainement. Pour ce faire, il faudrait par exemple utiliser le même protocole de phase shift utilisé dans nos travaux, mais remplacer le pulse de lumière par une activation spécifique de certaines cellules. Ne pouvant pas utiliser l'optogénétique, cette activation pourrait utiliser un transgène codant pour un récepteur activé par un composé chimique ou de façon magnétique, comme le récepteur TRPM8 activé par le menthol, ou le récepteur TRPV4 fusionné avec la ferritin (« Magneto ») activé par un champ magnétique (Chen et al., 2016; Wheeler et al., 2016). En combinant ces outils avec un *Tg(ato5:Récepteur)* ou les transgènes *Tg(eomesa:QF2)* ; *Tg(QUAS:switchRécepteur)*, *Tg(ato5 :Cre)*, on pourrait par exemple tester si l'activation des RGCs ou de la population de RGCs *eomesa* (qui comprend des RGCs *opn4b* et *opn4xa*) est suffisante pour induire un décalage de phase de l'activité locomotrice (Kölsch et al., 2021).





## VII. Une robustesse de la photodétection spécifique au poisson zèbre ou étendue aux vertébrés non mammifères ?

Les effets directs et circadiens de la lumière semblent donc impliquer de nombreuses structures chez la larve poisson zèbre. Est-ce que cette robustesse est observée dans la nature, ou est-ce un avantage sélectionné en laboratoire, où les conditions d'illuminations, de nourrissage et d'entrée et sorties dans l'animalerie sont rythmées et constants, ce qui conférerait un avantage pour la nourriture et moins de stress aux poissons ayant un rythme circadien bien photoentrainé ?

Si cette robustesse est conservée en conditions naturelle, on peut alors se demander pourquoi existe-t'il une si grande robustesse dans ces processus chez cette espèce, et est-ce que cette robustesse est conservée chez l'adulte ? Est-ce une caractéristique spécifique de la larve, qui aurait par exemple plus besoin d'éviter les prédateurs nocturnes que les adultes, ce qui nécessiterait un photoentrainement très robuste, ou pour laquelle cela conférerait un avantage non négligeable dans son développement pour se nourrir de proies diurnes ?

Cette robustesse pourrait aussi être en lien indirect avec l'univers aquatique dans lequel évolue le poisson zèbre. En ce sens, la grande diversité d'opsine exprimée permettrait d'apprécier de manière précise la distorsion de la lumière dans l'eau, pour par exemple évaluer la profondeur à laquelle navigue le poisson ou évaluer la position d'un prédateur ou d'une proie. Ainsi les poissons exprimant un grand nombre d'opsines auraient un avantage évolutif, ce qui permettrait indirectement une redondance dans la médiation des effets directs et circadiens de la lumière. Cette redondance ne conférerait pas un avantage en soi mais serait un à côté direct de la sélection de la diversité d'opsines et de structures photosensibles dues au milieu aquatique.

La robustesse des processus de médiation des effets directs et circadiens de la lumière pourrait également être une caractéristique plus globale des vertébrés non mammifères. Ainsi, plusieurs structures semblent impliquées dans le photoentrainement et/ou le masking chez plusieurs lézards et oiseaux, dont l'œil, la glande pinéale et d'autres photorécepteurs présents dans le cerveau (voir Introduction). Cette diversité d'opsines et de structures photosensibles, et donc la robustesse des processus de médiation des effets directs et circadiens de la lumière, aurait été perdue au cours de l'évolution chez les mammifères. Une théorie appelée « nocturnal bottleneck » est en lien avec cette hypothèse : elle prétend en

effet que les mammifères, lors des temps des dinosaures, sont devenus nocturnes pour échapper aux prédateurs, ce qui aurait indirectement conduit à la disparition de la diversité d'opsines et de structures photosensibles (Gerkema et al., 2013).





- Abrahamson, E.E., Leak, R.K., and Moore, R.Y. (2001). The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* *12*, 435–440.
- Agrawal, P., Houl, J.H., Gunawardhana, K.L., Liu, T., Zhou, J., Zoran, M.J., and Hardin, P.E. (2017). *Drosophila* CRY Entrains Clocks in Body Tissues to Light and Maintains Passive Membrane Properties in a Non-clock Body Tissue Independent of Light. *Current Biology* *27*, 2431-2441.e3.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z.S., and Lee, C.C. (2001). MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *J. Biol. Rhythms* *16*, 100–104.
- Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998). A Mutant *Drosophila* Homolog of Mammalian Clock Disrupts Circadian Rhythms and Transcription of period and timeless. *Cell* *93*, 791–804.
- Antinucci, P., and Hindges, R. (2016). A crystal -clear zebrafish for in vivo imaging. *Sci Rep* *6*, 1–10.
- Appelbaum, L., Vallone, D., Anzulovich, A., Ziv, L., Tom, M., Foulkes, N.S., and Gothilf, Y. (2006). Zebrafish arylalkylamine-N-acetyltransferase genes - targets for regulation of the circadian clock. *J. Mol. Endocrinol.* *36*, 337–347.
- Arendt, J. (2019). Melatonin: Countering Chaotic Time Cues. *Front. Endocrinol.* *10*.
- Aschoff, J. (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* *49*, 225–249.
- Baver, S.B., Pickard, G.E., Sollars, P.J., and Pickard, G.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.
- Beale, A., Guibal, C., Tamai, T.K., Klotz, L., Cowen, S., Peyric, E., Reynoso, V.H., Yamamoto, Y., and Whitmore, D. (2013). Circadian rhythms in Mexican blind cavefish *Astyanax mexicanus* in the lab and in the field. *Nature Communications* *4*, 2769.
- Bellingham, J., Chaurasia, S.S., Melyan, Z., Liu, C., Cameron, M.A., Tarttelin, E.E., Iuvone, P.M., Hankins, M.W., Tosini, G., and Lucas, R.J. (2006). Evolution of melanopsin photoreceptors: discovery and characterization of a new melanopsin in nonmammalian vertebrates. *PLoS Biol.* *4*, e254.
- Bene, F.D., Wyart, C., Robles, E., Tran, A., Looger, L., Scott, E.K., Isacoff, E.Y., and Baier, H. (2010). Filtering of Visual Information in the Tectum by an Identified Neural Circuit. *Science* *330*, 669–673.
- Ben-Moshe, Z., Alon, S., Mracek, P., Faigenbloom, L., Tovin, A., Vatine, G.D., Eisenberg, E., Foulkes, N.S., and Gothilf, Y. (2014). The light-induced transcriptome of the zebrafish pineal gland reveals complex regulation of the circadian clockwork by light. *Nucleic Acids Res.* *42*, 3750–3767.
- Ben-Moshe Livne, Z., Alon, S., Vallone, D., Bayleyen, Y., Tovin, A., Shainer, I., Nisembaum, L.G., Aviram, I., Smadja-Storz, S., Fuentes, M., et al. (2016). Genetically Blocking the Zebrafish Pineal Clock Affects Circadian Behavior. *PLoS Genet.* *12*, e1006445.

- Berg, D.J., Kartheiser, K., Leyrer, M., Saali, A., and Berson, D.M. (2019). Transcriptomic Signatures of Postnatal and Adult Intrinsically Photosensitive Ganglion Cells. *ENeuro* 6.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070–1073.
- Bhadra, U., Thakkar, N., Das, P., and Pal Bhadra, M. (2017). Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human. *Sleep Med.* 35, 49–61.
- Binkley, S. (1977). Constant Light: Effects on the Circadian Locomotor Rhythm in the House Sparrow. *Physiological Zoology* 50, 170–181.
- Bolliet, V., Bégay, V., Ravault, J.-P., Ali, M.A., Collin, J.-P., and Falcón, J. (1994). Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: A study using organ and cell culture. *Journal of Pineal Research* 16, 77–84.
- Brown, L.A., Fisk, A.S., Pothecary, C.A., and Peirson, S.N. (2019). Telling the Time with a Broken Clock: Quantifying Circadian Disruption in Animal Models. *Biology (Basel)* 8.
- Brown, R.E., Basheer, R., McKenna, J.T., Strecker, R.E., and McCarley, R.W. (2012). CONTROL OF SLEEP AND WAKEFULNESS. *Physiol Rev* 92, 1087–1187.
- Brzezinski, J.A., Brown, N.L., Tanikawa, A., Bush, R.A., Sieving, P.A., Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., and Glaser, T. (2005). Loss of circadian photoentrainment and abnormal retinal electrophysiology in *Math5* mutant mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2540–2551.
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., and Bradfield, C.A. (2000). *Mop3* Is an Essential Component of the Master Circadian Pacemaker in Mammals. *Cell* 103, 1009–1017.
- Cahill, G.M. (1996). Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Research* 708, 177–181.
- Calligaro, H., Kinane, C., Bennis, M., Coutanson, C., and Dkhissi-Benyahya, O. (2020). A standardized method to assess the endogenous activity and the light-response of the retinal clock in mammals. *Mol Vis* 26, 106–116.
- Campbell, S.S., and Murphy, P.J. (1998). Extraocular Circadian Phototransduction in Humans. *Science* 279, 396–399.
- Cassone, V.M. (2014). Avian circadian organization: A chorus of clocks. *Frontiers in Neuroendocrinology* 35, 76–88.
- Cavallari, N., Frigato, E., Vallone, D., Fröhlich, N., Lopez-Olmeda, J.F., Foà, A., Berti, R., Sánchez-Vázquez, F.J., Bertolucci, C., and Foulkes, N.S. (2011). A Blind Circadian Clock in Cavefish Reveals that Opsins Mediate Peripheral Clock Photoreception. *PLOS Biology* 9, e1001142.
- Cermakian, N., Pando, M.P., Thompson, C.L., Pinchak, A.B., Selby, C.P., Gutierrez, L., Wells, D.E., Cahill, G.M., Sancar, A., and Sassone-Corsi, P. (2002). Light Induction of a Vertebrate Clock Gene Involves Signaling through Blue-Light Receptors and MAP Kinases. *Current Biology* 12, 844–848.

- Challet, E. (2007). Minireview: Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals. *Endocrinology* *148*, 5648–5655.
- Chaurasia, S.S., Rollag, M.D., Jiang, G., Hayes, W.P., Haque, R., Natesan, A., Zatz, M., Tosini, G., Liu, C., Korf, H.W., et al. (2005). Molecular cloning, localization and circadian expression of chicken melanopsin (Opn4): differential regulation of expression in pineal and retinal cell types. *Journal of Neurochemistry* *92*, 158–170.
- Chen, S., Chiu, C.N., McArthur, K.L., Fetcho, J.R., and Prober, D.A. (2016). TRP channel mediated neuronal activation and ablation in freely behaving zebrafish. *Nat Methods* *13*, 147–150.
- Chen, S., Reichert, S., Singh, C., Oikonomou, G., Rihel, J., and Prober, D.A. (2017). Light-Dependent Regulation of Sleep and Wake States by Prokineticin 2 in Zebrafish. *Neuron* *95*, 153-168.e6.
- Chen, S.-K., Badea, T.C., and Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature* *476*, 92–95.
- Chew, K.S., Renna, J.M., McNeill, D.S., Fernandez, D.C., Keenan, W.T., Thomsen, M.B., Ecker, J.L., Loevinsohn, G.S., VanDunk, C., Vicarel, D.C., et al. (2017). A subset of ipRGCs regulates both maturation of the circadian clock and segregation of retinogeniculate projections in mice. *ELife* *6*, e22861.
- Chou, T.C., Scammell, T.E., Gooley, J.J., Gaus, S.E., Saper, C.B., and Lu, J. (2003). Critical Role of Dorsomedial Hypothalamic Nucleus in a Wide Range of Behavioral Circadian Rhythms. *J Neurosci* *23*, 10691–10702.
- Cohen, R.A., and Albers, H.E. (1991). Disruption of human circadian and cognitive regulation following a discrete hypothalamic lesion: a case study. *Neurology* *41*, 726–729.
- Crestani, C.C., Alves, F.H., Gomes, F.V., Resstel, L.B., Correa, F.M., and Herman, J.P. (2013). Mechanisms in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Involved in Control of Autonomic and Neuroendocrine Functions: A Review. *Curr Neuropharmacol* *11*, 141–159.
- Crowe-Riddell, J.M., Simões, B.F., Partridge, J.C., Hunt, D.M., Delean, S., Schwerdt, J.G., Breen, J., Ludington, A., Gower, D.J., and Sanders, K.L. (2019). Phototactic tails: Evolution and molecular basis of a novel sensory trait in sea snakes. *Molecular Ecology* *28*, 2013–2028.
- Csernus, V., Ghosh, M., and Mess, B. (1998). Development and control of the circadian pacemaker for melatonin release in the chicken pineal gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* *110*, 19–28.
- Csernus, V., Faluhelyi, N., and Nagy, A.D. (2005). Features of the circadian clock in the avian pineal gland. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1040*, 281–287.
- Czeisler, C.A., Shanahan, T.L., Klerman, E.B., Martens, H., Brotman, D.J., Emens, J.S., Klein, T., and Rizzo, J.F. (2009). *Suppression of Melatonin Secretion in Some Blind Patients by Exposure to Bright Light* (Massachusetts Medical Society).
- Daan, S. (2000). Colin Pittendrigh, Jürgen Aschoff, and the Natural Entrainment of Circadian Systems. *J Biol Rhythms* *15*, 195–207.

- Davern, P.J., and Head, G.A. (2011). Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *38*, 136–143.
- Davies, W.I.L., Zheng, L., Hughes, S., Tamai, T.K., Turton, M., Halford, S., Foster, R.G., Whitmore, D., and Hankins, M.W. (2011). Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 4115–4132.
- Davies, W.I.L., Tay, B.-H., Zheng, L., Danks, J.A., Brenner, S., Foster, R.G., Collin, S.P., Hankins, M.W., Venkatesh, B., and Hunt, D.M. (2012). Evolution and Functional Characterisation of Melanopsins in a Deep-Sea Chimaera (Elephant Shark, *Callorhinchus milii*). *PLoS One* *7*.
- Davies, W.I.L., Tamai, T.K., Zheng, L., Fu, J.K., Rihel, J., Foster, R.G., Whitmore, D., and Hankins, M.W. (2015). An extended family of novel vertebrate photopigments is widely expressed and displays a diversity of function. *Genome Res* *25*, 1666–1679.
- Debruyne\*, J., Hurd, M.W., Gutiérrez, L., Kaneko, M., Tan, Y., Wells, D.E., and Cahill, G.M. (2004). ISOLATION AND PHENOGENETICS OF A NOVEL CIRCADIAN RHYTHM MUTANT IN ZEBRAFISH. *Journal of Neurogenetics* *18*, 403–428.
- Debruyne, J.P., Noton, E., Lambert, C.M., Maywood, E.S., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (2006). A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron* *50*, 465–477.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (2007). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci* *10*, 543–545.
- Dekens, M.P.S., and Whitmore, D. (2008). Autonomous onset of the circadian clock in the zebrafish embryo. *EMBO J.* *27*, 2757–2765.
- Delaunay, F., Thisse, C., Marchand, O., Laudet, V., and Thisse, B. (2000). An Inherited Functional Circadian Clock in Zebrafish Embryos. *Science* *289*, 297–300.
- DelRosso, L.M., Hoque, R., James, S., Gonzalez-Toledo, E., and Chesson, A.L. (2014). Sleep-wake pattern following gunshot suprachiasmatic damage. *J Clin Sleep Med* *10*, 443–445.
- Dibner, C., Schibler, U., and Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 517–549.
- Drivenes, Ø., Sjøviknes, A.M., Ebbesson, L.O.E., Fjose, A., Seo, H.-C., and Helvik, J.V. (2003). Isolation and characterization of two teleost melanopsin genes and their differential expression within the inner retina and brain. *J. Comp. Neurol.* *456*, 84–93.
- Ebihara, S., and Kawamura, H. (1981). The role of the pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of circadian locomotor rhythms in the Java sparrow, *Padda oryzivora*. *J. Comp. Physiol.* *141*, 207–214.
- Ebling, F., and Piggins, H. (2020). *Neuroendocrine Clocks and Calendars*.
- Emran, F., Rihel, J., Adolph, A.R., Wong, K.Y., Kraves, S., and Dowling, J.E. (2007). OFF ganglion cells cannot drive the optokinetic reflex in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 19126–19131.



- Emran, F., Rihel, J., Adolph, A.R., and Dowling, J.E. (2010). Zebrafish larvae lose vision at night. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 6034–6039.
- Esquiva, G., Lax, P., Pérez-Santonja, J.J., García-Fernández, J.M., and Cuenca, N. (2017). Loss of Melanopsin-Expressing Ganglion Cell Subtypes and Dendritic Degeneration in the Aging Human Retina. *Frontiers in Aging Neuroscience* *9*, 79.
- Falcón, J., Galarneau, K.M., Weller, J.L., Ron, B., Chen, G., Coon, S.L., and Klein, D.C. (2001). Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: evidence for a role of proteasomal proteolysis. *Endocrinology* *142*, 1804–1813.
- Fernandes, A.M., Fero, K., Arrenberg, A.B., Bergeron, S.A., Driever, W., and Burgess, H.A. (2012). Deep Brain Photoreceptors Control Light-Seeking Behavior in Zebrafish Larvae. *Current Biology* *22*, 2042–2047.
- Fernandez, D.C., Fogerson, P.M., Ospri, L.L., Thomsen, M.B., Layne, R.M., Severin, D., Zhan, J., Singer, J.H., Kirkwood, A., Zhao, H., et al. (2018). Light affects mood and learning through distinct retina-brain pathways. *Cell* *175*, 71-84.e18.
- Fetcho, J.R., and McLean, D.L. (2009). Startle Response. In *Encyclopedia of Neuroscience*, L.R. Squire, ed. (Oxford: Academic Press), pp. 375–379.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., Schantz, M. von, Muñoz, M., David-Gray, Z., and Foster, R. (1999). Regulation of Mammalian Circadian Behavior by Non-rod, Non-cone, Ocular Photoreceptors. *Science* *284*, 502–504.
- Frigato, E., Vallone, D., Bertolucci, C., and Foulkes, N.S. (2006). Isolation and characterization of melanopsin and pinopsin expression within photoreceptive sites of reptiles. *Naturwissenschaften* *93*, 379–385.
- Gandhi, A.V., Mosser, E.A., Oikonomou, G., and Prober, D.A. (2015). Melatonin is required for the circadian regulation of sleep. *Neuron* *85*, 1193–1199.
- Gaston, S., and Menaker, M. (1968). Pineal function: the biological clock in the sparrow? *Science* *160*, 1125–1127.
- Geissmann, Q., Rodriguez, L.G., Beckwith, E.J., and Gilestro, G.F. (2019). Rethomics: An R framework to analyse high-throughput behavioural data. *PLOS ONE* *14*, e0209331.
- Gerkema, M.P., Davies, W.I.L., Foster, R.G., Menaker, M., and Hut, R.A. (2013). The nocturnal bottleneck and the evolution of activity patterns in mammals. *Proc Biol Sci* *280*, 20130508.
- Giustina, A., Frara, S., Spina, A., and Mortini, P. (2017). Chapter 9 - The Hypothalamus. In *The Pituitary* (Fourth Edition), S. Melmed, ed. (Academic Press), pp. 291–327.
- Gotter, A.L. (2006). A Timeless debate: resolving TIM's noncircadian roles with possible clock function. *Neuroreport* *17*, 1229–1233.
- Güler, A.D., Altimus, C.M., Ecker, J.L., and Hattar, S. (2007). Multiple photoreceptors contribute to nonimage-forming visual functions predominantly through melanopsin-containing retinal ganglion cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *72*, 509–515.

- Hao, H., and Rivkees, S.A. (1999). The biological clock of very premature primate infants is responsive to light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 2426–2429.
- Hattar, S., Lucas, R.J., Mrosovsky, N., Thompson, S., Douglas, R.H., Hankins, M.W., Lem, J., Biel, M., Hofmann, F., Foster, R.G., et al. (2003). Melanopsin and rod–cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* *424*, 76–81.
- Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., and Berson, D.M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J. Comp. Neurol.* *497*, 326–349.
- Haugh, R.M., and Markesbery, W.R. (1983). Hypothalamic Astrocytoma: Syndrome of Hyperphagia, Obesity, and Disturbances of Behavior and Endocrine and Autonomic Function. *Archives of Neurology* *40*, 560–563.
- Hauzman, E., Kalava, V., Bonci, D.M.O., and Ventura, D.F. (2019). Characterization of the melanopsin gene (*Opn4x*) of diurnal and nocturnal snakes. *BMC Evolutionary Biology* *19*, 174.
- Helfrich-Förster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J.C., and Stanewsky, R. (2001). The Circadian Clock of Fruit Flies Is Blind after Elimination of All Known Photoreceptors. *Neuron* *30*, 249–261.
- Hirayama, J., Cho, S., and Sassone-Corsi, P. (2007). Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 15747–15752.
- Hirayama, J., Alifu, Y., Hamabe, R., Yamaguchi, S., Tomita, J., Maruyama, Y., Asaoka, Y., Nakahama, K., Tamaru, T., Takamatsu, K., et al. (2019). The clock components *Period2*, *Cryptochrome1a*, and *Cryptochrome2a* function in establishing light-dependent behavioral rhythms and/or total activity levels in zebrafish. *Sci Rep* *9*.
- Hörnberg, H., Horck, F., Maurus, D., Zwart, M., Svoboda, H., William, H., and Holt, C. (2013). RNA-Binding Protein Hermes/RBPMS Inversely Affects Synapse Density and Axon Arbor Formation in Retinal Ganglion Cells In Vivo. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* *33*, 10384–10395.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., et al. (1999). Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* *398*, 627–630.
- Huang, R.-C. (2018). The discoveries of molecular mechanisms for the circadian rhythm: The 2017 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Biomed J* *41*, 5–8.
- Huang, D., Wang, M., Yin, W., Ma, Y., Wang, H., Xue, T., Ren, D., and Hu, B. (2018). Zebrafish Lacking Circadian Gene *per2* Exhibit Visual Function Deficiency. *Front Behav Neurosci* *12*.
- Huang, J., Zhong, Z., Wang, M., Chen, X., Tan, Y., Zhang, S., He, W., He, X., Huang, G., Lu, H., et al. (2015). Circadian Modulation of Dopamine Levels and Dopaminergic Neuron Development Contributes to Attention Deficiency and Hyperactive Behavior. *J Neurosci* *35*, 2572–2587.
- Hurd, M.W., and Cahill, G.M. (2002). Entraining signals initiate behavioral circadian rhythmicity in larval zebrafish. *J. Biol. Rhythms* *17*, 307–314.

- Idda, M.L., Bertolucci, C., Vallone, D., Gothilf, Y., Sánchez-Vázquez, F.J., and Foulkes, N.S. (2012). Circadian clocks: lessons from fish. *Prog. Brain Res.* *199*, 41–57.
- Jacques, S.L., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (1987). Penetration of light into the uterus of pregnant animals. *Photochem. Photobiol.* *45*, 637–641.
- Janik, D., and Mrosovsky, N. (1994). Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Res.* *651*, 174–182.
- Johnson, J., Wu, V., Donovan, M., Majumdar, S., Rentería, R.C., Porco, T., Van Gelder, R.N., and Copenhagen, D.R. (2010). Melanopsin-dependent light avoidance in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 17374–17378.
- Jones, C.R., Campbell, S.S., Zone, S.E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P.J., Jones, B., Czajkowski, L., and Ptček, L.J. (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med* *5*, 1062–1065.
- Jud, C., and Albrecht, U. (2016). Circadian Rhythms in Murine Pups Develop in Absence of a Functional Maternal Circadian Clock: *Journal of Biological Rhythms*.
- Kaneko, M., and Cahill, G.M. (2005). Light-Dependent Development of Circadian Gene Expression in Transgenic Zebrafish. *PLoS Biol* *3*.
- Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W., and Baier, H. (2001). Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* *30*, 725–736.
- Kazimi, N., and Cahill, G.M. (1999). Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *117*, 47–52.
- Kennaway, D.J. (2019). Melatonin research in mice: a review. *Chronobiol Int* *36*, 1167–1183.
- Kettunen, P. (2020). Calcium Imaging in the Zebrafish. *Adv Exp Med Biol* *1131*, 901–942.
- Kirouac, G.J. (2015). Placing the paraventricular nucleus of the thalamus within the brain circuits that control behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* *56*, 315–329.
- Klarsfeld, A., Leloup, J.C., and Rouyer, F. (2003). Circadian rhythms of locomotor activity in *Drosophila*. *Behav. Processes* *64*, 161–175.
- Klooster, J., Vrensen, G.F., Müller, L.J., and van der Want, J.J. (1995). Efferent projections of the olivary pretectal nucleus in the albino rat subserving the pupillary light reflex and related reflexes. A light microscopic tracing study. *Brain Res.* *688*, 34–46.
- Kofuji, P., Mure, L.S., Massman, L.J., Purrier, N., Panda, S., and Engeland, W.C. (2016). Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells (ipRGCs) Are Necessary for Light Entrainment of Peripheral Clocks. *PLoS ONE* *11*, e0168651.
- Kölsch, Y., Hahn, J., Sappington, A., Stemmer, M., Fernandes, A.M., Helmbrecht, T.O., Lele, S., Butrus, S., Laurell, E., Arnold-Ammer, I., et al. (2021). Molecular classification of zebrafish retinal ganglion cells links genes to cell types to behavior. *Neuron* *109*, 645-662.e9.
- Konopka, R.J., and Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *68*, 2112–2116.

- Kroll, F., Powell, G.T., Ghosh, M., Gestri, G., Antinucci, P., Hearn, T.J., Tunbak, H., Lim, S., Dennis, H.W., Fernandez, J.M., et al. (2021). A simple and effective FO knockout method for rapid screening of behaviour and other complex phenotypes. *ELife* *10*, e59683.
- Kurien, P., Hsu, P.-K., Leon, J., Wu, D., McMahon, T., Shi, G., Xu, Y., Lipzen, A., Pennacchio, L.A., Jones, C.R., et al. (2019). TIMELESS mutation alters phase responsiveness and causes advanced sleep phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 12045–12053.
- Li, J.Y., and Schmidt, T.M. (2018). Divergent projection patterns of M1 ipRGC subtypes. *J Comp Neurol* *526*, 2010–2018.
- Li, J.-D., Hu, W.-P., and Zhou, Q.-Y. (2012). The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Prog. Brain Res.* *199*, 119–127.
- Li, P., Temple, S., Gao, Y., Haimberger, T.J., Hawryshyn, C.W., and Li, L. (2005). Circadian rhythms of behavioral cone sensitivity and long wavelength opsin mRNA expression: a correlation study in zebrafish. *J Exp Biol* *208*, 497–504.
- Lin, Q., and Jesuthasan, S. (2017). Masking of a circadian behavior in larval zebrafish involves the thalamo-habenula pathway. *Sci Rep* *7*.
- Liu, Y.H., and Panda, S. (2017). Circadian Photoentrainment Mechanism in Mammals. In *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*, V. Kumar, ed. (New Delhi: Springer India), pp. 365–393.
- Liu, Y., Carmer, R., Zhang, G., Venkatraman, P., Brown, S.A., Pang, C.-P., Zhang, M., Ma, P., and Leung, Y.F. (2015). Statistical Analysis of Zebrafish Locomotor Response. *PLOS ONE* *10*, e0139521.
- Lucas, R.J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D.M., Foster, R.G., and Yau, K.-W. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* *299*, 245–247.
- Lupi, D., Oster, H., Thompson, S., and Foster, R.G. (2008). The acute light-induction of sleep is mediated by OPN4-based photoreception. *Nature Neuroscience* *11*, 1068–1073.
- Márquez-Legorreta, E., Horta-Júnior, J. de A.C., Berrebi, A.S., and Saldaña, E. (2016). Organization of the Zone of Transition between the Pretectum and the Thalamus, with Emphasis on the Pretectothalamic Lamina. *Front. Neuroanat.* *10*.
- Matos-Cruz, V., Blasic, J., Nickle, B., Robinson, P.R., Hattar, S., and Halpern, M.E. (2011). Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS ONE* *6*, e25111.
- Meissl, H., and Ekström, P. (1988). Photoreceptor responses to light in the isolated pineal organ of the trout, *Salmo gairdneri*. *Neuroscience* *25*, 1071–1076.
- Meissl, H., Nakamura, T., and Thiele, G. (1986). Neural response mechanisms in the photoreceptive pineal organ of goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* *84*, 467–473.
- Meyer-Bernstein, E.L., Jetton, A.E., Matsumoto, S., Markuns, J.F., Lehman, M.N., and Bittman, E.L. (1999). Effects of Suprachiasmatic Transplants on Circadian Rhythms of Neuroendocrine

Function in Golden Hamsters\*This work was supported by NIH Grants MH-44132, KO2-MH-00914, and F32-HD-07673. A preliminary report of this research was presented at the 23rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neurosci Abstr 19:236.17, 1993). *Endocrinology* 140, 207–218.

Moldavan, M.G., Sollars, P.J., Lasarev, M.R., Allen, C.N., and 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.

Molina-Borja, M. (1996). Pineal Gland and Circadian Locomotor Activity Rhythm in the Lacertid *Gallotia galloti eisenbrauti*: Pinealectomy Induces Arrhythmicity. *Biological Rhythm Research* 27, 1–11.

Morera, L.P., Díaz, N.M., and Guido, M.E. (2016). Horizontal cells expressing melanopsin x are novel photoreceptors in the avian inner retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 13215–13220.

Mrosovsky, N. (2001). Further characterization of the phenotype of mCry1/mCry2-deficient mice. *Chronobiol. Int.* 18, 613–625.

Mrosovsky, N., and Hattar, S. (2003). Impaired masking responses to light in melanopsin-knockout mice. *Chronobiol. Int.* 20, 989–999.

Mure, L.S. (2021). Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells of the Human Retina. *Frontiers in Neurology* 12, 300.

Nelson, R.J., and Zucker, I. (1981). Absence of extraocular photoreception in diurnal and nocturnal rodents exposed to direct sunlight. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 69, 145–148.

Noche, R.R., Lu, P.-N., Goldstein-Kral, L., Glasgow, E., and Liang, J.O. (2011). Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci* 12, 7.

Ortuño-Lizarán, I., Esquivá, G., Beach, T.G., Serrano, G.E., Adler, C.H., Lax, P., and Cuenca, N. (2018). Degeneration of human photosensitive retinal ganglion cells may explain sleep and circadian rhythms disorders in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications* 6, 90.

Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I., and Kay, S.A. (2002). Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298, 2213–2216.

Panda, S., Provencio, I., Tu, D., Pires, S., Rollag, M., Castrucci, A., Pletcher, M., Sato, T., Wiltshire, T., Andahazy, M., et al. (2003). Melanopsin Is Required for Non-Image-Forming Photic Responses in Blind Mice. *Science (New York, N.Y.)* 301, 525–527.

Panda, S., Nayak, S.K., Campo, B., Walker, J.R., Hogenesch, J.B., and Jegla, T. (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307, 600–604.

Pasqualetti, M., Bertolucci, C., Ori, M., Innocenti, A., Magnone, M.C., Grip, W.J.D., Nardi, I., and Foà, A. (2003). Identification of circadian brain photoreceptors mediating photic entrainment of behavioural rhythms in lizards. *European Journal of Neuroscience* 18, 364–372.

- Patke, A., Murphy, P.J., Onat, O.E., Krieger, A.C., Özçelik, T., Campbell, S.S., and Young, M.W. (2017). Mutation of the Human Circadian Clock Gene CRY1 in Familial Delayed Sleep Phase Disorder. *Cell* 169, 203-215.e13.
- Pendergast, J.S., and Yamazaki, S. (2011). Masking responses to light in period mutant mice. *Chronobiol. Int.* 28, 657–663.
- Prober, D.A., Rihel, J., Onah, A.A., Sung, R.-J., and Schier, A.F. (2006). Hypocretin/Orexin Overexpression Induces An Insomnia-Like Phenotype in Zebrafish. *J Neurosci* 26, 13400–13410.
- Provencio, I., Jiang, G., Grip, W.J.D., Hayes, W.P., and Rollag, M.D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *PNAS* 95, 340–345.
- Qiu, X., Kumbalasiri, T., Carlson, S.M., Wong, K.Y., Krishna, V., Provencio, I., and Berson, D.M. (2005). Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433, 745–749.
- Quattrochi, L.E., Stabio, M.E., Kim, I., Ilardi, M.C., Fogerson, P.M., Leyrer, M.L., and Berson, D.M. (2019). The M6 cell: A small-field bistratified photosensitive retinal ganglion cell. *J Comp Neurol* 527, 297–311.
- Redlin, U., and Mrosovsky, N. (1999). Masking by light in hamsters with SCN lesions. *J. Comp. Physiol. A* 184, 439–448.
- Reid, R.C., and Usrey, W.M. (2013). Chapter 26 - Vision. In *Fundamental Neuroscience (Fourth Edition)*, L.R. Squire, D. Berg, F.E. Bloom, S. du Lac, A. Ghosh, and N.C. Spitzer, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 577–595.
- Reppert, S.M., and Schwartz, W.J. (1983). Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 220, 969–971.
- Reppert, S.M., and Schwartz, W.J. (1986). Maternal suprachiasmatic nuclei are necessary for maternal coordination of the developing circadian system. *J. Neurosci.* 6, 2724–2729.
- Reppert, S.M., Chez, R.A., Anderson, A., and Klein, D.C. (1979). Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr. Res.* 13, 788–791.
- Rieger, D., Stanewsky, R., and Helfrich-Förster, C. (2003). Cryptochrome, Compound Eyes, Hofbauer-Buchner Eyelets, and Ocelli Play Different Roles in the Entrainment and Masking Pathway of the Locomotor Activity Rhythm in the Fruit Fly *Drosophila Melanogaster*. *J Biol Rhythms* 18, 377–391.
- Rj, C., and H, I. (1985). Luminance and darkness detectors in the olivary and posterior pretectal nuclei and their relationship to the pupillary light reflex in the rat. I. Studies with steady luminance levels. *Exp Brain Res* 57, 224–232.
- Roecklein, K., Wong, P., Erneckoff, N., Miller, M., Donofry, S., Kamarck, M., Wood-Vasey, W.M., and Franzen, P. (2013). The post illumination pupil response is reduced in seasonal affective disorder. *Psychiatry Res* 210, 150–158.

- Roecklein, K.A., Rohan, K.J., Duncan, W.C., Rollag, M.D., Rosenthal, N.E., Lipsky, R.H., and Provencio, I. (2009). A missense variant (P10L) of the melanopsin (Opn4) gene is associated with Seasonal Affective Disorder. *J Affect Disord* *114*, 279–285.
- Rüger, M., Gordijn, M.C.M., Beersma, D.G.M., de Vries, B., and Daan, S. (2003). Acute and phase-shifting effects of ocular and extraocular light in human circadian physiology. *J. Biol. Rhythms* *18*, 409–419.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* *93*, 805–814.
- Sabat, D., Priyadarsini, S., and Mishra, M. (2017). Understanding the Structural and Developmental Aspect of Simple Eye of *Drosophila*: The Ocelli. *J Cell Signal* *01*.
- Sack, R.L., and Lewy, A.J. (2001). Circadian rhythm sleep disorders: lessons from the blind. *Sleep Med Rev* *5*, 189–206.
- Sandbakken, M., Ebbesson, L., Stefansson, S., and Helvik, J.V. (2012). Isolation and characterization of melanopsin photoreceptors of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Comp. Neurol.* *520*, 3727–3744.
- Sapède, D., and Cau, E. (2013). The pineal gland from development to function. *Curr. Top. Dev. Biol.* *106*, 171–215.
- Sapède, D., Chaigne, C., Blader, P., and Cau, E. (2020). Functional heterogeneity in the pineal projection neurons of zebrafish. *Molecular and Cellular Neuroscience* *103*, 103468.
- Saunders, D. (2016). The temporal “structure” and function of the insect photoperiodic clock: A tribute to Colin S. Pittendrigh. *Physiological Entomology* *41*, n/a-n/a.
- Schmidt, T.M., and Kofuji, P. (2011). Structure and Function of Bistratified Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in the Mouse. *J Comp Neurol* *519*, 1492–1504.
- Schwartz, W.J., Busis, N.A., and Hedley-Whyte, E.T. (1986). A discrete lesion of ventral hypothalamus and optic chiasm that disturbed the daily temperature rhythm. *J Neurol* *233*, 1–4.
- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B., and Young, M.W. (1994). Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* *263*, 1603–1606.
- Sekaran, S., Lupi, D., Jones, S.L., Sheely, C.J., Hattar, S., Yau, K.-W., Lucas, R.J., Foster, R.G., and Hankins, M.W. (2005). Melanopsin-Dependent Photoreception Provides Earliest Light Detection in the Mammalian Retina. *Curr Biol* *15*, 1099–1107.
- Senthilan, P.R., Grebler, R., Reinhard, N., Rieger, D., and Helfrich-Förster, C. (2019). Role of Rhodopsins as Circadian Photoreceptors in the *Drosophila melanogaster*. *Biology (Basel)* *8*, 6.
- Shainer, I., Buchshtab, A., Hawkins, T.A., Wilson, S.W., Cone, R.D., and Gothilf, Y. (2017). Novel hypophysiotropic AgRP2 neurons and pineal cells revealed by BAC transgenesis in zebrafish. *Sci Rep* *7*, 44777.

- Shainer, I., Michel, M., Marquart, G.D., Bhandiwad, A.A., Zmora, N., Livne, Z.B.-M., Zohar, Y., Hazak, A., Mazon, Y., Förster, D., et al. (2019). Agouti-related protein 2 is a new player in the teleost stress response system. *Curr Biol* 29, 2009-2019.e7.
- Shearman, L.P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2000). Targeted disruption of the *mPer3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6269–6275.
- Shi, S., Hida, A., McGuinness, O.P., Wasserman, D.H., Yamazaki, S., and Johnson, C.H. (2010). Circadian Clock Gene *Bmal1* Is Not Essential After All; Functional Replacement with its Paralog, *Bmal2*. *Curr Biol* 20, 316–321.
- Shiraki, T., Kojima, D., and Fukada, Y. (2010). Light-induced body color change in developing zebrafish. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 1498–1504.
- Simpson, S.M., and Follett, B.K. (1982). Formal properties of the circadian rhythm of locomotor activity in Japanese quail. *J. Comp. Physiol.* 145, 391–398.
- Singewald, G.M., Rjabokon, A., Singewald, N., and Ebner, K. (2011). The Modulatory Role of the Lateral Septum on Neuroendocrine and Behavioral Stress Responses. *Neuropsychopharmacology* 36, 793–804.
- Sonoda, T., and Schmidt, T.M. (2016). Re-evaluating the Role of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: New Roles in Image-Forming Functions. *Integr Comp Biol* 56, 834–841.
- Sonoda, T., Li, J.Y., Hayes, N.W., Chan, J.C., Okabe, Y., Belin, S., Nawabi, H., and Schmidt, T.M. (2020). A noncanonical inhibitory circuit dampens behavioral sensitivity to light. *Science* 368, 527–531.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998). The *cryb* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681–692.
- Sternberg, J.R., Severi, K.E., Fidelin, K., Gomez, J., Ihara, H., Alcheikh, Y., Hubbard, J.M., Kawakami, K., Suster, M., and Wyart, C. (2016). Optimization of a Neurotoxin to Investigate the Contribution of Excitatory Interneurons to Speed Modulation In Vivo. *Curr. Biol.* 26, 2319–2328.
- Tahara, Y., Kuroda, H., Saito, K., Nakajima, Y., Kubo, Y., Ohnishi, N., Seo, Y., Otsuka, M., Fuse, Y., Ohura, Y., et al. (2012). In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse. *Current Biology* 22, 1029–1034.
- Takahashi, J.S., and Menaker, M. (1982). Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *J. Neurosci.* 2, 815–828.
- Tamai, T.K., Young, L.C., and Whitmore, D. (2007). Light signaling to the zebrafish circadian clock by Cryptochrome 1a. *PNAS* 104, 14712–14717.
- Tamotsu, S., and Morita, Y. (1986). Photoreception in pineal organs of larval and adult lampreys, *Lampetra japonica*. *J. Comp. Physiol.* 159, 1–5.
- Tan, Y., DeBruyne, J., Cahill, G.M., and Wells, D.E. (2008). Identification of a mutation in the *Clock1* gene affecting zebrafish circadian rhythms. *J. Neurogenet.* 22, 149–166.



- Tarttelin, E.E., Bellingham, J., Bibb, L.C., Foster, R.G., Hankins, M.W., Gregory-Evans, K., Gregory-Evans, C.Y., Wells, D.J., and Lucas, R.J. (2003). Expression of opsin genes early in ocular development of humans and mice. *Exp. Eye Res.* 76, 393–396.
- Tataroglu, O., and Emery, P. (2014). Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 68, 140–150.
- Tolosa-Villalobos, J., Arroyo, J.I., and Opazo, J.C. (2015). The circadian clock of teleost fish: a comparative analysis reveals distinct fates for duplicated genes. *J. Mol. Evol.* 80, 57–64.
- Tosini, G., Bertolucci, C., and Foà, A. (2001). The circadian system of reptiles: a multioscillatory and multiphotoreceptive system. *Physiol. Behav.* 72, 461–471.
- Tufford, A.R., Onyak, J.R., Sondereker, K.B., Lucas, J.A., Earley, A.M., Mattar, P., Hattar, S., Schmidt, T.M., Renna, J.M., and Cayouette, M. (2018). Melanopsin Retinal Ganglion Cells Regulate Cone Photoreceptor Lamination in the Mouse Retina. *Cell Reports* 23, 2416–2428.
- Uchida, K., Nakamura, T., and Morita, Y. (1992). Signal transmission from pineal photoreceptors to luminosity-type ganglion cells in the lamprey, *Lampetra japonica*. *Neuroscience* 47, 241–247.
- Underwood, H. (1983). Circadian pacemakers in lizards: phase-response curves and effects of pinealectomy. *The American Journal of Physiology* 244, R857-64.
- Underwood, H. (1985). Extraretinal photoreception in the lizard *Sceloporus occidentalis*: phase response curve. *Am. J. Physiol.* 248, R407-414.
- Vallone, D., Gondi, S.B., Whitmore, D., and Foulkes, N.S. (2004). E-box function in a period gene repressed by light. *PNAS* 101, 4106–4111.
- Vallone, D., Frigato, E., Vernesi, C., Foà, A., Foulkes, N.S., and Bertolucci, C. (2007a). Hypothermia modulates circadian clock gene expression in lizard peripheral tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R160-166.
- Vallone, D., Lahiri, K., Dickmeis, T., and Foulkes, N.S. (2007b). Start the clock! Circadian rhythms and development. *Developmental Dynamics* 236, 142–155.
- Vatine, G., Vallone, D., Appelbaum, L., Mracek, P., Ben-Moshe, Z., Lahiri, K., Gothilf, Y., and Foulkes, N.S. (2009). Light directs zebrafish period2 expression via conserved D and E boxes. *PLoS Biol.* 7, e1000223.
- Vatine, G., Vallone, D., Gothilf, Y., and Foulkes, N.S. (2011). It's time to swim! Zebrafish and the circadian clock. *FEBS Lett.* 585, 1485–1494.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.-M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., and Takahashi, J.S. (1994). Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, Clock, Essential for Circadian Behavior. *Science* 264, 719–725.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., et al. (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12114–12119.

- Vitaterna, M.H., Takahashi, J.S., and Turek, F.W. (2001). Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health* 25, 85–93.
- Vuilleumier, R., Besseau, L., Boeuf, G., Piparelli, A., Gothilf, Y., Gehring, W.G., Klein, D.C., and Falcón, J. (2006). Starting the Zebrafish Pineal Circadian Clock with a Single Photic Transition. *Endocrinology* 147, 2273–2279.
- Vujovic, N., Gooley, J.J., Jhou, T.C., and Saper, C.B. (2015). Projections from the subparaventricular zone define four channels of output from the circadian timing system. *J Comp Neurol* 523, 2714–2737.
- Wang, H., Yang, Z., Li, X., Huang, D., Yu, S., He, J., Li, Y., and Yan, J. (2020). Single-cell in vivo imaging of cellular circadian oscillators in zebrafish. *PLOS Biology* 18, e3000435.
- Wang, M., Zhong, Z., Zhong, Y., Zhang, W., and Wang, H. (2015). The Zebrafish Period2 Protein Positively Regulates the Circadian Clock through Mediation of Retinoic Acid Receptor (RAR)-related Orphan Receptor  $\alpha$  (Ror $\alpha$ ). *J Biol Chem* 290, 4367–4382.
- Wee, R., Castrucci, A.M., Provencio, I., Gan, L., and Van Gelder, R.N. (2002). Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in math5<sup>-/-</sup> mice. *J Neurosci* 22, 10427–10433.
- Weger, B.D., Sahinbas, M., Otto, G.W., Mracek, P., Armant, O., Dolle, D., Lahiri, K., Vallone, D., Ettwiller, L., Geisler, R., et al. (2011). The light responsive transcriptome of the zebrafish: function and regulation. *PLoS ONE* 6, e17080.
- Wheeler, M.A., Smith, C.J., Ottolini, M., Barker, B.S., Purohit, A.M., Grippo, R.M., Gaykema, R.P., Spano, A.J., Beenhakker, M.P., Kucenas, S., et al. (2016). Genetically targeted magnetic control of the nervous system. *Nat Neurosci* 19, 756–761.
- Whitmore, D., Foulkes, N.S., and Sassone-Corsi, P. (2000). Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 404, 87–91.
- Wiater, M.F., Li, A.-J., Dinh, T.T., Jansen, H.T., and Ritter, S. (2013). Leptin-sensitive neurons in the arcuate nucleus integrate activity and temperature circadian rhythms and anticipatory responses to food restriction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305, R949–R960.
- Wong, K.Y., Dunn, F.A., Graham, D.M., and Berson, D.M. (2007). Synaptic influences on rat ganglion-cell photoreceptors. *J. Physiol. (Lond.)* 582, 279–296.
- Wright, K.P., and Czeisler, C.A. (2002). Absence of Circadian Phase Resetting in Response to Bright Light Behind the Knees. *Science* 297, 571–571.
- Xie, Y., Tang, Q., Chen, G., Xie, M., Yu, S., Zhao, J., and Chen, L. (2019). New Insights Into the Circadian Rhythm and Its Related Diseases. *Front Physiol* 10.
- Xu, Y., Toh, K.L., Jones, C.R., Shin, J.-Y., Fu, Y.-H., and Ptáček, L.J. (2007). Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. *Cell* 128, 59–70.
- Yan, L., and Silver, R. (2002). Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci* 16, 1531–1540.

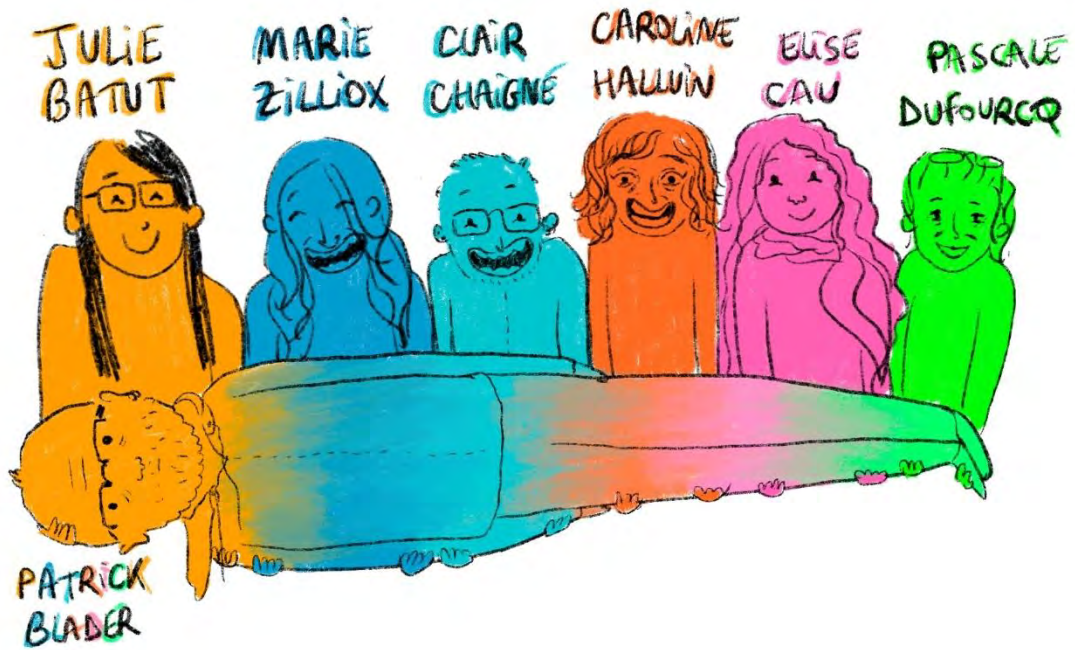
- Yan, L., Smale, L., and Nunez, A.A. (2018). Circadian and photic modulation of daily rhythms in diurnal mammals. *Eur J Neurosci*.
- Yoo, S.-H., Yamazaki, S., Lowrey, P.L., Shimomura, K., Ko, C.H., Buhr, E.D., Siepk, S.M., Hong, H.-K., Oh, W.J., Yoo, O.J., et al. (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5339.
- Yoshii, T., Todo, T., Wülbeck, C., Stanewsky, R., and Helfrich-Förster, C. (2008). Cryptochrome is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *Journal of Comparative Neurology* *508*, 952–966.
- Yoshimura, T., Suzuki, Y., Makino, E., Suzuki, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Namikawa, T., and Ebihara, S. (2000). Molecular analysis of avian circadian clock genes. Published on the World Wide Web on 23 May 2000. *Molecular Brain Research* *78*, 207–215.
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Suzuki, Y., Makino, E., Yokota, Y., and Ebihara, S. (2001). Identification of the suprachiasmatic nucleus in birds. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *280*, R1185-1189.
- Yoshizawa, M., and Jeffery, W.R. (2008). Shadow response in the blind cavefish *Astyanax* reveals conservation of a functional pineal eye. *J. Exp. Biol.* *211*, 292–299.
- Zeman, M., and Illnerová, H. (1990). Ontogeny of N-acetyltransferase activity rhythm in pineal gland of chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* *97*, 175–178.
- Zhang, B., Yao, Y., Zhang, H., Kawakami, K., and Du, J. (2017). Left Habenula Mediates Light-Preference Behavior in Zebrafish via an Asymmetrical Visual Pathway. *Neuron* *93*, 914-928.e4.
- Zhang, L., Hirano, A., Hsu, P.-K., Jones, C.R., Sakai, N., Okuro, M., McMahon, T., Yamazaki, M., Xu, Y., Saigoh, N., et al. (2016a). A PERIOD3 variant causes a circadian phenotype and is associated with a seasonal mood trait. *PNAS* *113*, E1536–E1544.
- Zhang, L., Xiang, L., Liu, Y., Venkatraman, P., Chong, L., Cho, J., Bonilla, S., Jin, Z.-B., Pang, C.P., Ko, K.M., et al. (2016b). A Naturally-Derived Compound Schisandrin B Enhanced Light Sensation in the *pde6c* Zebrafish Model of Retinal Degeneration. *PLOS ONE* *11*, e0149663.
- Zhang, Y.-P., Li, S.-R., Ping, J., Li, S.-W., Zhou, H.-B., Sun, B.-J., and Du, W.-G. (2016c). The effects of light exposure during incubation on embryonic development and hatchling traits in lizards. *Sci Rep* *6*, 1–8.
- Zhang, Z., Liu, W.-Y., Diao, Y.-P., Xu, W., Zhong, Y.-H., Zhang, J.-Y., Lazarus, M., Liu, Y.-Y., Qu, W.-M., and Huang, Z.-L. (2019). Superior Colliculus GABAergic Neurons Are Essential for Acute Dark Induction of Wakefulness in Mice. *Current Biology* *29*, 637-644.e3.
- Zhdanova, I.V., and Reeb, S.G. (2005). Circadian Rhythms in Fish. In *Fish Physiology*, (Academic Press), pp. 197–238.
- Zheng, B., Larkin, D.W., Albrecht, U., Sun, Z.S., Sage, M., Eichele, G., Lee, C.C., and Bradley, A. (1999). The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* *400*, 169–173.

Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A., et al. (2001). Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell* *105*, 683–694.

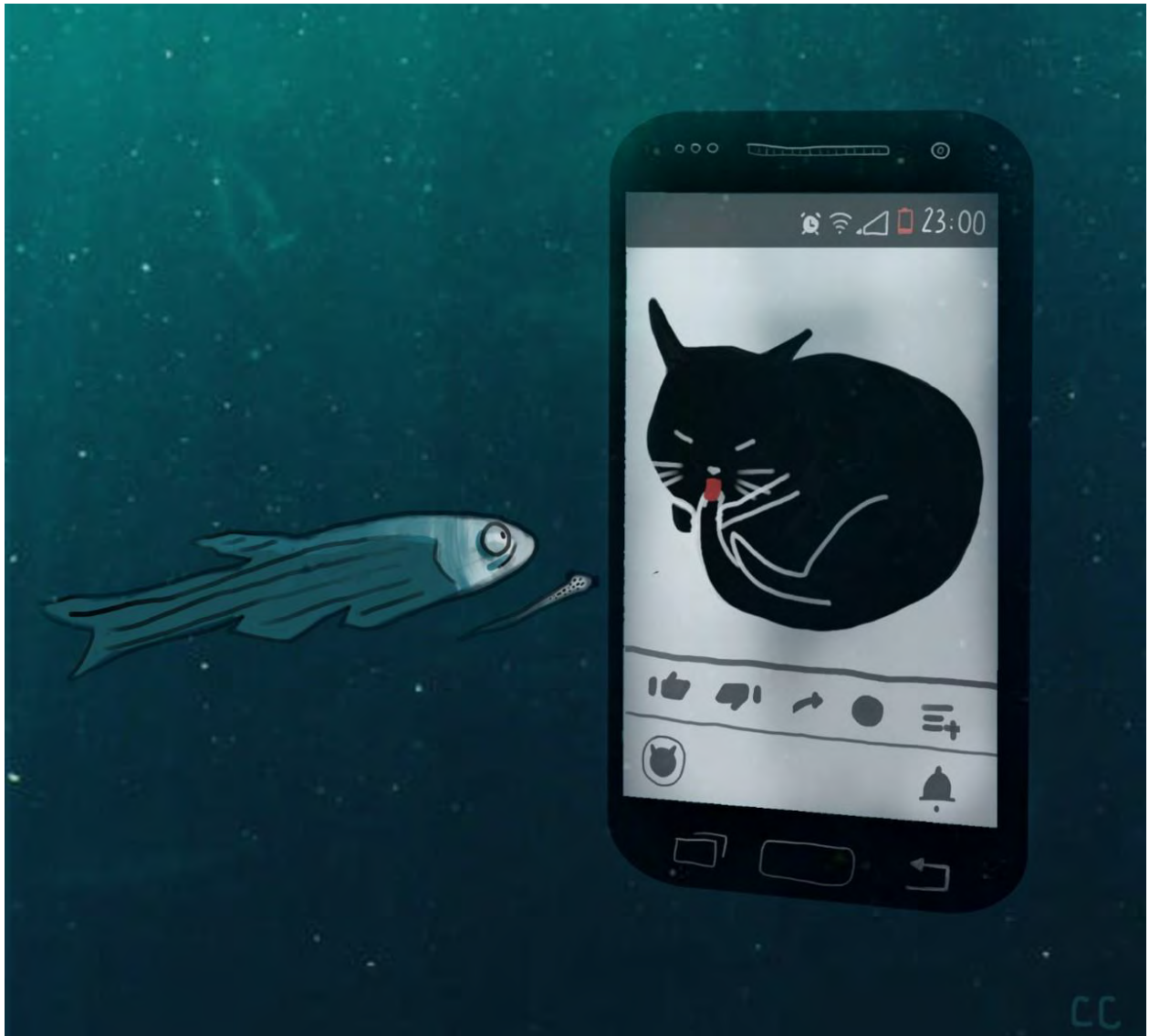
Zielinski, T., Moore, A.M., Troup, E., Halliday, K.J., and Millar, A.J. (2014). Strengths and limitations of period estimation methods for circadian data. *PLoS ONE* *9*, e96462.

Ziv, L., and Gothilf, Y. (2006). Circadian time-keeping during early stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 4146–4151.

# TEAM BLADER



Clair Chaigne



Est-ce que vous aviez remarqué que dans notre œil, on a des neurones un peu spéciaux qui sont sensibles à la lumière ? Alors ne paniquez pas monsieur, c'est une question rhétorique. Donc ces neurones ils sont sensibles à la lumière bleue, parce qu'ils possèdent un récepteur à la lumière qui est la mélanopsine. Par contre, ils font pas trop la différence entre une lumière qui provient de notre ami le soleil et d'une qui vient d'une vidéo d'un chat qui se lèche la queue qu'on regarderait un dimanche à 23h. Et donc dans les deux cas ils vont se dire « oh c'est le jour, allons donc prévenir nos braves compagnons, comme l'horloge biologique qui régule de nombreux processus, dont le sommeil ». Et c'est comme ça qu'avec un chat qui se lèche la queue, notre horloge va être retardée, qu'on va s'endormir beaucoup plus tard que prévu, et se réveiller fatigué le lendemain matin. Vous allez me dire, mais quel rapport avec ta thèse ? Et merci pour cette question, vous êtes très pertinent ! Et bien, moi pendant ma thèse je vais comprendre comment fonctionnent ces neurones, et pour ça je vais regarder qu'est-ce qu'il se passe quand ils ne fonctionnent pas. Et ça je vais le faire grâce à des larves de poisson zèbre qui sont mutantes, dans lesquelles la mélanopsine n'est plus exprimée et donc les neurones ne sont plus sensibles à la lumière bleue. Et dans ces larves, et bien qu'est-ce que je vais faire ? Par exemple, je vais regarder si les gènes qui sont plutôt activés pendant

le jour ou alors plutôt pendant la nuit, comme l'enzyme de synthèse de la mélanotine, sont dérégulés par rapport aux larves non mutantes. Alors comment est-ce qu'on fait pas. Euh non, on va pas voir gentille le poisson pour lui demander de nous raconter comment sont exprimés ses gènes. Non, ce qu'on va faire c'est plutôt venir au laboratoire à 3h du matin pour extraire de l'arn, le saint graal produit du gène, de larves de poissons. Voilà, on s'amuse comme on peut. Sinon ce que je vais faire aussi avec ces larves, c'est que je vais regarder comment elles se comportent. Comment les poissons se comportent, par exemple est-ce qu'ils continuent à bien dormir. Parce que oui, un poisson ça dort ! Alors, comment on sait si ça dort ? En gros, si ça bouge c'est que ça dort pas, et si ça bouge pas et que c'est toujours sur le ventre, c'est que ça dort, sinon c'est que c'est mort. Alors là non plus je vais pas passer ma vie devant l'aquarium en train de me dire Jean Michel ça fait 3h qu'il a pas bougé il est en train de se taper un roupillon, par contre Séverine qu'est-ce qu'elle bouge, elle a encore du passer toute sa soirée à regarder des tutos sur youtube. Non, ce que je fais c'est que je prend les larves, je les filme et ensuite j'analyse les films à l'aide d'un logiciel, quand la caméra, le disque dur ou l'ordinateur n'a pas planté entre temps. Et je les filme pendant 3 jours, pendant lesquels je me transforme en tenancier de la boîte de nuit la plus célèbre parmi les poissons de ta région, le nouveau shangai, et alors là je les mets soit dans le noir complet, soit je le mets dans la lumière constante, soit j'allume, j'éteins constamment la lumière et je vois comment les poissons réagissent, s'ils réagissent, et s'ils continuent à beaucoup dormir la nuit et peu dormir le jour. Voilà pour vous faire un résumé, moi je suis une sorte de Michou des poissons, qui regarde des vidéos de chat qui se lèchent la queue le dimanche soir à 23h.

*« Lumière bleue sur le poisson zèbre », MT180s, 25 mars 2019*