

# RYTHMES

Bulletin du Groupe d'Étude des Rythmes Biologiques

Tome 37 - Numéro 2

Juin 2006

## Éditorial

### *Tous ensemble ! Enfin !*

Il y a quelques semaines déjà que nous étions réunis à Lyon. Avant toute chose je voudrais, encore une fois, remercier nos collègues lyonnais pour la qualité du programme scientifique, la perfection de l'organisation matérielle et la chaleur de l'accueil.

Quels enseignements pouvons-nous tirer de ces quelques jours de présentation ? D'abord, il faut le souligner, le dynamisme et la jeunesse de notre société. La politique spécifique « jeunes », initiée il y a quelques années par mon prédécesseur Bernard Bruguerolle, et qui était éclatante à Lyon, comme elle l'avait été à Strasbourg commence à porter ses fruits. Le nombre des nouveaux membres (voir le rapport de l'assemblée générale) parle pour moi. Sur le plan scientifique dans plusieurs présentations une information importante est apparue et d'une façon ou d'une autre elle va profondément influencer nos approches expérimentales dans la thématique des rythmes. Je parle des résultats tant fondamentaux que cliniques qui démontrent que l'expression des rythmes ou la régulation de ces rythmes est fortement sexuée.

La SFC, notre Société, fait aussi face aux évolutions du monde et, depuis quelques années, elle réagit et s'adapte pour nous représenter auprès des diverses instances et ce, dans le respect de toutes les approches disciplinaires. Lyon 2006 sera une année de transition forte dans cette évolution. L'« Association de Chronobiologie Médicale » (ACM) qui défendait au sens large la chronomédecine a décidé de s'autodissoudre et de rejoindre la SFC. Ce fut un processus long et pour certains, nous devons le comprendre, douloureux. Notre discipline toutefois a beaucoup évolué ces dernières années et nos sociétés ne pouvaient pas ne pas prendre en compte ces évolutions. D'un côté, il est indéniable que nos collègues de l'ACM ont fait un gros effort. De l'autre côté, les membres de la SFC ont également

(Suite page 26)

<http://www.sf-chronobiologie.org>

## Sommaire

**Éditorial** 25

### Résumés

Résumés de Lyon 2006 32

### Commentaires

Francophonie  
*B. Bruguerolle* 30

CLOCK et l'horloge circadienne:  
"with or without you..."

*H. Dardente* 56

### Annonces de congrès

Manifestations  
Scientifiques 29

### Rubriques

Mise à jour de l'annuaire élec-  
tronique 26

Compte-rendu de l'Assemblée  
Générale 27

Notre site Web 31

Chronobiologistes... 60



(Suite de la page 25)

accepté le changement et ont même voté à l'unanimité les modifications de statuts qu'imposait la réussite de cette intégration. Nous pouvons maintenant clamer haut et fort que la SFC regroupe toutes les forces vives de notre discipline. Nos connaissances sur la mécanique des rythmes progressent tous les jours et c'est cela qui nous permet de répondre à certaines questions sociétales, tant au niveau de la santé que de l'organisation sociale du travail, sans oublier l'agronomie et c'est tout cela que nous devons représenter.

L'importance et l'influence de notre société seront celles que nous lui ferons mais dès à présent, en promouvant le développement des connaissances fondamentales, et sur cette base (ou en parallèle) en défendant une approche appliquée systématique en agronomie comme en médecine (de l'anesthésiologie à la cardiologie, en passant par l'oncologie) nous pouvons espérer être écoutés et entendus par nos diverses tutelles et par la société toute entière.

Ce congrès à Lyon et cette année 2006, restera donc dans les mémoires. Reste à nous, reste à vous, maintenant à faire en sorte que notre société puisse répondre totalement aux espoirs placés en elle et que, pour les « jeunes » scientifiques du domaine, notre congrès annuel soit la « réunion scientifique » qu'ils ne veulent rater à aucun prix.

Strasbourg le  
1<sup>er</sup> juin 2006

**Paul Pévet,**  
**Président**



## Vos coordonnées accessibles sur le site de la SFC

M, Mme, Mlle, Prénom, Nom :

Tel:

Fax:

Titres, fonctions

Courriel :

Adresse :

Mots clefs :

Pensez à actualiser vos données

*Utilisez ce formulaire pour une première inscription ;*

*Modifiez vos données en ligne si nécessaire (voir page 31).*

**Etienne CHALLET**, Secrétaire Général de la SFC  
Laboratoire de Neurobiologie des Rythmes  
CNRS UMR7168/LC2, Université Louis Pasteur  
5 rue Blaise Pascal, 67084 STRASBOURG Cedex  
Tel: 03.88.45.66.93; Fax: 03.88.45.66.54  
*e-mail: [challet@neurochem.u-strasbg.fr](mailto:challet@neurochem.u-strasbg.fr)*

# Compte-Rendu de l'Assemblée Générale.

## Lyon, 09 mai 2006

Ouverture de la séance à 17h15 sous la Présidence de Paul Pévet, en présence de 34 membres.

### 1. Bilan des adhérents

144 adhérents sont à jour de leur cotisation, alors qu'ils étaient 130 à la même époque l'an dernier.

Vingt-deux nouvelles personnes depuis l'an dernier souhaitent adhérer à la SFC :

1. ARENDT Jo, Pr, UK
2. GODRON Jean-Loup, Dr, Coudekerque
3. DARDENTE Hugues, Dr, CANADA
4. KLARSFELD André, Dr, Gif-sur-Yvette
5. VALLEIX Caroline, Etud, Lyon
6. DOLLET Anna, Etud, Lyon
7. GILBERTAS Marc, Etud, Lyon
8. MURE Ludovic, Etud, Lyon
9. HIRSCH Roland, Dr, SUISSE
10. SCHWOB Marc, Dr, Paris
11. PERIGAUD Jacques, Dr, Paris
12. TERRIEN Jérémy, Etud, Brunoy
13. CUESTA Marc, Etud, Strasbourg
14. EL OUEZZANI Seloua, Pr, MAROC
15. ANDRE Marc, Dr, Nantes
16. MENDOZA Jorge, Dr, Strasbourg
17. VUILLEZ Patrick, Dr, Strasbourg
18. RAISON Sylvie, Dr, Strasbourg
19. KRISTENSSON Krister, Pr, SUEDE

20. BENTIVOGLIO Marina, Pr, ITALIE

21. REVEL Florent, Etud, Strasbourg

22. FORMANEK Laureline, Etud, Rennes

Ces vingt-deux candidatures sont approuvées à l'unanimité par l'Assemblée Générale.

### 2. Bilan financier par la Trésorière

L'état des finances est présenté par Fabienne Aujard, notre Trésorière.

A la date du 3 mai 2006, le CCP est crédité de la somme de 4754 € et le livret de Caisse d'Épargne de 11406 €; soit un avoir total de 16160 €.

L'assemblée félicite la Trésorière pour la bonne tenue des comptes et accorde le quitus à l'unanimité.

### 3. Cotisations 2007

Pour 2006-07, la cotisation standard est maintenue à 25 € (12,5 € pour les retraités et cotisation gratuite pour les étudiants sous réserve qu'ils soumettent un article pour RYTHMES). L'Assemblée accepte la proposition du Conseil d'Administration que les inscriptions à la SFC soient majorées de 5 € pour l'envoi du bulletin RYTHMES au format papier.

### 4. Proposition de modifications des statuts

Suite aux efforts de tous pour regrouper les forces vives de la chronobiologie et de la chronomédecine au sein de la SFC, il a été décidé de modifier les statuts de la SFC et, en particulier, l'article 2 (objet). De nouvelles modifications ont été suggérées par rapport à la version parue dans le numéro précédent de RYTHMES (tome 37, numéro 1, mars 2006). Ces modifications concernent spécifiquement l'organisation de commissions thématiques à l'initiative des membres de la Société.

*Voici la nouvelle version qui a été proposée.*

### Article 2 : Objet

**La SFC est une association de chercheurs francophones**

- dans tous les domaines de la chronobiologie, de la recherche fondamentale à la recherche clinique, et à la recherche appliquée,
- de tous les secteurs publics ou privés,
- de toutes nationalités.

**Dans les pays francophones, elle a pour but de favoriser :**

- les interactions entre chercheurs de tous horizons, et de contribuer à l'animation et au dévelop-

(Suite page 28)

(Suite de la page 27)

pement de l'activité scientifique,

- la diffusion des connaissances scientifiques dans le cadre de l'éducation, de la formation des jeunes chercheurs, et de l'information du public.
- le soutien aux recherches en chronobiologie par les organismes publics et les établissements du secteur privé.

#### Elle participe dans le domaine international

à la vie scientifique internationale et au rayonnement de la recherche effectuée dans les pays francophones en s'associant aux sociétés scientifiques internationales, *European Biological Rhythms Society*, *International Federation of National Societies of Chronobiology*, et en menant des actions conjointes avec les autres associations scientifiques thématiques ou nationales, en Europe et dans le monde.

#### Elle publie :

- un bulletin trimestriel, RYTHMES.
- un serveur Web, diffusant des informations administratives et scientifiques, mais également un annuaire électronique des membres de la Société.

#### Elle organise :

- le Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie, manifestation qui regroupe les chercheurs des diverses disciplines intéressés par la recherche sur les rythmes biologiques. La fréquence de cette manifestation est définie par le Conseil d'Administration. (actuellement fréquence annuelle). Elle comporte des conférences plénières, des symposiums thématiques et des séances de communications affichées.
- des Commissions Thématiques à l'initiative de membres de la Société. La commission thématique et le nom de son responsable sont validés par le Conseil d'Administration.
- des Ateliers Thématiques à l'initiative de membres de la Société. Il s'agit de manifestations scientifiques touchant un problème particulier de la chronobiologie. L'objet de ces ateliers thématiques est de faire le point sur des sujets spécifiques d'actualité ou en pleine évolution.
- toute autre proposition d'action portée par des membres de la société pourra être soutenue par la société, sous réserve de l'accord du Conseil d'Administration.

*Les nouveaux statuts sont votés à l'unanimité moins une voix.*

#### **5. Vote sur l'intégration des membres de l'Association de Chronobiologie Médicale (ACM).**

Bruno Claustrat, Vice-Président de la SFC et Président de l'ACM, rappelle les efforts et la volonté de l'ACM de favoriser son intégration à la SFC. L'Assemblée salue l'inclusion des membres de l'ACM à la SFC par des applaudissements.

#### **6. Explication sur la décision du CA concernant le Congrès International de Chronobiologie Appliquée**

Paul Pévet rappelle que la Mediterranean Society for Chronobiology (MSC) organise en mars 2007 à Tunis un Congrès International de Chronobiologie Appliquée. Le bureau de la SFC avait été contacté pour faire un congrès commun, sans que la SFC soit directement impliquée ni dans le programme scientifique, ni dans son organisation. Le Conseil d'Administration a donc décidé de ne pas associer

officiellement la SFC à ce congrès. Ce qui n'empêche, bien entendu, aucun membre de la SFC d'y participer à titre personnel.

#### **7. Le congrès de la SFC en 2007 et 2008**

Du fait de la survenue de ce Congrès International de Chronobiologie Appliquée en mars 2007 et de la Gordon Conference (Chronobiology) à Aussois en mai 2007, la question s'est posée de maintenir ou non notre congrès annuel, prévu l'an prochain en région parisienne. Il a été décidé qu'il aurait lieu en septembre 2007. C'est Fabienne Aujard qui en assurera l'organisation.

Pour 2008, la question du congrès de la SFC (prévue à Caen) est en suspend dans la mesure où il est possible qu'il y ait la même année le congrès de la European Biological Rhythms Society (EBRS), éventuellement en partenariat avec la Society for

(Suite page 29)

(Suite de la page 28)

Research on Biological Rhythms (SRBR). Si tel était le cas, le congrès annuel de la SFC à Caen serait repoussé à 2009.

### 8. Point sur le bulletin RYTHMES

La fréquence des parutions du bulletin a été très satisfaisante depuis le congrès de Strasbourg 2005 avec trois nouveaux numéros en 2005 et un suivant ce printemps. L'accès au bulletin en ligne est possible pour ceux qui le souhaitent à partir du site internet de la SFC. Fabienne Aujard, Rédactrice en Chef, relance un appel aux adhérents présents pour qu'ils soumettent des articles au bulletin. Fabienne évoque également le problème lié à l'envoi papier à de très (trop !) nombreux adhérents, même si l'envoi de certains exemplaires papiers est parfaitement justifié dans le cas des collections de bibliothèque, par exemple. Afin de subvenir au surcoût résultant de l'envoi de la version papier, celui-ci sera désormais associé à une majoration de la cotisation de 5 €.

### 9. Point sur le site internet de la SFC

<http://www.sf-chronobiologie.org/>

Sophie Lumineau, Secrétaire-adjointe qui assure la maintenance du site, dresse un bilan depuis l'hébergement du nouveau site internet de la SFC par l'Université de Rennes 1 en novembre 2004. Sophie rappelle que ce site a pour fonction de faire connaître notre société et ses activités et note que sa diffusion est bonne. Plusieurs personnes l'ont contactée pour des demandes d'adhésion, de conférences ou d'articles de vulgarisation. Globalement, l'on peut dire que c'est un bon support pour la gestion de la société, en particulier pour la liste des membres et le bulletin RYTHMES. Même si le développement du site actuel est limité, une page en anglais est désormais accessible et quelques réactualisations ont été réali-

sées. Les points négatifs concernent le forum de discussion qui n'est pas du tout utilisé et les annonces (congrès, offres d'emploi, actualités diverses) que chaque membre peut théoriquement placer lui-même grâce à son code d'accès.

### 10. Renouvellement d'une partie du Conseil d'Administration

Aucun membre du Conseil d'Administration n'arrive en fin de mandat cette année.

### 11. Prix Jeune chercheur/chercheuse 2006

Un jury composé de 4 membres du Conseil d'Administration n'ayant pas co-publié avec les candidat(e)s a choisi le lauréat 2006. Le Prix Jeune chercheur/jeune chercheuse (1000 €) sera finalement décerné à Antoine Viola (thèse à Strasbourg ; post-doc à Surrey) lors du repas de gala le 10 mai.

### 12. Points divers

- A l'unanimité, l'Assemblée Générale accepte la proposition du Conseil d'Administration d'augmenter le montant du prix à 1500 € et de reculer l'âge limite de candidature à 35 ans.
- Le Conseil d'Administration propose d'attribuer des bourses de voyage (avec un plafond de 1000 €) à des jeunes chercheurs ou chercheuses francophones en séjour post-doctoral pour venir participer au congrès annuel de la SFC. Cette proposition est votée à l'unanimité.
- Pour clore l'Assemblée Générale, différentes remarques sont évoquées sur l'apprentissage du français et son usage (ou la proportion de son usage) lors du congrès annuel de notre société dite « francophone ». Le débat est lancé !

**Etienne Challet,**  
Secrétaire général

## Manifestations Scientifiques

### 7<sup>ème</sup> école d'été internationale de Chronopharmacologie

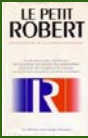


## 7.Course on Chronopharmacology

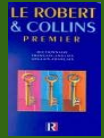
Université de Heidelberg du 31 juillet au 8 août 2006

<http://www.chronopharmacology.de/>

(Suite page 55)



## *French Chronobiological Society or French Speaking Chronobiological Society ??*



### **Faudrait-il renommer la Société Francophone de Chronobiologie (SFC) ?**

Pour avoir, à plusieurs reprises, présenté en quelques mots la SFC à titre de (Past-) Président au cours de congrès internationaux, j'ai eu à préciser que notre Société était non pas la Société FRANCAISE de Chronobiologie mais bien la Société FRANCOPHONE de Chronobiologie. Même s'il semble à première vue qu'il s'agisse de la même chose et qu'à l'heure de la construction de l'Europe ce débat puisse sembler stérile, on voit bien que les objectifs sont différents. Une société Française n'aurait pour but que de rassembler les forces vives (comme le diraient nos politiques) nationales alors que la Francophonie permet d'élargir la participation aux francophones : Européens, Nord-américains, Africains, Asiatiques, Sud-américains, ... et chercheurs familiers avec notre langue. Un récent article du monde, que m'a signalé Fabienne Aujard, précise récemment que "Le Français lutte pour garder sa place dans le monde" (Le Monde, 27 avril 2006) avec 175 millions de personnes officiellement recensées par l'Organisation Internationale de la Francophonie (OIF).

A travers son histoire, la SFC a toujours mis en avant l'utilisation de la langue Française dans le but, à la fois d'élargir notre cercle d'échanges, de permettre à ceux d'entre nous qui ne maîtrisent pas la langue anglaise (mais est-ce encore compatible avec un profil de chercheur ??), d'échanger plus librement mais surtout de pouvoir discuter (donc penser) dans sa langue maternelle. Parmi bien d'autres facteurs, ceci a sans doute participé amplement à la convivialité de nos échanges au cours des congrès annuels.

Mais alors, où est le problème ? Comme j'ai eu l'occasion de l'évoquer à Lyon au cours de notre dernière assemblée générale, il semble que les interventions en langue anglaise soient de plus en plus fréquentes dans les programmes scientifiques des congrès annuels de la SFC. A l'heure du Web, de l'usage du courrier électronique et de la diffusion quasi instantanée par voie électronique des informations scientifiques, et pour avoir vécu le même questionnement dans une autre société il y a de nombreuses années, je peux comprendre que les plus jeunes d'entre nous pensent que ce problème n'en est pas un ou en tout cas qu'ils ne se sentent pas concernés. Il me semble pourtant que dans la vie d'une société cette question mérite que l'on s'y attarde un peu. Que personne ne s'y méprenne : je ne fais ici aucun procès, aucune critique des programmes ou choix des derniers congrès, ni de

« combat » d'arrière garde, mais veux simplement soulever la question de la pérennité, voire la survie et de l'utilité de l'usage du Français à terme dans la SFC et provoquer une réflexion sur le sujet. Il est vrai que la diffusion scientifique passe par l'anglais et personne ne peut plus le contester : donc la publication des résumés du congrès en anglais, par exemple, est sans doute un moyen à terme qu'il faudra saisir si nous voulons vraiment que ces travaux soient lus, connus et cités par d'autres chercheurs que les francophones, même si par ailleurs ou plus tard ils sont publiés dans des revues internationales. L'un des buts de notre congrès annuel devrait rester, me semble-t-il, un « banc d'essai » pour les plus jeunes permettant de s'y roder à la communication orale mais aussi un lieu privilégié de discussion en toute « liberté » et sans arrière pensées ou non dits.

Bien entendu les exposés de chercheurs étrangers leaders (encore un anglicisme !) dans un domaine très particulier, bien sûr la possibilité pour des jeunes chercheurs ou des post-docs maîtrisant mal le Français, ... et bien d'autres raisons, peuvent être évoqués. Bien entendu à l'heure où nous favorisons tous les moyens de diffusion de nos résultats scientifiques et où le rayonnement de la société à travers ses productions est d'actualité, il semble indispensable d'utiliser l'anglais. Pour autant, ne faut-il pas prendre garde à une dérive qui petit à petit va nous amener naturellement et irrémédiablement à échanger systématiquement en anglais ?

Je sais bien que nous ne sommes pas les seuls à nous poser ce genre de questions qui, au passage, n'a semble-t-il été vraiment résolu par aucune société scientifique Française.

Au delà du débat récurrent de la francophonie dans une société scientifique, de l'usage du Français comme outil de communication et de diffusion, cela n'aboutirait-il pas à une uniformisation et la disparition à terme de notre société qui ne pourrait plus se justifier à l'heure des grands regroupements dans tous les domaines ?

Ce débat étant lancé, je me permets de faire remarquer que je suis d'ailleurs sans doute très mal placé et ne me permettrait de donner de leçons à personne dans ce domaine puisque le résumé que j'ai envoyé à Lyon ... était en anglais et qu'en me relisant je remarque que je n'ai pu résister à l'utilisation d'un certain nombre d'anglicismes !

**Bernard BRUGUEROLLE**

[bernard.bruguerolle@medecine.univ-mrs.fr](mailto:bernard.bruguerolle@medecine.univ-mrs.fr)

# Visitez régulièrement le site Web de la SFC

Le site de la Société Francophone de Chronobiologie est consultable à l'adresse

<http://www.sf-chronobiologie.org>

Tout comme l'ancien site, il comporte une présentation de la société et de ses activités ainsi qu'un annuaire de ses membres. Chaque membre recevra un courrier avec un nom de login et un mot de passe personnel qui lui donnera un accès personnel pour notamment modifier sa fiche. Le site constitue aussi une riche source d'informations sur la recherche et l'enseignement qui portent sur la chronobiologie, ainsi que sur l'actualité de cette discipline. Je vous laisse explorer le site de manière plus approfondie et compte sur vous tous pour l'alimenter régulièrement et le faire vivre longtemps !

Sophie LUMINEAU

Mardi 14 Mars 2006

**Société Francophone de Chronobiologie**  
*L'étude des rythmes du monde vivant*

Accueil | Plan du site | Contact

Accueil | La SFC | Actualités | Annonces | Bibliographie | Espace membre | Services | Liens

**Recherche**  
dans tout le site  
> recherche avancée

**Bienvenue sur le site de la SFC.**  
La Société Francophone de Chronobiologie est heureuse de vous accueillir sur son nouveau site. Prenez le temps de naviguer pour découvrir au fil des pages la SFC, son histoire et ses activités...  
...à votre rythme.

**Membre? > Vous identifier**

**Qui sommes-nous**  
➔ Découvrez la Société Francophone de Chronobiologie, ses buts et activités sur les pages de présentation.

**Consulter**  
➔ La revue 'Rythmes'. Découvrez la revue publiée par la SFC.  
➔ Les événements à venir. Colloques, congrès ou émissions en rapport avec la chronobiologie...  
➔ Les annonces en ligne. Offres d'emplois, de stages, sujets de thèses...

**A la une**

- ➔ **38ème Congrès de la Société Francophone de Chronobiologie**  
Limite d'inscription et de soumission des résumés le 1er Mars 2006
- ➔ **Prix 2006 "Jeune Chercheur / Jeune Chercheuse" de la SFC**  
Date limite de soumission des dossiers le 31 mars 2006
- ➔ **CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL : quoi de neuf ?**  
Annonce du Pr. Yvan TOUITOU, ex-Président de la SFC et co-Editeur-en-Chef de CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL
- ➔ **Affiliation de la SFC à la European Biological Rhythms Society (EBRS)**  
Tout membre de la SFC devient membre de la EBRS
- ➔ **Stage de formation en Chronobiologie et Chronomédecine**  
4th International Postgraduate Education Course on Chronobiology and Chronomedicine (PECCC-4)

Accueil | Infos légales | Compatibilité  
Copyright © Didier Durand - 2004

## Comment actualiser ses coordonnées sur le site.

Si vous connaissez votre identifiant et votre mot de passe, aller dans [Espace membres](#) et entrer l'identifiant et votre mot de passe, puis suivre les instructions.

Si vous n'avez pas encore votre identifiant et votre mot de passe, vérifier d'abord que vous êtes bien enregistré dans l'annuaire [Annuaire des membres](#) et cliquer sur la lettre initiale du nom. Noter le mail sous lequel vous êtes enregistré.

Aller dans [Espace membres](#) et cliquer sur [Login/Mot de passe oublié?](#) ; on vous demande alors le mail sous lequel vous êtes enregistré, et vous recevrez alors votre identifiant et votre mot de passe.

# Lyon 2006 - Résumés des présentations

Conférences, communications orales et affichées par ordre alphabétique du premier auteur

## **Molecular mechanisms of entrainment of the mammalian circadian clock**

**Urs Albrecht**

Department of Medicine, Division of Biochemistry, University of Fribourg, Switzerland

The 24-hour succession of light and darkness is probably the most pervasive epigenetic influence in the evolution from a single cell organism to man. This periodic succession of light and darkness provided the base for relative timing of biological processes over the 24 hours of a day. Because energy supply is the limiting parameter for survival, a system for optimal timing of energy expenditure and uptake developed. The mechanism of this system took the shape of a cycle reflecting the recurrence of sunrise and sunset, and is termed a "circadian clock" - a clock with a period of about one day (latin: circa diem). This circadian clock is synchronized to the outside world by rhythmic environmental signals, called 'zeitgeber', by a process called entrainment. The current understanding of the mechanisms behind entrainment in mammals will be discussed, illustrated by our own research on signalling pathways and a potential role of the clock genes Per1 and Per2.

## **Cu et Zn, métaux-clés dans les régulations biologiques: implication en chronobiologie**

**Aragon I, Luu C, Luu V.**

IMDERPLAM Mas de Bonnes Ouest Candillargues (France)

L'analyse de la littérature démontre de plus en plus le rôle majeur et non accessoire des mécanismes d'oxydoréduction et particulièrement celui du cuivre et du zinc.

Nous proposons à l'aide de quelques exemples bibliographiques, et après avoir rappeler quelques notions de biochimie fondamentale, de montrer l'implication de ces métaux en chronobiologie.

Le zinc est après le fer l'élément le plus important dans l'organisme suivi par le cuivre. Ces métaux sont des composants structuraux clés de nombreuses protéines, agissent comme co-facteurs de nombreuses enzymes ex: superoxyde dismutase (SOD), cytochrome oxydase, dans la synthèse des catécholamines et de la mélatonine, dans la régulation des récepteurs (glutamate, muscariniques, sérotoninergiques, opioïdes ...), des canaux ioniques, de l'oxyde nitrique (NO) et le fonctionnement des métallothionines. Leur excès ou leur carence entraînent des états pathologiques qui peuvent induire des biais méthodologiques dans les modèles expérimentaux, de même si l'on ne tient pas compte des propriétés chélatrices de métaux et/ou de radicaux libres de substances endogènes telles que le tryptophane, la 5-HT ou la mélatonine et/ou de substances exogènes telles que les médicaments qui bien souvent ne sont pas déclarés comme tel ex : inhibiteurs de l'enzyme de conversion, beta-bloquants, aspirine, indométhacine ....

Exemple d'implication en chronobiologie: 1) Cu et Zn dans la régulation du noyau suprachiasmatique (NSC); 2) Etude de l'interaction entre la glande pinéale et ces métaux au cours d'une expérience en lumière constante comparant les effets d'une durée de 1 jour versus 7 jours.

**Une alternative au Cosinor, modèles non linéai-**

## **res pour optimiser la détection des rythmes**

**Beau J.1, Iurisci I.1,2, Innominato P.1, Filipski E.1, Lévi F. 1**

1 Inserm U 776, Rythmes biologiques et cancers, Hôpital Paul Brousse, 94800, Villejuif, France,

2 Département d'Oncologie et Neurosciences, Université "G. D'Annunzio", 66013 Chieti, Italie

Le COSINOR est la technique qui permet à la chronobiologie de passer du domaine phénoménologique au domaine scientifique par sa possibilité de quantifier la notion de rythme. La technique initiale, a été développée avec les micro-ordinateurs et améliorée par l'utilisation d'harmoniques.

Cette méthode consiste à modéliser une série de mesures par une fonction sinusoïdale (avec éventuellement des harmoniques). Dans le cas du modèle sinusoïdal il faut déterminer 3 paramètres (3 degrés de liberté, ddl) : M le mesor, A l'amplitude et  $\phi$  l'acrophase (plus éventuellement un quatrième paramètre, la période t), il faut en outre ajouter deux paramètres par harmonique supplémentaire avec un minimum de deux harmoniques soit  $ddl = 7$ . Cependant, lorsque le rythme étudié s'éloigne grandement de la forme sinusoïdale, l'adéquation au modèle est mauvaise sauf à utiliser un nombre d'harmoniques incompatible avec le nombre de données expérimentales. Il s'en suit que pour un phénomène parfaitement rythmique mais de forme éloigné de la sinusoïde, la statistique risque de conclure à l'absence de rythme par un niveau de significativité trop faible.

Nous proposons de sortir du cadre sinusoïdal afin de conclure à la présence de rythme pour d'autres morphologies de signaux. Nous nous sommes en particulier intéressés aux cas de formes plus dichotomiques ou bien asymétriques. Ceci amène d'ailleurs à redéfinir d'une manière alternative, plus en rapport avec la réalité biologique, des notions désormais classiques comme l'acrophase, l'amplitude ou le mesor. Outre l'intérêt de caractériser un rythme que le Cosinor ne pourrait mettre en évidence pour des raisons associées à la morphologie, une modélisation par des fonctions appropriées permet de réduire le nombre de paramètres de la régression par rapport au Cosinor avec harmoniques. Les paramètres période T et niveau moyen ne sont pas toujours requis, le premier pouvant être connu (rythme synchronisé) et le second inexistant (niveau minimum du rythme nul comme l'activité par exemple).

Plusieurs modèles sont proposés ;

- une fonction sigmoïde symétrique avec  $ddl = 4$ ,
- une fonction exponentielle symétrique avec  $ddl = 2$ ,
- une fonction sinusoïdale exponentielle avec  $ddl = 3$ ,
- et fonction sinusoïdale exponentielle dyssymétrique avec  $ddl = 4$ ,
- T et m peuvent éventuellement être ajoutés.

Ces différents modèles sont testés en comparaison avec le Cosinor sur des données expérimentales issues de relevés actimétriques (un patient cancéreux) et de l'évolution de l'expression de gènes (souris). On vérifie bien que l'adéquation morphologique et le niveau de détermination statistique est toujours meilleur qu'avec Cosinor.

(Suite page 33)



(Suite de la page 32)

### **L'organisation de photorécepteurs et la rythmicité de la phagocytose rétinienne chez le Rat de Nil : *Arvicanthis ansorgei*.**

**Bobu C1, Craft CM2, Masson-Pévet M1, Hicks D1.**

1 INCI, Département de Neurobiologie des Rythmes, Strasbourg, France;

2 The Mary D. Allen Laboratory for Vision Research, Doheny Eye Institute, department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, California, 90089-9112, USA.

But : De caractériser la distribution des photorécepteurs : cônes et bâtonnets, l'organisation et la phagocytose rétinienne chez un rongeur diurne *Arvicanthis ansorgei*. Méthodes : Les rétines des animaux adultes d'*Arvicanthis ansorgei* ont été traitées en histologie, microscopie électronique et immunohistochimie en utilisant des anticorps spécifiques pour les bâtonnets et les cônes. Pour l'étude de la phagocytose, les rétines ont été échantillonnées toutes les 3 heures pendant un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité et qui ensuite ont été marquées immunohistologiquement. La quantification des phagosomes dans l'épithélium pigmentaire de la rétine a été faite par une méthode morphométrique.



Résultats : Les rétines de *A. ansorgei* est composée de 33% cônes et de 67% bâtonnets, approximativement 10 fois plus que dans la rétine de rat et de souris. Les cônes sont arrangés en deux couches cellulaires et distribués uniformément sur la surface rétinienne. L'arrestine des cônes est distribuée partout dans les cônes, de segments externes jusqu'aux synapses, l'opsine de cônes rouges est détectée seulement dans les segments externes. La densité de cônes bleus a été quantifiée sur des rétines entières et présente un nombre important dans la région centrale. La quantité des phagosomes des bâtonnets est basse pendant la phase d'obscurité, et présente un pic maximal 1-2 heures après le début du jour. De même, le nombre des phagosomes de cônes rouges est maximal 1-2 heures après le début du jour mais en quantité moins importante que les bâtonnets. Conclusions : Le rongeur diurne *A. ansorgei* possède un nombre important des cônes bien organisés. La phagocytose des segments externes des cônes et des bâtonnets peut être observée simultanément, et montrent des profils similaires mais avec amplitudes différentes. Cette espèce peut être un bon modèle animal pour étudier l'activité rythmique et la pathologie de la rétine (en particulier les photorécepteurs).

### **Variations saisonnières de l'activité ovarienne du Rat des sables, *Psammomys obesus*, du Sud Ouest algérien.**

**Boubekri A, Gernigon Th**

USTHB-FSB-LRZA, El Alia, Bab-Ezzouar, BP :32, Alger, Algérie.

Divers espèces animales, vivant dans les milieux extrêmes, constituent des modèles expérimentaux dans les domaines de la biologie comparée. Le Rat des sables, *Psammomys obesus*, fait parti de ces espèces ; en effet, s'avère très sensible au stress nutritionnel et présente des prédispositions à certains désordres métaboliques. L'espèce étant endémique, sa disponibilité pour l'expérimentation constitue un véritable problème ; pour cela, son élevage est indispensable. Dans ce cadre, sa biologie de la reproduction est étudiée. Chez la femelle, une étude histologique, cytologique et dynamique des ovaires a mis en évidence une variation saisonnière: en automne, en hiver et au printemps, l'activité est cyclique et continue, c'est la période d'activité reproductrice. En été, l'activité cyclique est interrompue, une anovulation saisonnière caractérise les ovaires en cette période de l'année, c'est l'anoestrus saisonnier. Les follicules d'été ne semblent pas différents de ceux examinés en automne, en hiver ou au printemps, cependant, la granulosa murale apparaît plus épaisse. L'ovocyte demeure central, sa vésicule germinative migre en périphérie. Un « cumulus oophorus », souvent épais, se constitue autour de cet ovocyte ; face à l'épithélium germinatif, le stigma n'est plus différencié. Les follicules préantraux semblent évoluer dans les mêmes limites de taille notées en période d'activité. Les tailles minimales, des follicules lacunaires, observées en période de repos (77-82 $\mu$ m) sont relativement proches de celles observées en période d'activité (63-78 $\mu$ m); au contraire, les tailles maximales, au repos (135-210 $\mu$ m) sont plus réduites qu'en période d'activité (245-320 $\mu$ m). Ces variations ne semblent pas liées au phénomène d'atrésie puisque la majorité des follicules lacunaires (68 %) paraissent structurellement sains. Les follicules à antrum unique ont une taille de deux à trois fois plus grande que celle des petits ou même des grands follicules lacunaires. Ce ralentissement dans la progression du follicule lacunaire aboutissant aux petits follicules à antrum unique suggère un ralentissement concomitant de l'activité hormonogène des follicules en cette période d'anoestrus. Les follicules cavitaires sont, cependant, caractérisés par leur grande taille, elle varie de 388 $\mu$ m à 566  $\mu$ m de diamètre. Le repos saisonnier, de la fonction ovarienne du Rat des sables sauvage, coïncide avec les conditions extrêmes du biotope, caractérisées par des températures élevées, une faible hygrométrie et la raréfaction de la végétation. L'arrêt des parturitions, en cette saison, permet aux nouveaux nés d'échapper aux conditions défavorables à leur survie.

### **Chronokinetics of imipenem in rats.**

**Boulamery A, Kadra G, Simon N, Besnard T, Bruguerolle B.**

Laboratoire de Pharmacologie Médicale et Clinique (UPRES EA 3784: Variabilité pharmacologique), Faculté de Médecine de Marseille, Université de la Méditerranée, 27 Bd J. Moulin F 13385 Marseille Cedex 5 France

The aim of this study was to evaluate the influence of

(Suite page 34)

(Suite de la page 33)

different times of intramuscular administration on the disposition of imipenem in rats. Four groups of eight animals were given a single intramuscular injection of 140 mg/kg of imipenem either at 10.00, 16.00, 22.00 or 04.00 h. Blood samples (0.5 ml) were collected 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 hours after injection of the drug and main pharmacokinetic parameters were determined: C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, elimination rate constant (kel), elimination half-life (t<sub>1/2</sub>), area under the concentration-versus-time curve (AUC), total serum clearance (CL/F) and volume of distribution (V/F). Bioavailability (C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub> and AUC) and clearance of imipenem were the main kinetic parameters concerned by a temporal variation with a circadian amplitude of variation of 49%, 92%, 19% and 22% for C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC and CL, respectively, reflecting circadian variations in resorption, distribution and elimination processes. Since pharmacokinetic/pharmacodynamic relations are of particular importance for antibiotics, chronokinetic changes are to be taken into account when administering such drugs, particularly imipenem which needs to be administered twice daily e.g. every 12 hours.

### **Persistance d'une excrétion urinaire de mélatonine et de sulfatoxymélatonine chez le patient pinéalectomisé.**

**Brun J.1, Mottolèse C.2, Kocher L.3, Serusclat P.4, Chazot G.5, Claustrat B.1**

1. Service de Radioanalyse;
2. Service de Neurochirurgie ;
3. Unité de sommeil,
4. Service de Médecine Nucléaire ;
5. Service de Neurologie C, Hôpitaux de Lyon.

L'exérèse d'une tumeur pinéale chez l'homme conduit à l'abolition du rythme de mélatonine (MLT) plasmatique et des taux inférieurs au seuil de sensibilité de la méthode de dosage. Des résultats identiques sont observés chez le rat, mais si les taux plasmatiques de MLT sont diminués pendant la nuit, ils restent détectables pendant la journée. De même, la 6sulfatoxymélatonine (aMT6S) est détectable pendant la phase d'obscurité dans l'urine de rat en condition LL prolongée, suggérant une production extra-pinéale de mélatonine.

**Patients et méthodes :** Les profils journaliers plasmatiques et urinaires de MLT et d'aMT6S sont déterminés chez trois patients ayant subi l'exérèse d'une tumeur ou d'un kyste de la glande pinéale. Les concentrations de MLT et d'aMT6S sont déterminées par RIA dans le plasma ou sur les urines fractionnées.

**Résultats:** Des concentrations significatives de MLT et d'aMT6S sont détectées dans les urines des trois patients, en dépit de taux plasmatiques constamment effondrés sur tout le nyctémère. Les valeurs les plus élevées des profils urinaires de 24h ne sont pas localisées pendant la nuit sauf pour un patient qui présente des taux nocturnes normaux de MLT par rapport à des sujets contrôles dans la même tranche d'âge, alors que l'aMT6S est effondrée.

Ces résultats confirment une production extra-épiphysaire (intestin, rein ...) de MLT chez l'homme comme chez l'animal et sa transformation métabolique. L'influence de la prise alimentaire est à considérer. Les taux plasmatiques faibles d'aMT6S ne sont pas en faveur de l'existence d'un cycle entéro-hépatique pour cette substance.

### **Contrôle circadien de l'ubiquitine protéase**

### **dUSP8 chez *Drosophila melanogaster*.**

**Büschlen S, Martin B, Rouyer F**

*CNRS UPR2216 NGI, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, 91198 Gif sur Yvette France*

Plusieurs études d'analyse globale du transcriptome sur "puces" à oligonucléotides ont montré l'existence d'environ une centaine de gènes à régulation circadienne dans la tête de *Drosophila melanogaster*. Une vingtaine de gènes sont communs aux différentes analyses. Dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le fonctionnement de l'horloge circadienne, nous avons, dans un premier temps, constitué notre base de données de référence avec la souche "sauvage" white, sur une période de 24h. Les transcripts du gène CG5798 montrent un profil robuste de type circadien avec un pic de niveaux de transcripts situé au début de la nuit. D'après sa séquence le gène CG5798 code une ubiquitine protéase, dUSP8, homologue de USP8 de mammifère enzyme de dé-ubiquitination. L'analyse des transcripts montre un pic d'ARNm en début de nuit, et une perte des oscillations chez les mutants arythmiques per0. L'étude de l'expression de la protéine montre des oscillations des niveaux de dUSP8 avec un maximum en fin de nuit. Le décalage entre les oscillations circadiennes des transcripts et celles des protéines suggère des mécanismes de régulation post-traductionnels (phosphorylation, dégradation) similaires à ceux exercés sur les protéines PERIOD et TIMELESS. Par ailleurs, l'analyse de l'expression de dUSP8 en contexte mutant per0, suggère que la protéine PERIOD intervient dans le contrôle post-traductionnel des niveaux de dUSP8. Afin de comprendre le rôle de cette ubiquitine protéase dans l'horloge cérébrale de la mouche et de caractériser ses cibles spécifiques, nous avons généré des lignées transgéniques porteuses d'une forme mutée de la protéine. Les résultats préliminaires obtenus chez ces mutants semblent indiquer que dUSP8 est impliquée dans le fonctionnement de l'horloge circadienne qui contrôle les rythmes d'activité.

### **Age-related changes in the circadian and homeostatic regulation of human sleep**

**Christian Cajochen**

*Centre for Chronobiology, University Psychiatric Hospitals, Basel, Switzerland*

In healthy aging, the reduction of both hallmarks of human non-REM sleep - EEG slow-wave activity and sleep spindles - leads to less consolidated sleep. Whether this reduction is due to circadian or sleep homeostatic mechanisms is not yet known. We have assessed circadian and homeostatic parameters in 16 healthy young (20-31 y) and 16 older volunteers (57-74 y) under high- and low sleep pressure conditions in a 40-h constant posture protocol. We observed an age-related reduction in the amplitude of the endogenous circadian component of the melatonin rhythm of about 40%, a reduced circadian modulation of REM sleep together with a less pronounced day-night difference in the spindle range of sleep EEG activity. This could be interpreted as lowered output of a weaker circadian arousal signal opposing the build-up of homeostatic sleep pressure during the wake episode in the older volunteers. More sleep occurred during the wake maintenance zone, and older subjects experienced higher subjective sleepiness in the late afternoon and evening. There was no age difference in the relative increase in

(Suite page 35)

(Suite de la page 34)

EEG power density in the delta range after 40 h of sleep deprivation, indicating a sustained capacity of the sleep homeostat to respond to sleep loss in aging. The increase in relative EEG delta activity following sleep deprivation showed a frontal predominance (compared with parietal brain regions) in the young, which was diminished in the older volunteers. These findings provide quantitative evidence for the hypothesis that frontal brain regions are particularly vulnerable to the effects of both elevated sleep pressure and aging. In conclusion, our data suggest that potential manipulations of the circadian timing system rather than the sleep homeostat may offer a potential strategy to alleviate age-related changes in sleep and daytime alertness levels.

### **La régulation réciproque de *BMAL1* et *PPAR $\alpha$* définit une nouvelle boucle de régulation positive au sein de l'horloge hépatique de la souris.**

**Canaple L1, Rambaud J1, Dkhissi-Benyahya O2, Rayet B3, Tan NS4, Michalik L4, Delaunay F3, Wahli W4, Laudet V1**

1 CNRS UMR 5161, IFR 128, Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Ecole Normale Supérieure, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France ;

2 INSERM U-371, IFR 19-UCBL, 18 avenue du Doyen Lépine, 69675 Bron, France ;

3 Université de Nice Sophia Antipolis CNRS FRE 2721 Bâtiment de Sciences Naturelles 28, Avenue Valrose 06108 Nice cedex 2 France ;

4 Centre de Génomique intégrative, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suisse.

De récents travaux suggèrent qu'en plus de son rôle incontesté dans le métabolisme des lipides, PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) pourrait être un facteur important connectant l'horloge circadienne et le métabolisme. Dans la présente étude, nous avons analysé l'influence de PPAR $\alpha$  sur les oscillateurs à la fois de l'horloge centrale localisée dans le noyau suprachiasmatique et de l'horloge périphérique du foie. En comparant des souris PPAR $\alpha$ <sup>-/-</sup> à des souris sauvages, nous montrons que PPAR $\alpha$  joue un rôle spécifique dans le contrôle des horloges circadiennes périphériques puisqu'il est nécessaire au maintien du rythme circadien du gène horloge *bmal1* *in vivo*. Cette régulation se fait via une liaison directe de PPAR $\alpha$  sur une séquence PPRE située dans le promoteur de *bmal1*. En retour, nous observons également que BMAL1 est un régulateur de l'expression du gène PPAR $\alpha$ . De plus, les fénofibrates, activateurs de l'expression de PPAR $\alpha$ , induisent l'expression rythmique des gènes horloges dans des cellules en culture et stimulent l'expression hépatique de *bmal1* *in vivo*. L'ensemble de ces observations démontre l'existence d'une boucle d'autorégulation additionnelle impliquant BMAL1 et PPAR $\alpha$  au sein de l'horloge hépatique.

### **Ontogenèse du rythme veille-sommeil : du fœtus à l'enfant.**

**Challamel M.J.**

Unité de sommeil de l'enfant, Hôpital Debrousse, Lyon. Unité Inserm 648, Lyon

Les états de vigilance s'organisent dès la période fœtale. Chez le fœtus la concordance des différentes variables caractérisant les états de sommeil agité (SA) et de sommeil calme (SC), respectivement équivalent du sommeil paradoxal (SP) et du sommeil lent (SL) de l'adulte, appa-

raît à partir de 27 semaines de gestation. Dès 3 mois, il est possible d'individualiser dans le SC les différents stades du SL. L'organisation nyctémérale du SL profond et du SP apparaît à 1 an. La disparition des siestes entre 2 et 6 ans est associée à une importante réorganisation du sommeil nocturne.

Les noyaux supra chiasmatisques (NSC) sont probablement fonctionnels très tôt au cours de la période fœtale. Des rythmes circadiens pour la fréquence cardiaque, la motilité et la respiration ont été objectivés pendant le dernier trimestre de la gestation. Ces rythmes sont probablement sous le contrôle des NSC du fœtus mais dépendent aussi des synchroniseurs maternels : sécrétion de cortisol et de mélatonine, rythme activité/repos. A la naissance la composante circadienne pour le rythme veille /sommeil existe mais elle est masquée, au cours des toutes premières semaines de vie, par l'importance des rythmes



Olivier Walusinski et al.

[http://www.baillement.com/recherche/fetal\\_yawning.owf.html](http://www.baillement.com/recherche/fetal_yawning.owf.html)

ultradiens des états de sommeil et des prises alimentaires. L'évolution du rythme veille/sommeil d'un rythme ultradien de 3-4 heures vers une stabilisation des rythmes sur 24 heures est précoce ; elle peut apparaître dès la fin du premier mois de vie. Les rythmes circadiens synchronisés sur le rythme jour/nuit pour les fréquences cardiaques, les mouvements corporels, la température corporelle, le cortisol et la mélatonine, apparaissent tous au cours des deux premiers mois de vie. L'importance de l'alternance jour/nuit pour la mise en place des rythmes circadiens de 24 heures est peu discutée au cours de la période post natale. Ce rôle reste encore incertain au cours de la période prénatale et chez le nouveau-né prématuré. Rythmes sociaux et alternance lumière/obscurité jouent un rôle important dans la mise en place des rythmes circadiens de 24 heures ; ils ont probablement une influence sur la stabilité du sommeil et la synchronisation entre rythmes circadiens veille/sommeil et rythmes circadiens biologiques, mais le développement de cette synchronisation reste inconnu.

### **Synchronisation alimentaire des rythmes circadiens**

**Challet E**

Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS, Université Louis Pasteur, 67084 Strasbourg

La synchronisation de l'horloge circadienne principale,

(Suite page 36)

(Suite de la page 35)

localisée dans les noyaux suprachiasmatiques, est basée essentiellement sur une remise à l'heure quotidienne par des stimuli lumineux. Les déphasages induits par la lumière sont corrélés à une activation de la transcription de deux gènes d'horloge, Per1 et Per2. Lorsque la nourriture est disponible ad libitum, l'organisation temporelle des oscillateurs périphériques est contrôlée par l'horloge suprachiasmatique. Néanmoins, un accès à la nourriture limité à seulement quelques par jour (ou restriction alimentaire temporelle) est un puissant synchroniseur des oscillations périphériques, notamment dans le foie, alors qu'il n'affecte pas directement l'horloge suprachiasmatique. En revanche, une restriction alimentaire calorique, qui impose une quantité limitée de nourriture disponible chaque jour (ou nourrissage hypocalorique), provoque une avance de phase des rythmes journaliers d'activité locomotrice et de mélatonine, des changements d'expression de gènes circadiens ainsi que des modifications de la synchronisation photique. Les déphasages de l'activité locomotrice et les conséquences transcriptionnelles du nourrissage hypocalorique sont altérés par la mutation des gènes Per1 et Per2. Ainsi, une telle situation de conflit entre synchroniseurs lumineux et alimentaires est capable de modifier l'organisation rythmique générée par l'horloge suprachiasmatique et synchronisée par le cycle lumière-obscurité. De plus, de nombreux résultats expérimentaux ont conduit à soupçonner l'existence d'une horloge alimentaire. En effet, chez des animaux ayant une lésion complète de l'horloge suprachiasmatique, une organisation rythmique peut être restaurée par un nourrissage périodique. En particulier, les animaux restreints sans horloge suprachiasmatique expriment alors des rythmes circadiens d'activité et de corticostéronémie qui anticipent l'heure du nourrissage. La localisation (cérébrale ?) de l'horloge alimentaire comme ses mécanismes moléculaires restent à préciser. Un bilan sera fait du criblage phénotypique de souris mutantes pour des gènes circadiens potentiellement impliqués dans cette horloge.

#### **Bases de modélisation pour la synchronisation des horloges circadiennes**

**Clairambault, J.1, Laroche, B.2**

1 INRIA, Domaine de Voluceau, BP 105, 78153 Le Chesnay, France ; 2 INRA, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas, France.

La synchronisation des horloges circadiennes, au niveau central hypothalamique comme au niveau périphérique des tissus et des organes, s'exerçant par l'intermédiaire de messages nerveux ou humoraux, est supposée jouer un rôle positif en physiologie animale et humaine, renforçant la coopérativité et l'adaptabilité à un stimulus extérieur entre cellules d'un même tissu.

Leur perturbation (désynchronisation des rythmes circadiens) au niveau périphérique des tissus cancéreux un effet d'accélération de la croissance tumorale, et au niveau central pourrait être en rapport avec les syndromes de « fatigue » observés dans les décalages horaires transméridiens (jet-lag) et dans un certain nombre de pathologies inflammatoires et tumorales et leurs traitements, par exemple par interféron ou interleukines (certains de ces effets semblent bien en rapport avec une élévation du taux sérique de cytokines, endogènes ou d'apport thérapeutique).

Nous proposons un modèle mathématique simple à base de réseaux d'oscillateurs circadiens aussi bien au niveau

central qu'au niveau périphérique, pour analyser cette synchronisation et ses perturbations. En ce qui concerne la prolifération tumorale, le signal périodique en provenance des horloges circadiennes périphériques (Bmal1, ou Per1,2 ainsi désynchronisé, par exemple par des variables représentant les taux de cytokines) a pour cible, notamment par l'intermédiaire du gène Wee1 et des dimères Cycline-Cdk, les transitions de phases du cycle cellulaire qui peuvent être représentées dans un autre modèle mathématique décrivant la prolifération tissulaire et les perturbations de son contrôle.

En conclusion, ce modèle a pour but premier de fournir un rationnel aux effets périphériques de la désynchronisation circadienne sur la prolifération tumorale ; mais il pourrait aussi être utilisé ultérieurement pour évaluer les effets centraux (par exemple sur le sommeil et la cognition) de cette désynchronisation, retrouvée dans nombre de situations pathologiques animales et humaines.

#### **Influence du vieillissement sur l'expression des gènes horloges dans les NSC et les tissus périphériques (foie, cœur, rein) chez le rat femelle Wistar (Wag-Rij).**

**Claustrat F 1, Geelen G 2, Dkhissi-Benyahya O 3,, Blanco T 1, Blanchard O 1, Corman B 4, Claustrat B 1**

1 Service de Radioanalyse, Groupement Hospitalier Est, 59 boulevard Pinel - 69677 BRON Cedex

2 Laboratoire de Physiologie de l'Environnement, Faculté de Médecine Grange-Blanche-69008 LYON.

3 Unité INSERM Cerveau et Vision U371, avenue du Doyen Lépine - 69500 BRON,

4 Successful Aging Database, 31 rue d'Aguesseau - 92100 BOULOGNE-

Le vieillissement s'accompagne d'une modification des rythmes biologiques (diminution de l'amplitude en particulier). Nous avons étudié, l'influence de l'âge sur l'expression des gènes horloges dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC), le foie, le cœur et le rein chez le rat femelle Wistar (WAG/Rij). Les femelles de cette souche présentent une longévité supérieure à celle des mâles (médiane 34,6 vs 27,1 mois) et conservent une fonction rénale intacte au cours du vieillissement.

Matériels et méthodes : Les rats femelles élevés en cycle L/D 12:12 avec une nourriture ad libitum sont sacrifiés à 13 (n=14) et 28 mois (n=14). Les NSC, le foie, le cœur et les reins sont prélevés le matin (ZT0-2) et le soir (ZT10-12), tranches horaires qui correspondent en général à l'amplitude maximum de la variation circadienne de l'expression des gènes lorsqu'elle existe. Le niveau d'expression des gènes horloges (Per1-2-3, Cry1-2, Clock, Bmal1 et *Reverb- $\alpha$* ) est évalué par RT-PCR (LightCycler, Roche®). Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (heure et âge) suivie de comparaisons multiples est appliquée aux résultats après normalisation des données. Résultats : Chez les rats matures, Per1-2-3, Bmal1 et *Reverb- $\alpha$*  présentent des expressions différentes entre le matin et le soir, avec une significativité plus marquée dans le foie. Chez les rats âgés, l'expression des gènes présente un amortissement (Per1, 2, 3, *Reverb- $\alpha$* ) et/ou même une inversion des variations matin-soir (Cry1, 2, AVP) dans les NSC. Une diminution de variation d'expression matin-soir est observée dans le foie pour Per2 et Bmal1 ainsi que dans le cœur pour Per2 et Cry2. A l'inverse, Per2 présente une augmentation de son expression le soir dans le rein.

(Suite page 37)

(Suite de la page 36)

Conclusion. L'amplitude de variation de l'expression des gènes horloges est plus marquée dans le foie, organe à capacité de régénération rapide. Dans les NSC, le vieillissement entraîne une diminution de l'amplitude de variation matin-soir de l'expression de certains gènes. L'augmentation de l'expression du gène Per2 le soir dans le rein des rats âgés pourrait être relié au maintien de la fonctionnalité de cet organe au cours du vieillissement.

### **Rythmicités du sommeil nocturne d'enfants parisiens de 5 à 10 ans selon leur environnement socio économique et l'aménagement scolaire.**

**Clarisse R, Le Floc'h N, Testu F.**

*Laboratoire de Psychologie Expérimentale, E.A. 2114 « Vieillesse et développement adulte ». Equipe de Recherche Technologique éducation 1053 ERT(e) « Aménagements des temps de vie et comportements humains » - Université François Rabelais, 3 rue des Tanneurs, BP 4103, 37041 Tours cedex 1.*

Cette recherche réalisée auprès de 617 enfants de 5 à 10 ans, scolarisés dans des écoles de la ville de Paris, avait pour but d'étudier les variations du sommeil nocturne selon l'âge, l'environnement socio-économique (ZEP versus non ZEP) et l'aménagement scolaire (aménagé versus non aménagé). Le recueil des données concernant le sommeil est obtenu à partir d'un agenda rempli jour après jour par les parents, complété d'une évaluation des habitudes de sommeil des enfants. Les principaux résultats obtenus par analyses de variance ont permis de confirmer la nécessité d'une approche développementale concernant la réduction du temps de sommeil entre la fin de maternelle et la fin de primaire. Cependant, cette évolution est apparue plus graduelle pour les enfants non scolarisés en ZEP. Pour tous les enfants et quelle que soit la zone d'éducation, l'horaire de classe du matin s'est affirmé comme un synchroniseur social puissant dans l'organisation familiale, induisant un lever environ une heure avant le début de la classe. Le décalage des horaires du week-end et en particulier ceux du coucher semblerait amoindri sous l'effet des aménagements mis en place. Les enfants bénéficiant d'aménagements scolaires présentaient une régularité du sommeil tout au long de la semaine qui semblerait pondérer des conclusions précédentes obtenues en Zone d'Education Prioritaire. L'effet modérateur de l'environnement éducatif serait à prendre en compte dans l'analyse des pratiques à l'égard du sommeil relevées dans ces environnements socio économiques. Ces premiers résultats seront complétés d'analyses intégrant l'estimation parentale du besoin de sommeil des enfants et le repérage des enfants sur une typologie petit dormeur versus gros dormeur. Les profils attentionnels correspondants à cette typologie seront présentés.

### **Circadian Activity Monitoring System (Cams): a 448 channel data acquisition system for activity recording**

**Cooper JA, Cooper HM**

*INSERM U371, Cerveau et Vision, Department of Chronobiology, 18 Avenue du Doyen Lépine, Bron, France; IFR19, UCBL1, Lyon, France*

We present the Circadian Activity Monitoring System (CAMS), a multi-channel data acquisition system for continuous, unattended, uninterrupted data collection of locomotor activity. CAMS is simple to use and is based on

robust industrial grade components including a compact industrial grade PC, interface and data acquisition modules designed for use in harsh environments. The system uses only 20 Watts of power and has no moving parts (all solid state components). The system has up to 448 input channels and accepts various captors including wheels, infrared captors and mechanical switches. Activity is recorded in 1 minute bins in a compact file structure. Ambient light and temperature detectors are also available. The user can define the type of captor, channel codes, experimenter ID, time interval since no activity detected on a channel. Results are displayed as raster and cumulative actograms and the light cycle data can be superimposed on the activity rhythm. The data files can be read by commercial circadian analysis programs such as ClockLab (Actimetrics) and Actiview (MiniMitter) or converted to standard ASCII file format (Excel). Up to 50 outputs are available for controlling the light cycle or other external devices. Recording periods can be defined to automatically save the files to individual folders (i.e. every 21 days) saved on the flash card memory. An important feature of the system is the protection against power failure. The system will automatically restart, update the data files, and provide a warning message of the time of power-off, power-on. CAMS is available through licence agreement by the INSERM Bureau de Valorisation. Support: FP6- EUCLOCK, ACI MENRT, INSERM ACT, Emergence-Rhône-Alpes.

### **Modulation du système circadien par la sérotonine chez un rongeur diurne : *Arvicantis ansorgei***

**Cuesta M, Mendoza J, Pévet P, Challet E.**

*Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département de Neurobiologie des Rythmes, Strasbourg, France.*

Chez les Mammifères, les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC) remplissent le rôle d'horloge interne et sont capables d'imposer à de nombreuses fonctions biologiques, une rythmicité circadienne basée sur la transcription et la traduction de gènes horloges (Per, Cry...). Cette horloge a la propriété de pouvoir être synchronisée par divers facteurs, la lumière étant le plus puissant d'entre eux. Parmi les autres facteurs, les stimulations sérotonergiques ont un intérêt particulier, puisqu'il existe une voie sérotonergique endogène allant des noyaux du Raphé vers les NSC. De nombreuses études ont montré que des agonistes sérotonergiques dont le (+) 8-OH-DPAT, étaient capables d'influencer l'horloge des rongeurs nocturnes. Dans le but d'étudier un modèle animal qui a une organisation temporelle plus proche de celle de l'Homme, nous avons examiné chez un rongeur diurne, *Arvicantis ansorgei*, en obscurité constante, les effets d'une stimulation sérotonergique avec ou sans créneau de lumière. Les injections intra-péritonéales de l'agoniste sérotonergique induisent des avances de phase de l'activité locomotrice d'*Arvicantis* essentiellement pendant la nuit subjective. Par contre elles n'ont pas d'effet pendant le milieu du jour subjectif, horaire d'action de cet agoniste chez les animaux nocturnes. Pour induire ces déphasages dose-dépendants, nous avons montré que le (+)8-OH-DPAT active les récepteurs 5-HT7 situés dans les NSC et/ou les noyaux du Raphé. Une stimulation sérotonergique appliquée en début de nuit subjective dimi-

(Suite page 38)

(Suite de la page 37)

nue le niveau d'expression de l'ARNm de Per2 mais non de Per1. Ces résultats sont les mêmes que chez les animaux nocturnes pour Per2, mais non pour Per1. En début de nuit subjective, un créneau de lumière induit des retards de phases que les animaux soient nocturnes ou diurnes. Mais lorsque ce créneau est précédé d'une stimulation sérotonergique, ces retards sont réduits pour les espèces nocturnes, alors que nous avons observé qu'ils étaient potentialisés chez *Arvicantis*. En conclusion, l'analyse du système sérotonergique et de son influence sur la synchronisation photique chez un animal diurne met en évidence des régulations différentielles qui pourraient améliorer la compréhension de la diurnalité.

### **How *Drosophila* morning and evening oscillators respond to light?**

**Cusumano P, Klarsfeld A, Chélot E, Rouyer F.**

*Institut de Neurobiologie Alfred Fessard (NGI, CNRS UPR 2216), Gif-sur-Yvette, France*

In *Drosophila melanogaster*, circadian rhythms of locomotor activity are controlled by several groups of clock neurons in the brain. In each hemisphere, these neurons are bilaterally clustered in 6 groups: 3 groups of dorsal neurons (DNs), 2 groups of ventral lateral neurons (LNvs) and 1 group of dorsal lateral neurons (LNds). Recently, it has been shown that the bimodal activity of the flies in LD conditions is controlled by at least two different oscillators: one resides in the LNvs and controls the morning bout of activity, whereas the other is located in the LNds and generates the evening one. We are interested in understanding how the light:dark cycles entrain the morning and evening oscillators to synchronize the activity of the animal and the adaptation of this activity to the seasonal changes of the daylength.

Light stimuli entrain the *Drosophila* brain circadian clock through two different pathways: the cryptochrome, a blue-light photoreceptor that is expressed in the clock neurons, and the rhodopsins that are expressed in the visual system.

To understand how the different oscillators respond to light, we have analysed the locomotor activity rhythms of *per0* flies, in which PER protein was expressed only in specific subsets of clock neurons. Our results indicate that flies carrying functional morning and/or evening oscillators do not generate the same response to light and that



these different subsets of clock neurons see light through different cellular and molecular pathways.

### **Chronobiologie et activité physique et sportive**

**Davenne D, Gauthier A, Moussay S, Mauvieux B.**

*Centre de Recherches en Activités Physiques et Sportives, EA2131, Université de Caen, France*

En s'adaptant à l'effort physique l'organisme humain mobilise de très nombreuses capacités physiologiques (force musculaire, métabolisme, adaptations cardiovasculaires, etc.) et psychologiques (motivation, cognition, etc.). Or, prises individuellement, chacune de ces capacités fluctue en fonction du temps avec une périodicité et une amplitude qui lui est propre<sup>1</sup>.

Les connaissances sur ces variations ont considérablement évoluées ces dernières années en grande partie grâce à l'évolution technologique permettant l'enregistrement des grandes variables biologiques impliquées dans l'adaptation à l'effort physique

Quelques grandes questions demeurent dans la compréhension de ces phénomènes. La première porte sur la dépendance de la rythmicité des performances, aussi bien physiologiques que psychomotrices à la température centrale. Le problème de la possibilité d'une relation causale entre les deux n'est pas complètement résolu<sup>2</sup>. La deuxième porte sur l'aptitude de l'organisme à prendre en compte les fluctuations de chacun des paramètres pour faire en sorte que l'organisme puisse rester performant tout au long des 24 heures. En enregistrant les différents paramètres de la performance en cyclisme à différentes heures de la journée, nous avons pu constater que les systèmes ont de grandes capacités d'adaptation qui intègrent les fluctuations temporelles de chaque paramètre<sup>3</sup>. Nos travaux sur l'étude des relations entre activité physique et chronobiologie ouvrent aussi des perspectives intéressantes en terme de santé et de bien-être pour des individus dont la sédentarisation (insuffisance motrice ?) est génératrice de nombreuses pathologies. Ils montrent que l'activité physique, notamment quand elle est pratiquée régulièrement, a un impact sur la rythmicité biologique, soit sur les différents rythmes pris individuellement, soit sur leur synchronisation<sup>4</sup>.

Enfin, l'étude des perturbations des performances lors de privation de sommeil montre que ce dernier occupe une place majeure dans l'organisation de la rythmicité biologique humaine.

1 Davenne D, Rythmes biologiques et activités physiques et sportives, In Médecine du Sport, Masson, 2005, 579-589.

2 Bessot N, et al. The influence of circadian rhythm on muscle activity and efficient force production during cycling at different pedal rates, J. Electromyography and Kinesiology (sous presse).

3 Moussay S, Diurnal variations in cycling kinematics, Chronobiol Int, 20 (2003) 879-89

4 Mauvieux B, et al, A study comparing circadian rhythm and sleep quality of athletes and sedentary subjects engaged in night work, Canad J Appl Physiol, 28 (2003)831-887.

### **Liens moléculaires entre oscillateurs circadiens et cycle cellulaire**

**F. Delaunay, A. Gréchez, B. Rayet, F. Guillaumond et M. Teboul.**

*Université de Nice-Sophia Antipolis, CNRS UMR 6548, 28*

(Suite page 39)

(Suite de la page 38)

Parc Valrose, 06 108 Nice cedex2, France

Le système circadien permet aux mammifères d'adapter leur physiologie en fonction du cycle jour/nuit. La rythmicité des processus physiologiques est ainsi assurée par une multitude d'horloges circadiennes présentes dans la plupart des cellules de l'organisme et dont les phases sont coordonnées grâce à une horloge centrale située dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus. Les composants moléculaires de ces horloges sont des gènes et leurs produits qui interagissent pour former des boucles d'autorégulation transcriptionnelles et post-traductionnelles générant des oscillations moléculaires dont la période est d'environ 24 h. Depuis longtemps, il a été observé que certains rythmes de prolifération cellulaire ont une périodicité circadienne, suggérant des liens entre rythme circadien et cycle cellulaire. Ce n'est cependant que récemment que des bases mécanistiques ont pu être proposées. Il a par exemple été montré que les gènes horloge contrôlent l'expression circadienne de la kinase Wee1 et que cela joue un rôle important dans la cinétique des mitoses lors de la régénération hépatique. Nos travaux récents indiquent également que ces mêmes gènes horloge contrôlent via un mécanisme différent l'expression rythmique de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21<sup>waf1</sup>. Ces résultats seront présentés et discutés.

### **Effet du vieillissement sur le comportement et l'expression des gènes horloges chez un modèle primate**

**Dkhissi-Benyahya O1,2, Valleix C1,2, DeVanssay W1,2, Aujard F3, Perret M3, Cooper HM1,2**

1. Inserm U371, Cerveau et Vision, Dpt de Chronobiologie, Bron, France;

2. UCBL1-IFNL, Lyon, France;

3. Equipe d'Ecophysiologie, UMR 5176 CNRS-MNHN

Le vieillissement s'accompagne de plusieurs modifications du système circadien qui affectent l'amplitude et la phase de divers rythmes biologiques (activité locomotrice, cycle veille/sommeil) générés par l'horloge centrale localisée dans les noyaux suprachiasmatiques (SCN) de l'hypothalamus. La réponse de l'horloge centrale aux stimuli environnementaux tels que la lumière est également affectée au cours du vieillissement. Une question majeure est de déterminer si les modifications des rythmes circadiens, observées au cours du vieillissement sont le résultat d'altérations de l'horloge centrale, des oscillateurs périphériques, et/ou des mécanismes impliqués dans la synchronisation de ces oscillateurs. L'objectif est d'évaluer si les rythmes de l'activité locomotrice et de l'expression des gènes horloge au niveau des horloges centrales et périphériques sont modifiés au cours du vieillissement chez un modèle primate nocturne (*Microcebus murinus*). L'entraînement photique est évalué en exposant les animaux jeunes et âgés à un cycle lumineux 14L/10D. Le cycle lumineux imposé sera successivement décalé de 6 heures et associé à l'application de niveaux de lumière d'intensité décroissante (100-0,1 lux). L'expression circadienne des gènes horloge a été mesurée dans le SCN et les oscillateurs périphériques par PCR en temps réel. Nos résultats montrent que l'entraînement photique est conservée au cours du vieillissement avec néanmoins une activité locomotrice plus fragmentée chez le primate âgé. Les profils d'expression circadienne des gènes horloge ne sont pas modifiés au niveau de l'horloge centrale,

alors que les oscillateurs périphériques montrent des rythmes d'expression atténués ou décalés selon le gène ou le tissu. Ces données préliminaires suggèrent que les effets du vieillissement sur les rythmes circadiens impliquent principalement des modifications au niveau des oscillateurs périphériques.

### **Synchronisation des horloges centrale et périphériques chez un modèle de souris déficient en cônes**

**Dollet A, Cooper H.M. de Vanssay W, Dkhissi-Benyahya O.**

Inserm U371, Cerveau et Vision, Dpt de Chronobiologie, Bron, France

Chez les mammifères, les rythmes circadiens sont générés et contrôlés par l'horloge interne, localisée dans le noyau suprachiasmatique (SCN) de l'hypothalamus. La phase de l'horloge endogène centrale est synchronisée au cycle environnemental de lumière par l'intermédiaire de la mélanopsine, photopigment exprimé dans des cellules ganglionnaires photosensibles de la rétine et par les cônes et les bâtonnets. Le fonctionnement autonome de l'horloge biologique du SCN repose sur des mécanismes impliquant les gènes horloges (Per 1-3 ; Cry 1-2 ; Clock, Bmal1, Tim) et leurs protéines, dont certains forment une boucle de rétroaction autorégulée, avec une rythmicité de 24 heures. L'existence d'horloges circadiennes périphériques situées en dehors du NSC a été démontré dans divers tissus (foie, cœur, muscles, intestin, etc...). Ces horloges périphériques utilisent les mêmes mécanismes moléculaires que l'horloge centrale, mais sont synchronisées par des signaux différents. Des altérations fonctionnelles des rythmes circadiens sont observées lors de maladies neurodégénératives et au cours du vieillissement et pourraient être consécutives à une désynchronisation entre les horloges centrales et périphériques. Afin de tester l'hypothèse qu'un défaut au niveau de l'entrée du système circadien (rétine) puisse être à l'origine d'une désynchronisation entre les horloges biologiques, nous avons utilisé un modèle de souris knockout (TRb<sup>-/-</sup>), caractérisé par l'absence de cônes MW (middle wavelength). L'expression circadienne des gènes horloges Per1, Per2, Per3, Dbp, Cry1, Cry2, Clock, et Bmal1 a été étudiée au niveau de l'horloge centrale et des oscillateurs périphériques chez des souris sauvages témoins et des souris (TRb<sup>-/-</sup>) par PCR en temps réel. Nos résultats préliminaires montrent une perturbation de l'expression circadienne de ces gènes, dépendantes du tissu et/ou du gène étudié chez les souris déficientes en cônes MW.

### **Capteur non invasif ambulatoire de mesure de température cérébrale et/ou centrale pour l'étude de rythmes circadiens**

**Dittmar1, C. Gehin1, G. Delhomme1, D. Boivin2, G. Dumont3, P.M. Schmitt1, C. Mott3**

1. Microcapteurs Microsystèmes Biomédicaux, LPM CNRS - INSA de Lyon, Bât Léonard de Vinci, 20 Av. Albert Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex,

2 Centre for Study and Treatment of Circadian Rhythms, McGill University, 6875 LaSalle, Montreal QC, Canada H4H 1R3.

3 Department of Electrical and Computer Engineering, University of British Columbia, 2332 Main Mall Vancouver, BC, Canada V6T 1Z4..

(Suite page 40)

(Suite de la page 39)

Les centres thermorégulateurs étant situés dans la zone profonde du cerveau, la température cérébrale est l'un des marqueurs les plus importants des rythmes circadiens. Cependant du fait de son manque d'accessibilité la température cérébrale est difficilement et peu mesurée. Les températures axillaires, buccales, tympaniques et rectales ne reflètent pas exactement la température cérébrale. Néanmoins la température rectale est utilisée généralement comme indicateur de la température centrale. Cependant aucune de ces méthodes de mesures n'est utilisable commodément pour des utilisations en long terme, ambulatoire en dehors du laboratoire ou de l'hôpital et pour des activités journalières normales. Le capteur non invasif de température cérébrale et centrale ("BCT" Brain and Core thermometer) a été conçu et développé par l'équipe CNRS Microcapteurs Biomédicaux LPM/INSA de Lyon dirigée par A. Dittmar. Ce capteur est de type actif basé sur le principe d'une "régulation de flux thermique nul" de la zone à mesurer, permettant d'amener à la surface corporelle la température profonde. Le capteur a été optimisé dans une première phase par l'étude de la morphologie de la génération de ses champs thermiques sur un modèle physique reproduisant les caractéristiques thermovasculaires cérébrales et corporelles. Les mesures effectuées au centre d'étude des rythmes circadiens de l'hôpital Douglas, Montréal montrent que les mesures de température rectale et par "BCT" sont très proches dans leurs valeurs absolues et leurs évolutions (1 à quelques 1/10°C) sur des durées de plusieurs jours. Les réactions émotionnelles lors de stimulations sensorielles ou cognitives sont détectées par le capteur. Exemple : un calcul mental peut induire une augmentation de 3,5/100°C (mesure en zone temporale) alors que la température cutanée temporale opposée chute de 3/10°C. Ces résultats obtenus avec un appareil à poste fixe et liaison filaire montrent qu'il répond aux critères nécessaires pour être un "marqueur circadien" en milieu hospitalier. La version ambulatoire est en cours de validation avec une autonomie pouvant dépasser plusieurs jours. D'autres sites anatomiques sont prévus permettant des mesures non apparentes ou discrètes, le capteur étant dissimulé sous les habits.

### **Les ARN interférents dans une région cible du cerveau de la brebis: un nouvel outil pour l'étude des rythmes saisonniers ?**

**Dufourny L, Migaud M, Malpoux B.**

*Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA - CNRS (UMR 6175) - Université de Tours - Haras nationaux, IFR135, 37380 Nouzilly, France.*

L'invalidation d'un gène localisée dans une région cible du cerveau représente un outil précieux pour comprendre l'importance de ce gène dans une fonction déterminée. Dans le cadre de l'étude d'une fonction saisonnée, comme la reproduction des ovins, l'enjeu est de maintenir l'invalidation pendant une période suffisante pour permettre d'analyser l'influence du gène. Nous avons développé une technique d'ARN interférents produits par des Adeno-Associated virus (AAV) porteurs d'une séquence d'ADN (19 oligonucléotides) codant pour la tyrosine hydroxylase (TH) ovine. La TH est l'enzyme limitant la synthèse de dopamine, un neurotransmetteur du noyau A15 qui transmet le rétrocontrôle négatif des oestrogènes aux neurones à GnRH lors du passage en anoestrus saisonnier.

Des canules ont été implantées bilatéralement sous contrôle stéréotaxique afin d'injecter 5µl d'une solution virale (8-9.10<sup>11</sup> Vg/ml) dans les noyaux A15 de brebis ovariectomisées et portant un implant d'oestradiol. Dans une première expérience permettant de quantifier l'inhibition induite, un hémisphère cérébral a reçu des virus porteurs de séquences codant pour la TH et l'autre des virus contenant des séquences aléatoires. Après des temps de survie de 15 (n=4) ou de 80 (n=5) jours, les brebis ont été abattues, leur cerveau fixé par perfusion (4% paraformaldéhyde) et sectionné au cryostat. Les neurones à TH ont été recherchés par immunocytochimie et comptés dans le noyau A15. Nous constatons une diminution de 49,2±3,2% après 15 jours de survie et de 36,4±2,2% après 80 jours du nombre de neurones immunoréactifs du côté traité par rapport au côté témoin. Dans une deuxième expérience visant à analyser l'effet physiologique de l'invalidation, les virus inhibant la TH ont été injectés bilatéralement un mois avant de transférer des brebis d'un traitement jours courts à un traitement jours longs. L'effet inhibiteur des jours longs sur la sécrétion de LH n'est pas différent entre brebis traitées et brebis témoins ce qui suggère que le pourcentage d'inhibition des neurones à TH n'est pas suffisant. De nouvelles expériences sont envisagées afin d'augmenter ce pourcentage et de favoriser l'observation d'un effet physiologique. Nous remercions la plateforme de Production de Vecteurs Viraux (CHU de Nantes) financée par l'Association Française contre les Myopathies (AFM) pour les virus AAV.

### **Local perfusion of corticosterone mimicking inflammation in the rat pineal gland increases melatonin production.**

**Fernandes PACM1,2, Bothorel B1, Markus RP2, Simonneaux V1**

*1 Département de Neurobiologie des Rythmes, INCI, Strasbourg, France ;*

*2 Laboratório de » Cronofarmacologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo SP, Brazil.*

The melatonin is secreted by the pineal gland during the night with seasonal variation of the nocturnal peak. The hormone therefore conveys both daily and seasonal information, the latter being of most importance for the synchronisation of annual functions. This hormone is also considered as an important neuroimmunomodulator agent. In paw inflamed mice pinealectomy or adrenalectomy abolish the circadian rhythm of the paw thickness, and melatonin given during the night restores this profile in both situations. During inflammatory processes, corticosterone seems to have a significant effect on pineal metabolism since inflamed adrenalectomized mice lose the circadian profile of 6-sulphatoxymelatonin production. Moreover, in cultured rat pineal glands, corticosterone preincubation increases noradrenaline-induced melatonin production through a mechanism dependent on glucocorticoid receptors activation. In the present work we performed an in vivo experiment to evaluate the effect of inflammatory levels of corticosterone on melatonin production. Male wistar rats kept under a 12 h light/12 h dark cycle, were perfused via a transpineal microdialysis probe (3 µl/min) during four consecutive days according to the following protocol: day 1- vehicle (Ringer); days 2 and 3- corticosterone (6mg/ml) and day 4 - vehicle. The dialysates were sampled every hour. Local corticosterone perfusion

(Suite page 41)



(Suite de la page 40)

increased the night time pineal melatonin release by two folds ( $p < 0,05$ ;  $n=6$ ) and this effect was still present one day after the end of corticosterone perfusion ( $p < 0,05$ ;  $n=6$ ). This result shows that pineal gland is highly sensitive to increased levels of corticosterone and suggests the existence of a central role for melatonin during inflammatory processes. We hypothesize that there is a relationship between these two hormones which is important for an appropriate immunologic response during the anti-inflammatory phase of the process.

Financial support: CAPES/COFECUB, FAPESP, CNPq.

### **Une rythmicité circadienne marquée favorise la synchronisation à un cycle photopériodique chez la caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*).**

**Formanek L, Lumineau S, Houdelier C, Richard-Yris M.-A**

UMR 6552 Ethologie Evolution Ecologie, CNRS - Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Av. du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.

Une des fonctions fondamentales de la rythmicité endogène est de permettre la synchronisation de l'organisme à l'environnement dans lequel il vit. Un des paramètres endogènes bien connu qui favorise une telle synchronisation est la période. Nous nous proposons ici de tester l'influence d'un autre paramètre endogène, peu étudié jusqu'à présent, la netteté du rythme. Nous testerons en particulier comment la netteté du rythme circadien va influencer la capacité de synchronisation à un cycle photopériodique de caille japonaise, *Coturnix coturnix japonica*. Pour cela, nous avons enregistré l'activité alimentaire de 45 cailles issues de lignées sélectionnées pour présenter une activité endogène rythmée ou non rythmée. Les oiseaux sont placés en obscurité constante (DD) puis transférés en conditions photopériodiques (LD 12 :12), à chaque fois pendant 15 jours. L'activité alimentaire est enregistrée en continue à l'aide de capteurs infrarouges placés au dessus des mangeoires. Les données sont traitées par analyse spectrale pour chacune des deux phases expérimentales, de manière à détecter la présence d'un rythme, d'en déterminer la période ( $\tau$ ) et la netteté du rythme via le calcul de l'aire du pic de l'analyse spectrale ( $e$ ). En DD, 25 des 45 oiseaux ont présenté un rythme circadien d'alimentation ( $\tau=22.8 \pm 0.1$  h ;  $e=6.2 \pm 1.4$  %), alors que 20 oiseaux se sont avérés arythmiques ( $e=0\%$ ). Lors du passage de DD en LD, les oiseaux n'ont pas montré la même vitesse de synchronisation au cycle LD : les cailles rythmées en DD se sont synchronisées plus vite que les oiseaux précédemment non rythmés. De plus, le transfert en LD a provoqué une augmentation de l'aire du pic du spectre chez les oiseaux rythmés ( $14,4 \pm 1,7$  %) et non rythmés ( $10,9 \pm 1,5$  %) (ANOVA sur mesures répétées:  $p < 0.0001$ ). En LD, la clarté du rythme des oiseaux rythmés est significativement supérieure à celle des oiseaux arythmiques ( $p=0.005$ ). Enfin, nous avons trouvé une corrélation positive entre la clarté des rythmes en DD et en LD ( $y=10,96+0,55x$ ;  $r^2=0,18$ ,  $p=0,0038$ ;  $N=45$ ). Nos résultats montrent bien que des caractéristiques endogènes circadiennes marquées vont favoriser la synchronisation de l'individu à un cycle environnemental exogène.

**Carence en acide folique et stress oxydant**

**chez le rat**

**Fournier-Rouvet I.\*\*\*, Larcher R.\*\*\*, Fèvre-Montange M.\*\*, Zabot M.T.\*\*\*, Champier J.\*\*; Claustrat B.\***

\*\*\*Centre de Biotechnologie Cellulaire, Hopital Debrousse, Lyon.

\*\*INSERM U433, Faculté de Médecine RTH Laennec, Lyon.

\* Service de Radio-analyse, Hopital Neuro-Cardiologique, Lyon

La carence en folates est impliquée dans les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et tumorales. L'hyperhomocystéinémie induite par cette carence, génératrice de radicaux libres, est actuellement considérée comme facteur de risque de ces pathologies. Les folates interviennent également via le métabolisme des acides aminés soufrés dans le métabolisme du glutathion et de la mélatonine, deux anti-oxydants majeurs. Dans ce contexte, nous avons étudié chez le rat, l'influence d'une carence nutritionnelle en acide folique sur le métabolisme de l'homocystéine, du glutathion et de la mélatonine afin d'évaluer ses effets sur l'équilibre de la balance oxydants/antioxydants qui par ailleurs présente une organisation circadienne.

Une carence modérée en folates est induite chez 12 rats mâles Sprague-Dawley, par une alimentation synthétique à base de protéines, dépourvue en acide folique et contenant 10 g/kg de succinylsulfathiazole. Un groupe de 12 rats témoins reçoit le même régime contenant 8 mg/kg d'acide folique. Après 4 semaines de régime, la diminution significative des concentrations de folates érythrocytaires et l'augmentation significative de l'homocystéine plasmatique, hépatique et cérébelleuse témoignent de l'efficacité du régime dans le groupe carencé. La carence en folates entraîne de nombreuses modifications métaboliques caractérisées par une diminution significative des concentrations de la mélatonine épiphysaire et intestinale ainsi que du glutathion plasmatique, hépatique et cérébelleux.

Nos résultats suggèrent que la carence en folates affecte l'équilibre de la balance entre les systèmes de défense anti-oxydants (glutathion et mélatonine) et la production de radicaux libres (homocystéine), ce déséquilibre favorisant le stress oxydant. Le déficit en agents anti-oxydants pourrait entraîner un état permissif aux dommages oxydatifs de l'homocystéine. La réduction de la tolérance au stress oxydant pourrait constituer un des mécanismes impliquant la carence en folates dans le développement des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et tumorales.

### **Influence de la carence en acide folique sur l'expression des gènes horloges dans les tissus périphériques chez le rat**

**Fournier-Rouvet I.\*\*\*, Fèvre-Montange M.\*\*; Zabot M.T.\*\*\*, Champier J.\*\*; Claustrat B.\***

\*\*\*Centre de Biotechnologie Cellulaire, Hopital Debrousse, Lyon.

\*\*INSERM U433, Faculté de Médecine RTH Laennec, Lyon.

\* Service de Radio-analyse, Hopital Neuro-Cardiologique, Lyon

Les folates sous forme de méthényl-tétrahydrofolates sont les cofacteurs des protéines cryptochromes (CRY1 et CRY2). Ces protéines sont des molécules clés du mécanisme de l'horloge circadienne. Elles forment avec les protéines PER des hétérodimères capables d'inhiber l'ac-

(Suite page 42)

(Suite de la page 41)

tivation, contrôlée par le dimère CLOCK/BMAL-1, de la transcription des gènes *Per*, *Cry* et *Rev-erba*. De plus, elles jouent un rôle important dans la synchronisation de l'horloge et sont nécessaires à une expression normale des rythmes. Nous avons étudié par RT-PCR quantitative l'influence d'une carence nutritionnelle en acide folique sur l'expression de sept gènes de l'horloge circadienne dans le foie, la pinéale, la rétine et le cervelet de rats sacrifiés matin et soir.

Une carence modérée en folates est induite chez 12 rats mâles Sprague-Dawley, par une alimentation synthétique à base de protéines, dépourvue en acide folique et contenant 10 g/kg de succinylsulfathiazole. 12 rats témoins reçoivent le même régime contenant 8 mg/kg d'acide folique. Après 4 semaines de régime carencé, la diminution significative des concentrations de folates érythrocytaires et l'hyperhomocystéinémie confirment l'efficacité du régime.

La carence en folates modifie l'expression et/ou l'amplitude de variation soir/matin des gènes-horloges dans les tissus périphériques. Ces modifications sont tissu-spécifiques et plus marquées dans le foie, organe à capacité de régénération rapide, que dans les autres tissus. Dans l'ensemble des tissus, la carence modifie plus particulièrement l'expression des gènes *Per2*, *Bmal-1* et *Clock* avec une relation de phase remarquable : lorsque *Per2* est modifié, *Bmal-1* varie dans le même sens alors que *Clock* varie en sens opposé, rappelant la régulation positive de la transcription du gène *Bmal-1* par *Per2*.

Ces modifications pourraient engendrer des troubles de synchronisation des rythmes biologiques conduisant à une diminution des capacités d'adaptation et de défense de l'organisme aux variations récurrentes de son environnement. Elles pourraient expliquer les pathologies neurologiques caractérisées par des déphasages ou insomnies et couramment associées à une carence en folates. Elles pourraient également participer aux pathologies tumorales liées à cette carence.

Ces résultats montrent pour la première fois le rôle des folates dans la fonctionnalité des cryptochromes et par conséquent dans l'organisation rythmique des boucles transcriptionnelles de l'horloge et dans la régulation des rythmes circadiens.

### **Altérations du système circadien chez un modèle rongeur de la maladie de Parkinson**

**Gilbertas M, Dkhissi-Benyahya O, Gronfier C, Cooper H.M.**

*INSERM U371 Institut Cerveau et cellules souches, Département de Chronobiologie, Plateforme de Chronobiologie, IFR19, UCB-Lyon1, IFNL, 18 avenue Doyen Lépine 69500 Bron, France*

La maladie de Parkinson est caractérisée par un large spectre de symptômes, parmi lesquels des perturbations motrices, des déficits cognitifs ou encore des altérations des cycles veille-sommeil. Les perturbations du système circadien sont moins bien connues, mais peuvent affecter les rythmes de sécrétions hormonales, de pression sanguine ou encore le rythme cardiaque. Le développement de ces altérations est difficile à évaluer chez l'humain du fait du diagnostic tardif de la maladie, les symptômes moteurs n'intervenant qu'après une perte substantielle des populations de neurones dopaminergiques. A cela s'ajoute également l'effet confondant des traitements, et particulièrement des agonistes dopaminergiques. En vue

d'évaluer les altérations du système circadien, nous avons utilisé un modèle de la maladie de Parkinson chez le rat induit par la neurotoxine PS1, qui affecte le fonctionnement du système ubiquitine-protéasome. Les animaux ont été traités par 6 injections sous-cutanées de PS1 sur une période de deux semaines sous cycle LD. Comparés aux contrôles, les rat PS1 ont développé des altérations du système circadien dans les 5 à 7 semaines suivant le traitement, selon les groupes expérimentaux. Les animaux maintenus en cycle 12L/12D ont montré une avance de phase du rythme de température et une variabilité accrue du début d'activité. Les animaux transférés en obscurité constante ont montré une fragmentation de l'activité diurne/nocturne, une augmentation du nombre d'épisodes d'activité diurne, un raccourcissement et une variabilité de la période endogène, et un allongement de la durée de la nuit subjective. Le suivi par Vidéotracking de l'activité locomotrice en open field a montré que 5-6 semaines après la fin du traitement, les animaux ont développé des perturbations motrices parmi lesquelles bradykinésie et akinésie. Une étude par immunohistochimie des neurotransmetteurs dans les régions cérébrales connues pour être affectées par la maladie de Parkinson a montré une réduction du nombre de neurones et de fibres dopaminergiques dans la substance noire ainsi que des neurones noradrénergiques du locus coeruleus. Le système sérotoninergique du noyau du raphé et du SCN n'a pas semblé affecté. Les résultats suggèrent que durant la phase pré-symptomatique chez ce modèle rongeur, un nombre de paramètres du système circadien sont altérés et peuvent constituer des marqueurs précoces de la maladie.

### **Place des afférences glutamatergiques dans la plasticité structurale du noyau suprachiasmatique au cours du nyctémère**

**Girardet, C1, Blanchard, M-P2, Moreno, M1, Becquet, D1, François-Bellan, A-M1, Bosler, O1,2.**

*1. UMR-CNRS 6544 ;*

*2. Centre de Microscopie et Imagerie, IFR Jean-Roche, Marseille.*

La synchronisation photique de l'horloge circadienne s'accompagne de remaniements structuraux du réseau neuro-glial du noyau suprachiasmatique au cours du nyctémère, notamment dans sa partie ventrolatérale où se projettent majoritairement les afférences rétinienne. De fait, nous avons montré chez le rat que la phase nocturne du cycle se caractérise par une augmentation notable de la couverture astrocytaire des neurones à VIP, que l'on sait être spécialisés dans l'intégration des messages de synchronisation photique, au moins au niveau de leurs dendrites (+26%), associée à une diminution de leur couverture synaptique aux niveaux dendritique (-43%) et somatique (-44%). En vue de déterminer si les afférences rétinienne, dont on connaît la nature glutamatergique, sont concernées par ces remaniements, nous avons analysé comparativement, sur coupes optiques de microscopie confocale, la densité d'innervation glutamatergique des neurones à VIP aux temps ZT02 (2h après l'éclaircissement, n=3) et ZT18 (6h après l'extinction, n=3). L'étude a porté, à chaque point du nyctémère et pour chaque rat, sur 25-35 corps cellulaires VIP-immunoréactifs analysés chacun sur 5 plans confocaux adjacents passant par le

(Suite page 43)

(Suite de la page 42)

noyau. Les terminaisons glutamatergiques ont été identifiées sur la base de leur immunoréactivité contre les protéines de transport vésiculaire du glutamate de types 1 (vGlut1) et 2 (vGlut2). Parmi les terminaisons vGlut1/vGlut2-positives au contact de neurones à VIP, celles ayant pour cible synaptique avérée le neurone à VIP adjacent ont été sélectionnées après un triple marquage incluant la localisation d'une protéine de la zone active des boutons glutamatergiques, la protéine Bassoon. Les données ont montré, au cours de la phase nocturne du cycle, une diminution significative de 36% du nombre moyen de terminaisons glutamatergiques en contact synaptique avec un neurone à VIP. Le redéploiement nocturne de la couverture astrocytaire des neurones à VIP est donc concomitant d'une réduction de la densité des synapses glutamatergiques, et donc vraisemblablement de celles à compétence photique, sur ces neurones. Ces remaniements synaptiques pourraient participer aux mécanismes de la photosensibilité du NSC. Les projets en cours visent à identifier les autres acteurs d'une telle plasticité et à en préciser les mécanismes.

### **Photoréception circadienne chez l'Homme**

**Gronfier C1, Chiquet C1,2, Claustrat B3, Brun J3, Denis P4, Cooper HM1**

1 INSERM U371 Institut Cerveau et cellules souches, Département de Chronobiologie, Plateforme de Chronobiologie, IFR19, UCB-Lyon1, IFNL, 18 avenue Doyen Lépine 69500 Bron, France;

2 Service d'Ophthalmologie, CHU, Grenoble, France;

3 Dpt of Radioanalysis, Hôpital Neurologique, Lyon, France;

4 Service d'Ophthalmologie, HCL, Lyon, France

L'entraînement du système circadien aux 24h est réalisé par l'ajustement quotidien de sa phase par la lumière (phase resetting). Il est maintenant bien établi que l'effet de la lumière dépend de son intensité, de sa durée, de son timing et de sa composition spectrale. Les études chez l'animal ont montré que les photorécepteurs classiques (bâtonnets et cônes) et non classiques (les cellules ganglionnaires à mélanopsine) sont impliquées dans la photoréception circadienne, toutefois leur contribution relative dans la transmission du message lumineux est inconnue. Afin de clarifier la sensibilité photique du système circadien chez l'Homme, nous avons étudié les effets de lumières monochromatiques sur les concentrations plasmatiques de mélatonine. Le degré de suppression de la sécrétion de l'hormone a été mesuré pour chaque sujet, en réponse à des lumières monochromatiques de densités de photons équivalentes ( $3.16 \times 10^{12}$  photons/cm<sup>2</sup>/sec) pour 9 longueurs d'ondes différentes distribuées sur l'ensemble du spectre visible (420–620 nm). Des échantillons sanguins ont été collectés toutes les 15 à 60 minutes, avant, pendant et après une exposition lumineuse nocturne de 60 minutes chez des sujets dont les pupilles avaient été préalablement dilatées. Nos résultats confirment une sensibilité maximale de la suppression de mélatonine pour des longueurs d'ondes comprises entre 460 et 500 nm, alors que longueurs d'ondes en dessous de 460 nm et au dessus de 500 nm sont nettement moins efficaces. Après la fin de l'exposition lumineuse, la reprise de la sécrétion de mélatonine semble dépendre principalement du degré de suppression plutôt que de la longueur d'onde utilisée. Les effets de combinaisons de lumières monochromatiques sont en cours d'étude, elles devraient apporter une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la photoréception circadienne chez

l'Homme. Ces résultats sont d'un grand intérêt clinique, puisqu'ils pourraient conduire au développement de stratégie d'expositions photiques dans le cadre de trouble chronobiologiques (syndromes d'avance et de retard de phase, travail posté, décalage horaire, ...) et dans le traitement de syndromes dépressifs (en particulier saisonniers).

Financements: FP5-OldClock, INSERM ACT, ACI MRT, FP6-EUCLOCK, GIS-Longévit.

### **Effet d'un éclairage permanent sur le reprise de l'activité sexuelle chez la jument.**

**Guillaume D1, Regnier F1, Arnaud G2, Larry JL2, Chesneau D1, Malpaux B1.**

1. UMR 6175 INRA/CNRS/Université F. Rabelais de Tours/Haras Nationaux, 37380 Nouzilly,

2. Station Expérimentale des Haras Domaine de la Valade 19370

Chez la jument, espèce de jours longs, la date de 1ère ovulation après l'inactivité ovarienne hivernale est avancée d'environ 2 mois, par rapport à celle observée chez des juments témoins maintenues sous photopériode naturelle ou sous jours courts, par l'application quotidienne de 14h30 de lumière. L'objectif de ces expériences est de déterminer l'effet d'un éclairage permanent sur la date de 1ère ovulation et sur la sécrétion de mélatonine, sur 2 types de juments et dans 2 fermes expérimentales différentes.

Les ovulations ont été déterminées par un dosage bihebdomadaire de la progestérone. Avant le début des traitements, les juments n'ont pas présenté d'ovulation pendant au moins un mois. La 1ère expérience (Exp1) a été réalisée sur 15 ponettes Welsh et la 2ème (Exp2) sur 22 juments de selle. Les juments ont été réparties en 3 lots. Le témoin positif a été placé sous 14h30 de lumière (100 lux dans l'Exp1, 40 lux dans l'Exp2), le témoin négatif



sous photopériode naturelle (dans l'Exp1, éclairage additionnel pendant la phase diurne de 7h30 à 17h) et le groupe traité sous éclairage permanent (500 lux dans

(Suite page 44)

(Suite de la page 43)

l'Exp1, 100 lux dans l'Exp2). Une jument n'étant pas en anœstrus profond dans l'Exp1, a été écartée de l'expérience.

La date moyenne de la première ovulation est significativement avancée dans le groupe témoin positif (Exp1 : 23 Fév ± 8 j. Exp2 : 23 Fév ± 6 j.) par rapport au témoin négatif (Exp1 : 9 Avril ± 25 j. Exp2 : 7 Avril ± 4 j.). Dans les 2 expériences. le groupe éclairé en permanence présente une date moyenne de 1ère ovulation (Exp1 : 16 Mars ± 2 j. Exp2 : 14 Mars ± 6 j.) significativement différente de celle du témoin négatif. Par contre, elle ne diffère significativement de celle du témoin positif que dans l'Exp2. L'augmentation nocturne de la concentration plasmatique de mélatonine est supprimée dans le groupe traité, lors des 2 expériences.

L'éclairage permanent avance la première ovulation par rapport à celle observée chez des juments maintenues sous photopériode naturelle. Les mécanismes sous-jacents à ce phénomène sont totalement inconnus.

### **Role of TSH in intrapituitary communication.**

**Hanon E1,2,3, Barrett P, Masson-Pévet M3, Morgan P2, Hazlerigg D1.**

1. School of Biological Sciences, University of Aberdeen, Tillydrone avenue, Aberdeen AB24 2TZ, Scotland, UK;

2. The Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen AB21 9SB, Scotland, UK;

3. UMR CNRS / ULP 7168/LC2, Dpt de Neurobiologie des Rythmes, 5 rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg, France

Photoperiod exerts in many species a powerful influence over physiological status and one parameter strongly influenced is plasma prolactin. In fact, photoperiod acts on prolactin secretion through changes in the 24-h melatonin profile acting on target sites in the neuroendocrine system. The pars tuberalis (PT) of the pituitary is strongly implicated in the photoperiodic regulation of plasma prolactin levels.

In the PT, the melatonin receptors Mt1 are present in cells expressing the thyroid stimulating hormone (TSH), and TSH immunoreactivity presents strong photoperiodic variations. TSH is implicated in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. Beside the PT, TSH immunoreactivity is present in the thyrotrophs of the pars distalis (PD). This hormone stimulates the production of the inactive thyroid hormones T4 which will be converted in the active T3 by iodothyronine deiodinases. Whether a relation exists between TSH produced in the PT and prolactin released by the thyrotrophs of the PD remains an open question. Anyway, the PT factor implicated remains unknown.

The aim of my study is to investigate whether TSH could be this factor. Therefore, I looked at the localization of TSH receptor (TSH-R). This study was performed in the sheep pituitary using in situ hybridization in animals kept in different photoperiods (8:16, 12:12, 16:8, 20:4, 22:2). We observed that TSH-R were strongly expressed in PT and in the tanycytes lining the third ventricle. No labelling was found in the PD. While TSH-R mRNA level remained constant in the tanycytes, it presented both daily and seasonal variations in the PT with high levels in very long photoperiods compared to short photoperiod and during the night with a decrease in day time. An opposite daily variation has been observed in the Mt1 mRNA expression. TSH-R is a G protein-coupled receptor increasing the cAMP level by stimulating adenylate cyclase. As TSH-R seem to be expressed in the same cells as the Mt1-R which are negatively coupled to adenylate cyclase, we are now investigating the effect of a TSH stimulation on

PT cell culture and whether melatonin affect this response. This study is performed by analysing the cAMP level and the protein expressions.

### **Dawn and dusk in entrainment of the circadian timing system.**

**Roelof A. Hut**

Department of Chronobiology, Center for Life Sciences, University of Groningen, Haren, the Netherlands.

Life on earth must cope with large environmental changes induced by the two modes of earth rotation. Rotation around the earth axis induces daily changes in light and temperature with a 24-h period, while rotation around the sun causes yearly changes in daylength (photoperiod) due to the tilted earth axis. Light entrainment of clock mechanisms enable animals to adaptively anticipate such daily and annual fluctuations in behaviour and physiology. Natural light intensity variation over the course of the day include spectral changes, twilight, and day length variation. Here we will explore response patterns in behaviour and physiology to changing light intensity and propose a model by which the circadian clock work signals day length information to the annual timing mechanism.

### **Amélioration du contrôle tumoral par l'induction pharmacologique de l'horloge circadienne par le seliciclib, un inhibiteur de kinase cyclin-dépendante.**

**Iurisci I1,2, Filipski E1, Reinhardt J3, Bach S3, Gianella-Borradori A4, Iacobelli S2, Meijer L3, Lévi F1**

1. INSERM U 776 « Rythmes biologiques et cancers », Hôp. P. Brousse, Villejuif, France ;

2. Università G. D'Annunzio, Chieti, Italy;

3. C.N.R.S, Cell Cycle Group, UPS-2682 & UMR-2775, Station Biologique, B.P. 74, 29682 Roscoff Cedex, France;

4. Cyclacel Ltd, Dundee, United Kingdom

Il existe un lien étroit entre le système circadien et le cycle de division cellulaire, dont la dérégulation caractérise les cellules cancéreuses. Nous avons étudié l'effet du seliciclib, un inhibiteur de kinase cycline-dépendante (CDK) sur les interactions entre l'horloge circadienne et le cycle de division cellulaire dans un modèle tumoral de souris. 132 souris porteuses d'ostéosarcome de Glasgow (OSG) ont reçu le seliciclib (300 mg/kg/j ; p.o.) ou solution témoin pendant 5 jours à ZT3, 11 ou 19. Les souris ont été sacrifiées après 24h ou davantage en DD, à 6 différents stades circadiens espacés de 4h. Profils d'expression des ARNm de gènes de l'horloge et de gènes contrôlés par l'horloge dans la tumeur ont été déterminés par RT-PCR quantitative. Les interactions du seliciclib avec les cibles enzymatiques ont été étudiées par la chromatographie d'affinité sur seliciclib immobilisé. Le seliciclib a ralenti la croissance tumorale de 55% après administration à ZT3 ou ZT11 et de 35% à ZT19 par rapport au témoins (p<0.001). Il n'a pas été observé de rythme significatif de transcription pour Rev-erba, Per2 et Bmal1 dans les tumeurs de souris non traitées. Le traitement par seliciclib a induit l'expression circadienne de ces trois gènes, avec un rapport de phase normal seulement après administration à ZT3. Les ARNm de c-Myc et Wee1 montraient un rythme circadien chez les témoins (p=0.003 et 0.001). Le seliciclib a supprimé ces rythmes et augmenté l'expression de Wee1 indiquant un contrôle accru de la transition G2/M. Les profils d'activité des caséine kinases CK1δ et CK1ε ont aussi été modifiés en fonction du mo-

(Suite page 45)

(Suite de la page 44)

ments d'administration, ce qui pourrait contribuer à l'induction de l'horloge circadienne dans la tumeur. Conclusions: l'induction de l'horloge circadienne dans la tumeur est associée à une meilleure activité antitumorale du seliciclib. L'horloge circadienne et ses régulateurs moléculaires représentent les cibles potentiellement importantes pour le traitement des cancers.

Ce projet a été financé par l'ARTBC et l'ARC (subvention N°3342), Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France et par l'Union Européenne (Réseau d'Excellence BioSim, Contrat No. LSHB-CT-2004-005137).

### **Cytokines sériques associées au cancer: effet sur les rythmes circadiens et sur la qualité de vie des patients**

**Innominato PF 1,2, T. Rich 3, B. Claustrat 4, J. Waterhouse 5 and F. Lévi 1,2,6**

- 1- INSERM U776 "Rythmes biologiques et cancers"
- 2- Unité de Chronothérapie, FSMSIT, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France;
- 3- Department of Radiation Oncology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA;
- 4- Centre de Médecine Nucléaire, Service de Radioanalyse, Hôpital Neuro-Cardiologique, Lyon, France;
- 5- Research Institute for Sport and Exercise Science, Liverpool John Moores University, Liverpool, UK;
- 6- Université Paris-Sud XI, France

**Objectifs :** Les tumeurs peuvent affecter le système temporel circadien et modifier ses rythmes marqueurs, mais le mécanisme pathogénétique demeure inconnu. Les altérations du rythme circadien d'activité et de repos (CircAct) sont corrélées avec une diminution de plusieurs indices de Qualité de Vie (QdV). Des modèles expérimentaux ont montré que le TGF- $\alpha$  peut altérer la physiologie circadienne chez le Hamster et la Souris, mais aucune donnée n'existe sur le rôle du TGF- $\alpha$  chez l'Homme. Nous avons étudié l'effet des facteurs de croissance et des cytokines associés aux tumeurs sur le rythme circadien d'activité et repos (CircAct) et du cortisol, ainsi que leur impact sur la QdV des patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRM)..

**Patients et méthodes :** Une première étude a visé à confirmer les corrélations entre CircAct et QdV. 98 patients atteints de CCRM ont complété le questionnaire QLQ-C30 de l'EORTC, et leur rythme circadien d'activité et repos été évalué en continu pendant trois jours par actométrie avant chimiothérapie. Une deuxième étude a précisé le rôle du TGF- $\alpha$ , du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 sur CircAct et QdV. 80 patients atteints de CCRM ont suivi le même protocole et ont eu une prise de sang à 08h et à 16h pour mesurer dans le sérum le cortisol et les trois cytokines (par ELISA). Trois paramètres robustes et validés ont été utilisés pour estimer CircAct: r24, I<O et activité moyenne (Mormont MC et al, Clin Cancer Res, 2000).

**Résultats :** Les paramètres de CircAct ont été corrélés positivement avec la QdV globale, et avec les échelles de fonctionnement physique et social, et négativement avec la fatigue et la perte d'appétit ( $|r|>0.30$ ;  $p<0.001$ ), répliquant ainsi les résultats rapportés précédemment (Clin Cancer Res, 2000). Le niveau médian de TGF- $\alpha$  était 4.6 fois supérieur chez les patients dont CircAct était altéré ( $r24<0.35$ ) en comparaison de ceux avec CircAct "normal" ( $r24>0.47$ ,  $p=0.002$ ). Il en était de même pour le TNF- $\alpha$  ( $\times 1.7$ ,  $p=0.03$ ) et pour l'IL-6 ( $\times 1.5$ ,  $p=0.006$ ). En cas de fatigue, le TGF- $\alpha$  était en moyenne 5.3 fois supé-

rieur ( $p=0.006$ ), et les paramètres de CircAct détériorés ( $r24$  médian: 0.22 versus 0.54,  $p=0.003$ ). Les patients anorexiques avaient un niveau plus élevé d'IL6 ( $\times 1.6$ ,  $p=0.01$ ), de TGF- $\alpha$  ( $\times 4.4$ ,  $p=0.01$ ) et de cortisol moyen ( $\times 1.3$ ,  $p=0.01$ ).

**Conclusions :** Le cancer produit et/ou induit des cytokines et de facteurs de croissance qui agissent à plusieurs niveaux du système nerveux central. Ces facteurs perturbent la physiologie circadienne de l'hôte. Ils sont associés à des ensembles de symptômes systémiques, ainsi qu'à une détérioration de la QdV. L'enregistrement de CircAct fournit une estimation quantitative de plusieurs domaines de la QdV. Une étude de preuve de concept est en cours, où l'utilisation d'inhibiteurs du récepteur à l'EGF (e au TGF- $\alpha$ ) vise à normaliser la physiologie du système temporel circadien pour améliorer la QdV des patients atteints de cancer.

### **Mécanismes de la photoréception chez les rongeurs**

**Lakhdar-Ghazal N.**

Unité de Neurosciences, Groupe de Recherche sur les Rythmes Biologiques, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, BP. 1014, Avenue Ibn Battouta, 10000 Rabat - Maroc

La gerboise, rongeur désertique hibernant présente un rythme de reproduction marqué auquel est lié le rythme d'hibernation. Cette espèce se reproduit au printemps – été, et entre en quiescence sexuelle dès la mi été. Le rythme semble être sous le contrôle d'une horloge circannuelle dont la période est synchronisée par la photopériode. Le principal phototransducteur hormonal est la variation annuelle de la durée de synthèse de mélatonine, le rythme s'exprimant toute l'année. Dans la glande pinéale de la gerboise, les rythmes de mélatonine et du 5-ML sont désynchronisés une partie de l'année, d'octobre à mai. Le rythme de 5-ML débute en mai et atteint un maximum en début d'automne (septembre) et disparaît le reste de l'année. Paradoxalement, la lumière administrée la nuit en mai fait chuter la mélatonine sans induire la synthèse du 5-ML. Inversement en septembre, le traitement lumineux en phase nocturne induit la synthèse du 5-ML tout en inhibant celle de la mélatonine. Une corrélation inverse existe entre le pic du 5-ML, la longueur du jour et l'activité sexuelle. Le rôle physiologique du 5-ML dans le contrôle saisonnier de la reproduction a été abordé à 3 saisons. Le 5-ML injecté journalièrement en sous cutané en photopériode longue en mai induit la régression testiculaire chez le male dès la 4ème semaine de traitement. En été (début août) la réponse moyenne peut être biphasique (2000) ou monophasique (2002-2003). Administré en hiver (novembre) le 5-ML n'a aucun effet et ne bloque pas la recrudescence spontanée des gonades que ce soit en photopériode courte ou longue, les réponses individuelles étant homogènes. L'étude de la cinétique de dégradation du 5-ML après injection sous cutanée montre qu'il est recapté par la glande pinéale suggérant que son effet pourrait transiter par la glande. Le 5-ML administré après pinéalectomie et ganglionectomie continue à exercer son effet physiologique sur l'activité sexuelle, les pinéalectomisés exprimant un effet biphasique alors que les ganglionectomisés expriment un effet monophasique. Ces résultats montrent que la glande pinéale n'est pas nécessaire à l'expression de l'effet du 5-ML et que cet effet ne nécessite pas la présence du rythme de mélatonine. Le 5-ML exerce ainsi un effet propre sur le système neuroendocrine, puisque que cette

(Suite page 46)

(Suite de la page 45)

hormone pinéale module le nombre de cellules à GnRH particulièrement dans l'aire préoptique antérieure et médiane mais également dans l'hypothalamus médio-basal. Chez la gerboise le 5-ML induit l'expression du fos spécifiquement dans les structures où il module l'activité des neurones GnRH mais également dans d'autres structures hypothalamiques. Le 5-ML n'induit pas l'expression du fos dans le noyau suprachiasmatique, son rôle sur l'expression saisonnière de la reproduction n'impliquerait pas ce noyau.

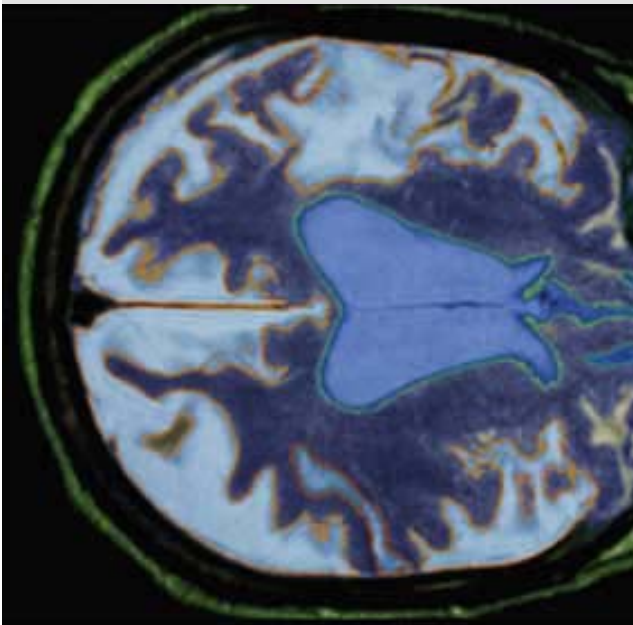
### **La mélatonine du liquide cérébro-spinal : une source d'information pour le cerveau ?**

**Legros C.1, Bernard S.2, Chesneau D.1, Malpoux B.1**

1. PRC, INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, IFR135, 37380 Nouzilly, France

2. PII, INRA Centre de Tours, 37380 Nouzilly, France

La mélatonine est présente dans le sang et le liquide cérébro-spinal (LCS). Chez les ovins, ses concentrations dans le LCS sont environ 20 fois supérieures à celles du sang. La mélatonine possède des cibles centrales identifiées, comme l'hypothalamus pré-mamillaire pour le contrôle de la reproduction chez les ovins. Pour atteindre ces régions cérébrales, la mélatonine dispose de deux



voies d'accès possibles : le LCS et le sang. La voie sanguine a été très longtemps la seule étudiée et prise en compte pour déterminer les niveaux physiologiques de mélatonine. Le LCS pourrait être une voie privilégiée pour la communication non-synaptique intra-cérébrale, et ainsi transporter la mélatonine vers ses cibles cérébrales. Afin d'analyser le rôle du LCS dans le transport de la mélatonine dans le cerveau, nous avons dans un premier temps mesuré les taux de mélatonine dans le tissu cérébral ovin et dans un deuxième temps suivi en temps réel le passage de la 2-123I-mélatonine dans le cerveau depuis le LCS, par scintigraphie. Nous avons mis en évidence des gradients de concentration de MLT, de jour comme de nuit, avec les concentrations les plus élevées à proximité des ventricules et les plus faibles à distance de ces mêmes ventricules (la nuit, de  $0,714 \pm 0,431$  pg/mg tissu en

bordure du troisième ventricule à  $0,096 \pm 0,061$  pg/mg tissu à 8mm). De plus l'apport de MLT aux concentrations du LCS via le sang, 2200 pg/ml, induit des concentrations homogènes de MLT dans l'ensemble du cerveau ( $1,261 \pm 0,288$  pg/mg tissu), indiquant que le gradient observé résulte de l'apport par le LCS. La scintigraphie a mis en évidence un passage rapide de la MLT du CSF vers le cerveau (<5min). Ces résultats suggèrent que le LCS contribue fortement à la présence de MLT dans le tissu cérébral en y produisant des gradients de concentrations. La MLT a la capacité de pénétrer rapidement dans le cerveau depuis le LCS pour y induire des taux supérieurs à ceux que la MLT du sang pourrait produire.

### **Rythme de sécrétion de la mélatonine dans les tumeurs de la région pinéale**

**Leston J1, Jouvet A2, Brun J3, Champier J5, Mottolèse C1, Lapras C1, Sindou M1, Chazot G4, Claustrat B\*3, Fèvre-Montange M\*5.**

1. Service de Neurochirurgie,

2. Service de Neuropathologie

3. Laboratoire de Radioanalyse, Hôpital Neurocardiologique,

4. Service de Neurologie,

5. Inserm U433, Fac Med Laennec, Lyon, France. (\*co-derniers auteurs)

Le rythme nyctéméral de sécrétion de la mélatonine des patients porteurs de tumeur de la région pinéale (TRP) ainsi que la relation entre cette sécrétion et le type histologique de la tumeur ne sont abordés dans la littérature que dans des séries limitées. Les processus expansifs dans cette région correspondent à diverses entités, notamment des kystes, des tumeurs du parenchyme pinéal (TPP) : pinéaloctomes (PC), pinéoblastomes et TPP de différenciation intermédiaire (TPPint), des tumeurs gliales dont les tumeurs papillaires de la région pinéale (TPRP) et des tumeurs germinales. Nous avons étudié la sécrétion rythmique de mélatonine plasmatique chez 33 patients porteurs de TRP (2 kystes, 4 PC, 1 TPPint, 9 tumeurs gliales dont 3 TPRP, 12 tumeurs germinales, 1 gangliogliome, 1 mélanome, 3 méningiomes) et 5 patients porteurs d'autres tumeurs encéphaliques avant et/ou après exérèse chirurgicale.

Un rythme de mélatonine est observé en préopératoire chez les sujets avec une tumeur hors de la région pinéale, chez les 2 patients avec un kyste et chez 3 patients avec un PC. Le patient avec une TPPint, moins différenciée que les PC, ne présente pas de rythme. Un rythme est présent chez les patients avec une tumeur gliale autre qu'une TPRP. Un rythme de grande amplitude est observé en préopératoire chez un patient avec une TPRP, tumeur provenant de l'organe sous-commissural. L'abolition du rythme après chirurgie pour 2 TPRP provient de l'exérèse complète de la glande pinéale. Le rythme en préopératoire est absent dans les tumeurs germinales et présent chez les patients avec un gangliogliome, un mélanome et chez 2 patients avec un méningiome.

Nous montrons que la sécrétion de mélatonine est perturbée dans plusieurs TRP même quand elles ne sont pas originaires des pinéaloctes. Les TPP différenciées présentent un rythme de mélatonine conservé suggérant que les pinéaloctes tumoraux ou résiduels au sein de la tumeur peuvent synthétiser la mélatonine et la libérer de façon rythmique. La détermination du rythme de mélatonine en préopératoire ne constitue pas un critère diagnostique. Enfin, le bénéfice d'un traitement par la mélatonine

(Suite page 47)

(Suite de la page 46)

pourrait être évalué chez les patients qui ne présentent plus de rythme après chirurgie.

### **Chronothérapeutique des cancers : optimisation du schéma d'administration différente selon le sexe.**

**Lévi F, S Giacchetti, G Bjarnason, C Garufi,, C. Focan D. Genet, S. Iacobelli, M. Tampellini, R. Smaaland, C. Focan, B. Coudert, Y. Humblet, J. L. Canon, A. Adenis, G. Lo Re, C. Carvalho, J. Schueller, N. Anciaux, M.A. Lentz, B. Baron, T. Gorlia.**

*INSERM U776 « Rythmes biologiques et cancers », hôpital Paul Brousse, 94800 - Villejuif (France) et Chronotherapy Group (CTG), European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Bruxelles (Belgique).*

Introduction : L'association de 5-fluorouracile (5-FU), d'acide folinique (AF) et d'oxaliplatine (I-OHP) a démontré une activité antitumorale qui a profondément modifié le devenir des patients souffrant de métastases de cancer colorectal, seconde cause de mortalité par cancer. La tolérance et l'efficacité élevée d'une perfusion chronomodulée quotidienne de ces 3 médicaments pendant 4 jours (j) suivie d'un intervalle libre de 10 j (ChronoFLO4) ont conditionné le développement ultérieur de l'oxaliplatine, aujourd'hui enregistré dans cette indication avec un autre schéma d'administration de ces 3 médicaments sur 2 j suivi d'un intervalle libre de 12 j (FOLFOX : I-OHP et AF perfusés sur 2 h au j1, 5-FU en perfusion constante de 44 h aux j1-2, AF en perfusion de 2 h au j2). Le CTG de l'EORTC a conduit le 1er essai international randomisé comparant ces deux schémas.

Méthodes : L'objectif principal était la démonstration d'une amélioration de survie de 20% par ChronoFLO4. 564 patients atteints de cancer colorectal métastatiques ( 226 femmes et 338 hommes) ont été enregistrés dans 36 centres de 10 pays. Ils ont reçu l'un ou l'autre schéma thérapeutique chaque 2 semaines. Les doses initiales étaient les mêmes pour les 2 schémas (5-FU, 1700 mg/m<sup>2</sup> ; AF, 1200 mg/m<sup>2</sup> ; I-OHP, 100 mg/m<sup>2</sup>). En cas de tolérance satisfaisante, la dose de 5-FU était augmentée de 200 mg/m<sup>2</sup>/cycle aux 2ème et 3ème cycles.

Résultats : Cet essai a révélé un profil différent de tolérance selon le schéma thérapeutique, mais pas de différence de survie. L'analyse des facteurs prédictifs de survie fait apparaître une différence majeure du schéma le plus actif entre femmes et hommes. La survie médiane (mois) des femmes est de 19.1 sous FOLFOX2 [I.C. à 95% : 17.6 ; 24.1] et de 16.3 sous ChronoFLO4 [14.1 ; 19.6] (p = 0.027). Au contraire, la survie médiane des hommes est de 18.3 [16.8 ; 20.5] sous FOLFOX2 et de 21.4 [19.3 ; 24.6] sous ChronoFLO4 (p= 0.018). En comparaison du FOLFOX2, le schéma ChronoFLO4 augmente le risque relatif de décès de 38% chez les femmes et diminue ce risque de 25% chez les hommes. La liaison au sexe de la modalité d'administration la plus active est très significative, y compris dans l'analyse multivariée (p = 0.0012), indiquant que l'effet observé ne dépend pas de biais de sélection non contrôlés. Quel que soit le schéma thérapeutique, l'incidence de toxicité sévère (grade 3-4) est globalement élevée, mais l'est bien davantage chez les femmes que chez les hommes (72.6% vs 55.9%, p<0.001)

Discussion : Il s'agit d'un essai pragmatique comparant les 2 modalités les plus actives et les mieux tolérées de

cette triple association de chimiothérapie. Ces 2 schémas thérapeutiques sont dynamiques : fondé sur le rythme circadien pour l'un, semi séquentiel pour l'autre. Leur durée est différente (4 j vs 2 j). L'ensemble de ces facteurs est à considérer. L'emplacement de l'heure de moindre toxicité des anticancéreux (théprubicine, norcantharidine) et le rythme d'efficacité antitumorale (doxorubicine-cisplatine) peuvent varier selon le sexe des animaux (rat ou souris). L'activité de la déshydroxypyrimidine déshydrogénase (enzyme qui catabolise le 5-FU) et la clairance du 5-FU sont significativement moindres chez les femmes en comparaison des hommes. Le rythme de la clairance du 5-FU en perfusion constante est moindre chez les femmes que chez les hommes (Bressole et coll, Cancer Chemo Pharm 1999, 44 : 295-302).

Conclusions : Les doses recommandées et le meilleur schéma de perfusion de chimiothérapie peuvent différer chez les patients cancéreux, selon qu'ils sont hommes ou femmes. Chez celles-ci, le schéma chronothérapeutique doit être optimisé. Un projet de recherche translationnelle en cours explore les hypothèses biologiques qui pourraient rendre compte des différences de schéma optimal liées au sexe.

Travail soutenu par : Educational Grant EORTC (SANOFI-Synthé-labo) et ARTBC, Villejuif.

### **Physiologie circadienne des souris porteuses d'une mutation d'un gène de l'horloge. Relations avec la croissance tumorale**

**Li XM1, Claustrat B2, Hastings MH3, Albrecht U4, Lévi F1.**

1. INSERM U776 "Rythmes biologiques et cancers" et Université Paris Sud, Villejuif, France;
2. Centre de médecine nucléaire, Hôpital Neurocardiologique, Lyon;
3. University of Cambridge, Cambridge, UK;
4. University of Fribourg, Fribourg, Switzerland.

Nous étudions la relation entre la physiologie circadienne (activité-repos, température corporelle à l'aide d'un capteur télémétrique transplanté et la corticostérone) et la croissance tumorale greffée chez les souris avec une mutation du gène horloge (*Clock*, *Per1* et *Per2*) ou du gène contrôlé par l'horloge (*Vpac*). Des souris *Clock*.19<sup>-/-</sup>, *Vpac*<sup>-/-</sup>, *Per1/2*<sup>-/-</sup> ou sauvages sont synchronisées par LD 12 :12 pendant deux semaines, puis restent en LD 12 :12 ou sont exposées en DD selon randomisation a priori. Deux semaines après la mise en DD, un fragment d'ostéosarcome de Glasgow est inoculé par voie sous-cutanée. Les séries temporelles sont analysées par analyse spectrale. Le sang est prélevé pour dosage de corticostérone lorsque la tumeur atteint 10% du poids corporel. En LD 12 :12, les rythmes circadiens de température et d'activité sont stables chez toutes les souris, avec les acrophases situées entre 14:20 et 21:45 Heures Après le Début de la Lumière (HADL). La mise en DD allonge immédiatement et durant toute l'expérience la période circadienne de ces deux rythmes à 28.5 h chez les *Clock*.19<sup>-/-</sup>. De plus, les amplitudes sont augmentées de 46% (température, p < 0.001) et de 17% (activité, p = 0.08) par rapport à LD 12 :12. Le rythme de la corticostéronémie est supprimé chez les *Clock*.19<sup>-/-</sup> en LD 12:12 ou en DD, alors qu'il persiste chez les sauvages. L'amélioration de la coordination circadienne et/ou l'allongement de la période circadienne observée chez les *Clock*.19<sup>-/-</sup> en DD est associée à un ralentissement modéré de la croissance

(Suite page 48)

(Suite de la page 47)

tumorale. Bien que l'exposition en DD supprime les rythmes d'activité et de température chez les *Vpac*<sup>-/-</sup> et les *Per1/2*<sup>-/-</sup>, alors qu'ils persistent chez les sauvages. Cependant, aucune modification de la croissance tumorale n'est observée chez les *Vpac*<sup>-/-</sup> en comparaison des souris sauvages et la tumeur est rejetée par le fonds génétique de *Per1/2*<sup>-/-</sup>. En conclusion, Des altérations majeures de la physiologie circadienne peuvent résulter d'interactions entre environnement photopériodique et mutation d'un gène horloge ou d'un gène contrôlé par l'horloge. Dans ces conditions, nous montrons que l'altération du phénotype circadien ne constitue pas le seul déterminant de la croissance d'une tumeur greffée.

### **Inner retinal photoreceptors in non image forming light responses**

Lucas R

Faculty of Life Sciences, Michael Smith Building, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

Light is the most reliable environmental representative of time of day and acts as an influential regulator of animal behaviour and physiology. The realization that this influence extends beyond entrainment of circadian clocks to encompass direct effects on multiple physiological systems has given rise to the concept of a 'non image forming' visual system, which exists in parallel to the classical visual pathways responsible for image formation. A full understanding of the photoreceptive origins of non image forming light responses must include not only conventional rod/cone photoreceptors, but also more recently discovered intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (ipRGCs). I will present some recent work addressing the role of melanopsin in the activity of ipRGCs. I will then continue to experiments aimed at exploring the interaction between rod, cone and ipRGC photoreceptors in defining the photosensitivity of mice.

### **Lien entre rythmicité circadienne et réactivité émotionnelle chez la caille japonaise (*Coturnix japonica*).**

Lumineau S, Houdelier C, Richard-Yris M.-A.

UMR 6552 Ethologie Evolution Ecologie, CNRS - Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Av. du Général Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.

La relation entre la rythmicité comportementale et d'autres caractéristiques comportementales individuelles est encore très peu étudiée. Dans ce présent travail, nous nous sommes proposé de mettre en lien rythmicité et émotivité chez un oiseau nidifuge, la caille japonaise, *Coturnix coturnix japonica*. Pour cela, nous avons utilisé des oiseaux sélectionnés qui présentent une faible (E-) ou une forte (E+) réactivité émotionnelle. Cette sélection est réalisée sur la base de l'immobilité tonique, critère que nous avons vérifié chez nos oiseaux à l'âge de 13 jours. L'activité alimentaire de 37 cailles E+ et 43 cailles E- a été enregistrée par des capteurs infrarouges placés devant les mangeoires. Cette mesure a été réalisée pendant deux semaines en obscurité continue entre les âges de 3 et 5 semaines, lorsque les oiseaux sont sexuellement immatures. Les données sont analysées par auto-corrélation afin de déterminer la présence ou non d'un rythme et estimer la clarté de ce rythme. La mesure de l'immobilité tonique confirme bien que les oiseaux issus des deux lignées présentent de nettes différences de

réactivité émotionnelle : le nombre d'induction et la durée de l'immobilité tonique est plus grande chez les E+ que chez les E- (Mann-Whitney,  $p < 0.0001$ ). Notre principal résultat réside dans le fait que les oiseaux des deux lignées présentent des différences de leur rythmicité circadienne d'alimentation. En effet, la fréquence phénotypique d'oiseaux arythmiques est supérieure chez les oiseaux E- (25.6%) que les oiseaux E+ (2.7%) (Fisher,  $p = 0.0009$ ). En conséquence, le rythme est plus net chez les oiseaux E+ ( $0.058 \pm 0.007$ ,  $N = 37$ ) que chez les oiseaux E- ( $0.041 \pm 0.005$ ,  $N = 43$ ) (ANOVA,  $p = 0.037$ ). Toutefois, la période circadienne ne diffère pas entre les oiseaux des deux lots, cette période (22.7 h) étant caractéristique d'oiseaux immatures. Ce lien mis en évidence entre clarté du rythme et réactivité émotionnelle est discuté en termes de causalité et de fonctionnalité.

### **Modélisation par la méthode des fenêtres glissantes des variations dynamiques de la rythmicité circadienne de la température lorsque les synchroniseurs externes de l'horloge interne sont perturbés : travail de nuit, jet lag et constant routine.**

Mauvieux B1, Gouthière L2, Waterhouse J3, Davenne D1.

1. Centre de Recherches en Activités Physiques et Sportives (CRAPS) - UPRES EA 2131 - Université de Caen, 2, Boulevard Maréchal Juin, F-14032 Caen Cedex, France ;
2. Laboratoire de Statistiques Appliquées et d'Informatique Biomédicale, Expert Soft Technology, Le chemin de la Birrotte, F-37320 Esvres, France ;
3. Research Institute for Sport and Exercise Sciences, Liverpool John Moores University, Henry Cotton Campus, 15 - 21 Webster St. Liverpool L3 2 ET, UK.



Ce travail présente l'intérêt d'utiliser la méthodologie de la fenêtre glissante (« sliding window ») pour étudier l'évolution des rythmes biologiques dans des situations modifiant les informations données par les synchroniseurs externes à l'horloge interne. Ce type de situation se retrouve dans le cas du travail posté, du travail de nuit, du jet-lag, de changements de conditions d'éclairages, ou dans des protocoles de constantes routines, de privation de sommeil, etc. Dans ces conditions, la plupart des rythmes biologiques subissent des évolutions à la fois intra- (allongement ou raccourcissement de la période, diminution de l'amplitude) et inter- (désynchronisation) indivi-

(Suite page 49)



(Suite de la page 48)

duelles qui jusqu'à présent étaient difficilement modélisables. Le principe de la « fenêtre glissante » permet cette modélisation. Le principe de la « sliding window » consiste à choisir dans la fenêtre principale contenant l'ensemble des données recueillies sur le protocole expérimental au moins deux périodes c'est à dire un échantillonnage d'environ 48 heures. Nous décalons ensuite sur cet intervalle de 48 heures une fenêtre (toutes les 6 heures par exemple) et nous notons les valeurs des périodes calculées avec les différentes méthodes de périodogramme (Périodogramme de Lomb & Scargle, Périodogramme de Jenkins et Watts). Afin d'illustrer nos propos, nous prendrons l'exemple de la température de travailleurs de nuit et l'exemple de situations expérimentales simulant un jet-lag et une constante routine. Dans ces protocoles, les paramètres des rythmes (amplitudes, périodes, acrophases et MESOR) présentent des variabilités. Toute la difficulté est de pouvoir déterminer avec le plus de précision possible, la période de ces rythmes pour ensuite en proposer une modélisation permettant de calculer les amplitudes et les acrophases. Cette méthode d'analyse permet alors de mettre en évidence les « vitesses d'ajustement » (temps nécessaire pour la re-synchronisation) des rythmes avec les synchroniseurs externes. Nous montrerons le temps nécessaire au rythme de la température pour se re-synchroniser avec le nouvel horaire local à la suite d'un vol trans-méridien, ou les ajustements du rythme de la température chez les travailleurs de nuit entre le travail de nuit et les week-end.

### **Effets d'un créneau d'obscurité sur les noyaux suprachiasmatiques chez un rongeur diurne et un rongeur nocturne.**

**Mendoza J, Revel F, Pévet P et Challet E.**

*Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR7168/LC2, CNRS, ULP Strasbourg France.*

Les noyaux suprachiasmatiques (SCN) peuvent être déphasés par une exposition à un créneau d'obscurité chez un rongeur nocturne maintenu en lumière constante. Des observations récentes suggèrent que l'effet du créneau d'obscurité peut être contrôlé par un mécanisme comportemental non-photique. Le but de cette étude était d'évaluer l'effet d'un créneau d'obscurité chez deux types de rongeurs, l'un nocturne (Hamster doré) et l'autre diurne (*Arvicanthis ansorgei*) au niveau comportemental et moléculaire. L'activité locomotrice de ces deux espèces maintenues en lumière constante (300 lux) présente des avances de phase en réponse à un créneau d'obscurité appliqué en début de nuit subjective et des retards de phase en fin de nuit subjective. Par contre, en milieu du jour subjectif, ce créneau provoque une avance de phase importante chez le Hamster, alors qu'il est sans effet chez l'*Arvicanthis*. Chez ces deux espèces, ce créneau d'obscurité provoque une baisse de l'expression des ARNm et des protéines de *Per1* et *Per2* dans les SCN pendant la nuit subjective. Cependant en milieu du jour subjectif ce créneau est sans effet chez l'*Arvicanthis*. Nos résultats montrent que l'application d'un créneau d'obscurité en milieu de jour subjectif fait apparaître une différence au point de vue comportemental et moléculaire entre rongeurs nocturnes et diurnes, mais pas pendant la nuit subjective.

### **Putting a fly into the mammalian clock**

**Mure LS, Rieux C, Cooper HM**

*INSERM U371, Cerveau et Vision, Département de Chronobiologie, 18 Avenue du DoyenLépine, Bron, France; IFR19, UCBL1, Lyon, France*

Chez les mammifères, les réponses photiques non visuelles sont médiées par les cellules rétinienne ganglionnaires intrinsèquement photosensibles (ipRGC) exprimant la mélanopsine. Les ipRGC reçoivent des afférences des bâtonnets et des cônes via les cellules amacrines et bipolaires. Ensemble, ces trois types de photorécepteurs régulent les décalages de phase de l'oscillateur circadien, la suppression aiguë de mélatonine et le réflexe pupillaire. Leur absence abolie complètement ces réponses. Des données récentes, obtenues *in vitro*, suggèrent que la mélanopsine est non seulement photosensible mais pourrait aussi posséder une fonction photoisomérase, propriété que l'on a longtemps cru exclusivement exprimée par les photopigments d'organismes invertébrés (rhabdomériques). Ainsi, des expériences d'expression hétérologue de mélanopsine semblent montrer que la lumière peut restaurer la capacité de réponse des cellules par photorégénération du chromophore. Dans cette étude, nous démontrons que cette propriété, observée *in vitro*, s'exprime également au niveau des réponses physiologiques et comportementales impliquant la mélanopsine. Des pré-expositions à de grandes longueurs d'onde non seulement restaurent mais aussi augmentent la réponse de neurones unitaires du SCN à une stimulation lumineuse à 480 nm, alors qu'elles n'induisent pas de réponse par elles même. Cet effet d'augmentation de la réponse est dépendant de la longueur d'onde, de l'irradiance et de la durée de la pré-exposition. Ces pré-expositions à de grandes longueurs d'onde sont aussi efficaces pour augmenter l'amplitude des décalages de phase d'activité et la constriction pupillaire induit par des courtes longueurs d'onde apportant ainsi pour la première fois la démonstration *in vivo* d'une activité de type photoisomérase à un niveau comportemental.

### **Le syndrome de retard de phase pur existe-t-il ?**

**Nicolas, A**

*Unité d'Exploration Hypnologique - Service Hospitalo-Universitaire de Psychiatrie (Pr Dalery) - CNRS UMR 5167 - Hôpital Le Vinatier - Bron*

Parmi les troubles chroniques du rythme veille/sommeil le plus fréquent est, de loin, le syndrome de retard de phase du sommeil (SRPS). Cette pathologie se traduit par un endormissement tardif et un réveil proportionnellement décalé dans la matinée associés à une fatigue voire une somnolence diurne quand le patient est soumis à des contraintes horaires classiques. La prévalence est aux environs de 0,15 % de la population générale mais s'approche dangereusement des 5 % chez l'adolescent. Plusieurs traitements ont été proposés dans ce domaine mais les résultats restent décevants.

Devant une efficacité thérapeutique incertaine les médecins ont tendance à se retourner vers la nosologie et à se demander s'ils ont bien défini le trouble et ses causes. Dans le cas du SRPS on est donc amené à s'interroger sinon sur la « pureté » du syndrome du moins sur son origine multifactorielle. On se retrouve donc dans la nécessité d'évaluer la part de l'inné et de l'environnement, voire du comportement individuel.

Ainsi on a cru un temps avoir trouvé le Graal en la personne du gène *Clock*, mais les espoirs ont été déçus. Il apparaît actuellement que le plus court allèle du gène

(Suite page 50)

(Suite de la page 49)

PER3 est particulièrement associé au SRPS, mais comme souvent dans ce domaine, tous les patients présentant un SRPS cliniquement patent ne sont pas homozygotes pour cet allèle. Inversement il est plus que probable que tous les porteurs de l'allèle ne sont pas atteints d'un SRPS.

Si l'on considère que les facteurs génétiques constituent une vulnérabilité au développement d'un SRPS, il faut aussi prendre en compte l'existence de facteurs déclenchants et de facteurs de maintien du trouble. Parmi ces facteurs les éléments psychopathologiques sont particulièrement importants. Ainsi, on retrouve des troubles de la personnalité chez 22,4 % des patients porteurs d'un SRPS. De plus, une étude portant sur des adolescents hospitalisés en milieu psychiatrique montre que 16 % d'entre eux présentent un SRPS. Enfin un syndrome dépressif peut-être retrouvé dans 2/3 des SRPS sans que l'on puisse précisément décider lequel est la cause de l'autre. Chacune de ces situations illustre des phénomènes de retrait ou de perte de contact social qu'il soit primaire (fuite du contact social dans les troubles de la personnalité) ou secondaire (perte de la sensibilité au contact social dans la dépression).

Il n'y a donc pas de SRPS pur (càd biologique), mais plutôt une association entre une possible anomalie de la période circadienne et une sensibilité altérée aux donneurs de temps. Mais dans ce cas les synchroniseurs sociaux ont tendance à prendre une place prépondérante qui explique la grande implication des facteurs psychopathologiques dans le déclenchement et le maintien du SRPS. Méconnaître cette dimension équivaldrait à nous priver de tout un champ thérapeutique. Or, il semble évident qu'une approche globale du traitement SRPS serait à même de combler les insuffisances actuelles dans ce domaine.

### ***Influence de la rythmicité circadienne des propriétés neuromusculaires, sur la fatigue musculaire et la récupération à la suite d'un exercice concentrique maximal.***

**Nicolas A1, Gauthier A1, Michaut A2, Davenne D1.**

1. Centre de Recherches en Activités Physiques et Sportives (EA2131), Université de Caen - Basse Normandie, France;
2. Institut National du Sport et de l'Éducation Physiques (INSEP), Paris, France.

Les propriétés neuromusculaire du muscle squelettique humain suivent une rythmicité circadienne avec une acrophase situé en fin d'après midi (17-19h). Nous avons précédemment montré, au cours d'un exercice maximal et continu, que la fatigue musculaire, mesurée à partir de la baisse de la force, était supérieure le soir par rapport au matin. Afin, d'étudier les effets de la rythmicité circadienne de la force, sur la fatigue musculaire au cours d'un exercice maximal et intermittent, 10 sujets masculins entraînés, ont réalisé à deux heures différentes de la journée (06:00h et 18:00h), un exercice composé de 5 séries de 10 contractions maximales volontaires (CMV) des muscles fléchisseurs du coude. Au cours de l'exercice de fatigue les moments musculaires (MM) et les activités électromyographiques (EMG) des muscles Biceps Brachii et Triceps Brachii ont été enregistrés. Dans le même temps, cette étude s'est attachée à évaluer les effets de l'heure de la journée sur la récupération de la force musculaire. Dans cet objectif, les MM (évalués en isométrie et aux vitesses angulaires de 1.05 et 4.19 rad.s<sup>-1</sup>) ont été mesu-

rés avant (pre), après (post), 2 jours (post2), 3 jours (post3) et une semaine (post7) après l'exercice de fatigue et à la même heure. Les résultats montrent que (i) la fatigue musculaire est plus importante au cours de chaque série lorsque l'exercice est réalisé à 18:00h. Cependant, les MM développés à 18:00h restent supérieurs à ceux développés à 06:00h, tout au long de l'exercice, du fait d'une meilleure récupération entre les séries (1:30 min entre les séries). (ii) La récupération de la force maximale enregistrée au cours du pre-test est effective en 48h (Post2), mais sans différence 06:00h/18:00h. Cette étude montre le caractère plus fatigable du muscle en fin de journée, cependant la performance reste supérieure à 18:00h par rapport à 06:00h. Les facteurs de ces variations diurnes semblent trouver leurs origines au niveau périphérique (ioniques et métaboliques). L'heure de la journée à laquelle est réalisé un exercice concentrique maximal, n'a pas d'effet sur la vitesse de récupération musculaire.

### ***Synchronisation de l'horloge circadienne du cerveau larvaire de la drosophile par la lumière et par la température***

**Picot M, Klarsfeld A, Chelot E, Rouyer F.**

Laboratoire de Génétique Moléculaire des Rythmes Circadiens, UPR 2216 CNRS, Gif-sur-Yvette, France.

Les horloges circadiennes reposent sur des rouages moléculaires aujourd'hui bien décrits. Par comparaison, les mécanismes de leur synchronisation par des cycles environnementaux sont moins bien connus. L'alternance lumière-obscurité constitue le synchronisateur (zeitgeber) majeur des horloges circadiennes. Chez les mammifères, la lumière agit sur les rythmes exclusivement par l'intermédiaire du nerf optique. Chez les insectes aussi, le système visuel est relié à l'horloge cérébrale, mais une protéine photosensible, le cryptochrome, est également exprimée dans la plupart (sinon la totalité) des horloges, périphériques et cérébrale. Nous avons analysé les différentes voies de photoperception par les cellules d'horloge du cerveau de la drosophile larvaire. Nous avons également comparé l'action, sur ces cellules, des cycles lumière-obscurité à celle de cycles chaud-froid. Un groupe de neurones « aveugles » à la lumière s'est révélé le mieux entraîné par les cycles de température, tandis qu'à l'inverse les neurones les plus contrôlés par la lumière présentaient une rythmicité faible en cycles de température. La rythmicité persiste chez l'adulte après un entraînement larvaire, mais avec des phases différentes pour les deux types de cycles. Les relations de phase au sein du réseau circadien dépendent du zeitgeber utilisé pour le synchroniser.

### ***Régulation de l'expression du gène Tryptophane Hydroxylase-2 chez le rat : Implication des glucocorticoïdes.***

**Raison S, Malek Z.S, Sage D. et Pévet P.**

Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives ; IFR37 des Neurosciences ; Strasbourg, France.

Les noyaux suprachiasmatiques (SCN) reçoivent une dense innervation sérotonergique (5-HT) en provenance des Noyaux du Raphé. Nous avons démontré précédemment l'existence de variations circadiennes des taux d'ARNm et de protéine tryptophane hydroxylase (TPH, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT) dans les voies sérotonergiques afférentes au système circadien du rat.

(Suite de la page 50)

Ces résultats montrent que ces voies 5-HT présentent un fonctionnement rythmique régulé au niveau de l'expression du gène tph2.

Les mécanismes responsables de ce phénomène demeurent inconnus. Les SCN pourraient générer ce rythme par l'intermédiaire de différents messagers, notamment de nature hormonale. A ce titre, les glucocorticoïdes, dont la sécrétion rythmique est sous le contrôle des SCN, semblent être de bons candidats. En effet, ils sont connus pour moduler la synthèse de 5-HT en agissant sur l'ARNm et la protéine TPH ainsi que sur l'activité de cette enzyme. De plus, de nombreux récepteurs aux glucocorticoïdes sont exprimés dans les neurones 5-HT des Noyaux du Raphés.

Nous avons donc étudié l'influence des variations journalières de la sécrétion des glucocorticoïdes circulants sur l'expression du gène tph2 dans les Noyaux du Raphé.

Dans un premier temps, nous avons examiné l'effet de l'abolition du rythme de sécrétion de corticostérone après surrénalectomie (groupe ADX) sur le profil journalier de l'ARNm TPH2 dans les Raphés sur 24h, quantifié par hybridation in situ. Nous avons observé chez les rats ADX, une suppression du profil rythmique d'ARNm TPH2 concomitante à l'abolition du pic nocturne de corticostérone. Dans un deuxième temps, nous avons restauré artificiellement le pic nocturne de corticostérone en rajoutant cette hormone dans l'eau de boisson des rats ADX uniquement pendant la nuit. Cette manipulation hormonale permet de restaurer un profil rythmique de l'ARNm TPH2.

Nos résultats démontrent que le rythme de sécrétion des glucocorticoïdes est directement impliqué dans la synthèse rythmique de 5-HT dans les Raphés. Cette action pourrait constituer un rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur l'activité de l'horloge via les neurones à 5-HT.

### **Expression et régulation des deux promoteurs du gène *Rev-erba***

**Rambaud J1, Triqueneaux T1, Canaple L1, Dkhissi-Benyahya O2, Benoit G1, Laudet V1**

1 UMR5161, CNRS, ENS, 46 allée d'Italie 69364 Lyon cedex 07, France ;

2 INSERM U-371, IFR 19-UCBL, 18 avenue du Doyen Lépine, 69675 Bron

Les rythmes circadiens permettent aux organismes vivants d'anticiper et de s'adapter aux changements de leur environnement et de contrôler ainsi de nombreux processus physiologiques. Les gènes *Rev-erba* et *ROR* ont une expression circadienne chez les mammifères et jouent un rôle majeur dans les horloges circadiennes. En effet, *Rev-erba* réprime l'expression de *Bmal1*, un gène clé de l'horloge circadienne, aussi bien que sa propre expression et que celle d'autres gènes contrôlés par l'horloge prenant ainsi part à l'intégration du rythme. Dans ce travail, nous montrons que *Rev-erba* a deux isoformes nommées  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et qu'elles sont générées par deux promoteurs P1 et P2. Nous démontrons que ce nouveau promoteur P2 contrôle l'expression de *Rev-erba2*. Il contient des E-box et des sites *Rev-RE* qui constituent les éléments de réponse de *Bmal1* et de *Rev-erbs/RORs* respectivement. Aussi, les deux promoteurs permettent l'expression circadienne des isoformes de *Rev-erba* dans plusieurs tissus tels le foie, les muscles, la rétine, le noyau suprachiasmatique (NSC). Nous montrons également que la faible expression de l'ARNm de *Rev-erba2* par rapport

à celle de *Rev-erba1* peut être compensée par une plus grande stabilité de la protéine *Rev-erba2*. Sur la base de ces données, nous discutons les rôles distincts de *Rev-erba1* et  $\alpha 2$  dans la régulation circadienne.

### **La Reproduction Photopériodique du Hamster tient à un KiSS...**

**Revel FG1,2, Saboureau M1, Masson-Pévet M1, Pévet P1, Mikkelsen JD2, Simonneaux V1**

1. Département de Neurobiologie des Rythmes, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR-7168/LC2, CNRS - Université Louis Pasteur, Strasbourg, France ;

2. Department of Functional Neuroanatomy, NeuroSearch A/S, Ballerup, Denmark

La fonction de reproduction est largement dépendante de la photopériode chez les espèces saisonnières comme le hamster doré. Il s'agit que la naissance des petits arrive à la saison la plus favorable de l'année pour ne pas mettre



en péril la survie de l'espèce. En laboratoire, des hamsters mâles maintenus en photopériode longue (PL) restent sexuellement actifs, alors que l'axe sexuel de leurs congénères placés en photopériode courte (PC) est profondément inactivé en 8 à 10 semaines. Bien que l'on sache depuis plusieurs années que cette réponse photopériodique est médiée par la mélatonine, les mécanismes d'action de cette hormone sur les grandes fonctions physiologiques dont l'activité sexuelle restent très mal connus. Récemment, la découverte du couple *KiSS-1* / *GPR54* a bouleversé le domaine de la biologie de la reproduction. Il a notamment été montré que le produit du gène *KiSS-1*, la kisspeptine, joue un rôle prépondérant dans le déclenchement de la puberté. Ce peptide représente un puissant sécrétagogue de la libération de LH/FSH en activant les neurones à GnRH via le récepteur *GPR54*. Aussi, nous avons montré chez le hamster doré que l'expression de *KiSS-1* dans le noyau arqué de l'hypothalamus est modifiée en fonction des conditions photopériodiques, avec notamment une inhibition en PC. Ces modifications semblent dépendantes de la mélatonine. Nous avons fait l'hypothèse que cette diminution de la synthèse de kisspeptine en PC pouvait être à l'origine de l'arrêt de l'axe reproducteur. Nous avons alors vérifié que l'administration intracérébroventriculaire prolongée de kisspeptine à des hamsters en PC était suffisante pour induire une reprise de l'activité gonadique en 4 semaines, en dépit des conditions photopériodiques inhibitrices. Ces données suggèrent que *KiSS-1* joue un rôle majeur dans le contrôle photopériodique de la reproduction par la mélatonine.

(Suite de la page 51)

### **Le complexe CLOCK - CYCLE : développement et fonctionnement de l'horloge circadienne chez la drosophile.**

**Richier B, Michard-Vanhee C, Manière G, Cheilot E, Lamouroux A, Rouyer**

*FNGI UPR2216, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, CNRS, Gif sur yvette, France*

L'horloge circadienne centrale de la drosophile contrôle les rythmes d'activité locomotrice et les rythmes d'éclosion des adultes. Cette horloge est localisée dans le cerveau dans plusieurs petits groupes de neurones spécialisés qui expriment les gènes d'horloges. Les gènes Clock et cycle (Bmal 1), deux facteurs de transcription de type bHLH-PAS, sont au centre des boucles moléculaires qui forment l'horloge circadienne. Ils constituent le complexe activateur de l'horloge en activant notamment les gènes *per* et *tim*. L'étude au laboratoire des gènes *Clk* et *cyc* suggèrent qu'ils jouent également un rôle dans une deuxième fonction. En effet la différenciation et le développement des neurones d'horloge sont affectés chez les mutants *Clkjrk* et *cyc0* : disparition, défauts morphologiques, absence d'expression de gènes spécifiques. Il semble donc que CLK et CYC participent doublement à l'horloge. Premièrement lors de la construction de ses structures dans le cerveau et, deuxièmement, dans son fonctionnement propre. L'étude de l'implication de Clock et cycle dans le développement des neurones d'horloge chez la drosophile nous a également permis de révéler de nouvelles fonctions spécifiques de chacune des deux protéines.

### **Expression de c-FOS, c-JUN et JUN-B dans la glande pinéale: Effet opposé du complexe AP-1 sur la transcription de l'Aa-nat chez le rat et le hamster syrien**

**Sinitskaya N, Salingre A, Klosen P, Simonneaux V**

*Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Département de Neurobiologie des Rythmes, UMR-7168/LC2 CNRS-Université Louis Pasteur, IFR des neurosciences de Strasbourg, France*

L'arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) est l'enzyme limitante dans la synthèse de la mélatonine. Nous avons montré que les mécanismes moléculaires régulant l'expression du gène *Aa-nat* sont différents entre le rat et le hamster syrien (*Mesocricetus auratus*). Notamment, chez le hamster syrien l'expression de l'*Aa-nat* en début de nuit requiert des facteurs activateurs protéiques qui ne sont pas nécessaires pour l'initiation de la transcription du gène codant pour AA-NAT chez le rat. La nature de ces facteurs transcriptionnels étant inconnue, nous avons analysé l'expression des protéines du complexe AP-1 (c-FOS, c-JUN et JUN-B) dans la glande pinéale du hamster pour la comparer à celle du rat. Chez le hamster syrien, une forte expression de c-FOS et c-JUN est détectée alors que JUN-B est faiblement exprimé. Un pic des protéines c-FOS et c-JUN est observé 3h après le début de la nuit. Ce suggère que le complexe AP-1 se forme dès le début de la nuit, c'est à dire avant le pic d'expression de l'ARNm de l'*Aa-nat*. L'injection aiguë de cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, inhibe l'expression de c-FOS et c-JUN ainsi que l'ARNm de l'*Aa-nat*. c-FOS et c-JUN pourraient donc constituer des facteurs de transcription stimulateurs de l'*Aa-nat* chez le hamster syrien. Chez le

rat, le niveau général d'expression de c-FOS est très faible alors qu'une forte expression de c-JUN et JUN-B est détectée 5-7 heures après le début de la nuit, c'est à dire au moment du pic nocturne d'ARNm de l'*Aa-nat*. L'injection de cycloheximide réalisée au début de la nuit augmente le niveau d'ARNm de l'*Aa-nat* dans la glande pinéale du rat suggérant que le complexe c-JUN/JUN-B pourrait inhiber la transcription de l'*Aa-nat* chez le rat. En conclusion, nous proposons que selon la composition et la cinétique du complexe AP-1, celui-ci peut avoir des effets opposés sur la régulation de l'expression du gène *Aa-nat* chez les deux espèces de rongeurs étudiés.

### **Long-term combined light and melatonin treatment improve sleep, cognition and mood in demented elderly**

**Van Someren E.J.**

*Netherlands Institute for Brain Research, Amsterdam, The Netherlands*

A good night's sleep sustains cognitive performance. Disturbed sleep, a frequent decisive factor in caregiver burden and institutionalisation of Alzheimer patients, may thus augment their characteristic impairments. We hypothesized that a possibly reversible lack of activation of the circadian clock could contribute to sleep problems, and performed the first controlled human study on the effect of prolonged combined stimulation with light and melatonin. During a 3.5 year double-blind placebo-controlled randomized follow-up study, 189 elderly received daily supplementation of the circadian synchronisers light ( $\pm 1000$  lux, whole-day), and/or melatonin (2.5 mg). Half-yearly assessments were made of actigraphic sleep-wake rhythm estimates, cognition (MMSE), and non-cognitive symptoms.

Combined light and melatonin treatment improved nocturnal restlessness by  $8 \pm 3\%$  per year ( $p < 0.01$ ), resulting in increased sleep duration and efficiency and a more pronounced 24-hour amplitude.

Light improved cognition by  $0.9 \pm 0.4$  MMSE-points or 5% ( $p = 0.04$ ). Additionally, melatonin attenuated MMSE-decline by  $0.6 \pm 0.3$  or 3% per year ( $p = 0.04$ ).

Light ameliorated depressive symptoms by 19% (Cornell). Melatonin ameliorated the worsening of psychiatric symptoms that occurred in subjects about to drop out of the study due to nursing home placement or death (NPI-Q). A negative effect of melatonin, on affect (PGCARS) was counteracted in combination with bright light. Combined treatment also attenuated aggressive behaviour (CMAI).

Both light and melatonin treatment enhanced the nocturnal rise of the 24-hour saliva melatonin rhythm, as measured in the absence of melatonin gifts. Melatonin treatment however also resulted in an increased daytime melatonin level, which was associated with an attenuation of diurnal activity.

This first study on long-term stimulation of the human circadian timing system showed that improvement of the sleep-wake rhythm contributed to attenuation of cognitive decline, with an effect exceeding that achieved with acetylcholinesterase inhibitors. Light improved noncognitive symptoms, whereas melatonin may aggravate withdrawn behavior and should – for long-term treatment in demented elderly – preferably be given in a lower dosage and in combination with bright light.

### **Genetic variability in clock genes and the human circadian timing system**

(Suite de la page 52)

### Malcolm von Schantz

Centre for Chronobiology and Surrey Sleep Research Centre,  
School of Biomedical and Molecular Sciences, University of  
Surrey, Guildford GU2 7XH, UK

Circadian rhythms are created through the concerted coexpression of specific circadian clock genes, and the interaction between their protein products and the genes themselves. In all eucoelomate animals from *Drosophila* to mammals, mutations and polymorphisms in clock genes have been shown to associate with variability in circadian parameters. In a few specific families, advanced sleep phase syndrome has been shown to be inherited in a monogenic fashion, associating with mutations in the clock genes PER2 and casein kinase I delta. We and others have been studying polymorphisms in clock genes not only in subjects with advance and delayed sleep phase syndrome, but also in the general population. We have been using the Horne-Östberg questionnaire to assess diurnal preference, in order to select subjects with extreme diurnal preference. We found no association with the previously reported Clock3111 polymorphism. However, we discovered two novel associations between clock gene polymorphisms and diurnal preference in a variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism in the coding region of PER3, and in a single nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of PER2 (PER2111). We propose that these two polymorphisms may influence the molecular clock gene expression cycle, and thus the phenotype of the individual, by affecting the phosphorylation levels of the PER3 protein, and the translatability of the PER2 mRNA, respectively. A study by a Brazilian group found the same association between the PER3 VNTR and diurnal preference. We did not, however, find a significant latitudinal cline in the allele frequencies in different ethnic population. However, we have replicated our previous finding in a larger European population, and analysed the strength of the association in different age groups.

### Modulation du rythme journalier de température corporelle en fonction de la température ambiante et de l'âge chez le Microcèbe

Terrien J, Aujard F

UMR 5176 CNRS-MNHN, Equipe Ecophysiologie, 4 Avenue du  
Petit Château - 91800 Brunoy, France

Les mammifères présentent des oscillations journalières de température corporelle (Tc) résultant d'influences conjointes des systèmes circadiens et homéostatiques. Avec l'âge, les rythmes biologiques sont altérés (baisse d'amplitude et décalages de phase), de même que le contrôle homéostatique de la thermorégulation. Cette étude a pour but de déterminer les modulations temporelles au cours du vieillissement du rythme de Tc chez un primate nocturne, le Microcèbe (*Microcebus murinus*). Les réponses thermorégulatrices ont été suivies par télémétrie chez des animaux adultes (N=6) et âgés (N=6) exposés 10 jours à des températures ambiantes (Ta) de 12, 20, 25, 28 puis 34°C en photopériode courte (LD10/14). A 25°C, un rythme net de Tc est observé quel que soit l'âge. Des valeurs de Tc élevées sont enregistrées pendant la phase nocturne d'activité (Tc<sub>nuit</sub>=37.1±0.15°C). Les valeurs moyennes de Tc sont plus basses pendant le jour (Tc<sub>jour</sub>=36.2±0.2°C), avec entrée en hypothermie en début de phase lumineuse. Chez les adultes, la Tc, après avoir atteint son minimum (Tc<sub>min</sub>) à ZT=73.3±9.6h

(Hmin), remonte progressivement durant la deuxième partie de la journée. Les animaux âgés atteignent leur



Tc<sub>min</sub> une heure plus tard que les adultes. L'exposition au froid entraîne un abaissement général de la Tc dès une Ta de 20°C chez les âgés et seulement à 12°C chez les adultes. L'amplitude thermique est significativement plus importante à 12°C chez les âgés (Tc<sub>min</sub>=30.3±1.3°C) que les adultes (Tc<sub>min</sub>=34.8±0.2°C). Par contre, l'organisation temporelle de la phase d'hypothermie n'est pas modifiée par l'exposition au froid. Lors de l'exposition à 34°C et quel que soit l'âge considéré, les valeurs de Tc s'élèvent. L'amplitude thermique se réduit et la phase d'hypothermie disparaît chez les animaux âgés. Les paramètres temporels de l'hypothermie sont affectés. La descente thermique est amorcée plus tôt. Hmin est retardée chez les individus âgés par rapport aux adultes. L'exposition au chaud révèle des difficultés accrues avec l'âge à évacuer la chaleur corporelle excédentaire. Chez ce primate, le vieillissement s'accompagne d'une modification des capacités thermorégulatrices, plus particulièrement observées lors d'exposition à des Ta chaudes. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes dans la compréhension des mécanismes de contrôle du rythme journalier de température interne.

### Mesure de pression intracrânienne chez la brebis ; variation photopériodique de la sécrétion du liquide cébrospinal.

Thierry JC1, Lomet D1, Bougoin S1, Preston J2, Malpoux B1.

1. Neurobiologie et maîtrise des fonctions saisonnières, INRA - CNRS (UMR 6175) - Université François Rabelais de Tours - Haras nationaux 37380 Nouzilly (France) ;
2. Institute of Gerontology, Franklin-Wilkins Building, King's College London, 150 Stamford Street, London SE1 1UL, UK.

Chez la brebis, l'oestradiol et la progestérone exogènes

(Suite de la page 53)

administrés en périphérie se trouvent plus concentrés dans le liquide cébrospinal (LCS) en jours longs (JL) qu'en jours courts (JC). Une des causes possibles de cette variation photopériodique réside dans une différence de dilution résultant d'une modification de sécrétion du LCS. Chez 5 brebis ovariectomisées, portant un implant d'oestradiol et préalablement implantées d'une canule dans le IIIe ventricule, nous avons mesuré sous anesthésie à l'isoflurane la variation de pression intracrânienne (PI) consécutive au retrait de 0.5 à 2ml de LCS. La mesure a été faite à l'équinoxe de septembre (12L/12D) en éclairage naturel puis après 98 jours longs en éclairage artificiel (16L/8N). La PI chute immédiatement lors du retrait de LCS, de 2 à 10 mm de Hg selon les individus et proportionnellement au volume prélevé, puis retourne à la valeur initiale en 9,4 ± 1,9 mn (JC) et 14,0 ± 2,5 mn (JL). La récupération de PI (pente de la courbe de pression, en mm Hg/mn) est différente entre JC et JL (et 0,62 ± 0,07 mm Hg/mn et 0,34 ± 0,06 mm Hg/mn, respectivement). Cette récupération de PI dépend de la sécrétion par les plexus choroïdes du LCS compensant le volume perdu. Les valeurs du taux de renouvellement (volume compensé/temps) varient de 146 ± 28 ml/mn (JC) à 84 ± 18 ml/mn (JL) et sont proches de la valeur préalablement estimée pour cette espèce (120 ml/mn) par une autre méthode (Dziegielewska et al, 1980). La mesure de PI consécutive au retrait de LCS serait donc une méthode fiable reflétant le taux de renouvellement de LCS. La mélatonine se fixant sur les plexus choroïdes (Stankov et al 1993, Williams et al, 1996, 1999), la variation photopériodique du taux de renouvellement du LCS pourrait traduire les effets de la mélatonine sur leur activité sécrétoire (Decker and Quay, 1982, Vitte et al, 1989). Par son activité sécrétoire du LCS et son rôle de barrière entre ce liquide des ventricules cérébraux et le sang, le plexus choroïde est un bon modèle de cible intracérébrale de la mélatonine.

### **Un nouveau rôle pour Clock : construction du message saisonnier dans les noyaux suprachiasmatiques.**

**Tournier BB, Birkenstock J, Pévet P, Vuillez P**

*Institut de Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR 7168/LC2, Département de Neurobiologie des Rythmes, Strasbourg, France.*

Les noyaux suprachiasmatiques (NSC) des Mammifères permettent une rythmicité circadienne des fonctions physiologiques. L'activité des NSC est entraînée à 24h par les facteurs environnementaux dont le cycle jour/nuit assurant ainsi la synchronisation des rythmes biologiques entre eux et avec l'environnement journalier. En particulier les NSC régulent la synthèse de mélatonine par la glande pinéale. Les organismes s'adaptent également par anticipation au rythme des saisons. Pour cela ils traduisent le rythme annuel de la photopériode (durée relative d'éclairement quotidien) en une variation annuelle de la durée du pic nocturne de mélatonine. Chez le Hamster doré, le passage de photopériode longue (PL) à photopériode courte (PC) en fin d'été, réduit la durée d'expression des gènes horloges dans les NSC et à l'inverse, provoque un allongement du pic de mélatonine. Puis, au cours de l'hiver les animaux semblent devenir insensibles à la photopériode et sont donc photoréfractaires (PC-Réf). On observe une restauration spontanée des physiologies printanières chez ces animaux, même si les durées de nuit et de pic de mé-

latonine sont toujours de type PC. Cependant, le délai d'intégration d'une nouvelle photopériode par les NSC reste inconnu. Dans ce travail, nous avons étudié les profils nycthémeraux d'expression de gènes horloges et de gènes contrôlés par l'horloge dans les NSC d'animaux acclimatés (acc) à la photopériode (PLacc, PCacc), après un changement de photopériode (4, 21 jours après transfert en PC) et en PC-Réf. En prenant la PCacc comme référence, il apparaît que 1/ l'ajustement du pic d'ARNm de Per2 et de Per3 est complet après 21 jours mais pas après 4 jours de PC ; 2/ les profils d'ARNm des gènes contrôlés par l'horloge, Avp et Vip, ne sont toujours pas de type PCacc 21 jours après transfert en PC ; 3/ le gène Clock présente une expression différente dans chaque condition. De niveaux constitutifs élevés en PLacc, les ARNm de Clock présentent une oscillation en PC dès 4 jours et des niveaux faibles et constants en PC-Réf. En conclusion, nous avons montré que l'intégration de la photopériode par les NSC est relativement lente. De plus, le gène Clock paraît être un élément essentiel dans la construction d'un message photopériodique efférent aux NSC.

### **Saisonnalité et polymorphisme du récepteur oMT1 : Relation causale ou simple marqueur?**

**Trécherel E, Collet A, Chesneau D, Lomet D, Batailler M, Duittoz AH, Malpaux B, Chemineau P, Migaud M.**

*INRA, UMR85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de Tours, Nouzilly, F-37380, France ; CNRS, UMR6175, Nouzilly, F-37380, France ; Univ François Rabelais, Tours, F-37041, France ; Haras Nationaux, Nouzilly, F-37380, France ; IFR 135, Imagerie Fonctionnelle, Tours, F-37044, France.*

La mélatonine est une hormone dont le rôle dans la reproduction ovine est essentiel. Elle permet la discrimination entre les jours longs (printemps - été) et les jours courts (automne - hiver), et elle module la sécrétion du GnRH. Les ovins sont des animaux de jours courts dont la reproduction est saisonnée. Cependant, certaines races ovines sont peu saisonnées et peuvent se reproduire à contre-saison (printemps - été). Ce caractère est héritable et répétable, il est donc sous la dépendance d'un paramètre génétique. Notre gène candidat est le gène codant le récepteur à la mélatonine qui est la cible d'un important polymorphisme. Une des mutations provoque l'absence d'un site de restriction et permet de caractériser l'allèle «-». Trois génotypes sont ainsi définis: +/+, +/- et -/-. Par ailleurs, une relation a été montrée entre la capacité des ovins à se reproduire à contre-saison et la présence du génotype -/-. Cet allèle «-» comporte une mutation non silencieuse qui provoque le changement d'une Valine en Isoleucine (V220I). Les animaux de génotypes +/+ et -/- expriment donc deux récepteurs de structures différentes appelés oMT1 et oMT1m respectivement. Notre objectif est d'étudier, par différentes approches, les conséquences éventuelles de la mutation V220I sur la fonctionnalité du récepteur. Après transfection transitoire des deux types de récepteurs dans des cellules Cos-7, l'étude d'affinité n'a montré aucune différence significative entre les deux variants. De plus, dans des cellules HEK293 exprimant stablement oMT1 ou oMT1m, la transduction du signal (AMPc) et l'internalisation n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les deux récepteurs. En conclusion, cette étude n'a montré aucune différence significative entre les deux récepteurs pour chacune des approches testées. Au vue des résultats actuels, la muta-

(Suite de la page 54)

tion étudiée ne semble avoir de conséquence fonctionnelle. Afin de conclure définitivement sur l'incidence de cette mutation, une analyse in vivo de la densité de récepteur, chez des animaux de génotype +/+ et -/-, est en cours de réalisation.

### **Effet physiologique et comportemental du gène PER3 chez l'homme**

**Viola AU, Archer SN, Groeger JA, Skene DJ, von Schantz M, Dijk DJ.**

*Surrey Sleep Research Centre and Centre for Chronobiology, University of Surrey, Guildford, UK.*

Des études ont montré chez l'homme, par le questionnaire de Horne-Ostberg, que la tendance individuelle à se lever et se coucher plus ou moins tôt est associée au polymorphisme du gène PER3. Ce polymorphisme se caractérise par un nombre variable de séquences répétées. Notre étude consiste à déterminer les aspects physiologiques et comportementaux de ce polymorphisme. Nous avons analysé le profil génétique de plus de 250 volontaires sains (20-35 ans), ceci indépendamment de leurs préférences diurnales. Seul 13 sujets homozygotes présentent un polymorphisme PER3 avec 5 séquences répétées (PER3-5/5). Ces sujets PER-5/5 sont appariés, en fonction de l'âge, du genre, de l'ethnie et de l'indice de masse corporelle, à des sujets homozygotes présentant un polymorphisme PER3 de 4 séquences répétées (PER3-4/4). Durant

les trois semaines précédant l'étude en laboratoire, les sujets sélectionnés portent un Actiwatch L, nous permettant d'évaluer leur activité et leur exposition à la lumière. Nous leur demandons également de compléter un agenda sommeil. L'étude en laboratoire se constitue de deux nuits de référence suivie d'une constante routine (CR) d'environ 40-h et d'une nuit de récupération de 12-h. Un enregistrement polygraphique en continu est effectué dès l'entrée des sujets en laboratoire. La période de CR inclue également la mesure de la température centrale en continu, des prélèvements sanguins toutes les heures ainsi que des tests psychométriques toutes les deux heures. Nos premières analyses ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes concernant les indices du questionnaire de Horne-Ostberg ainsi que pour les heures de couchés et d'éveils évaluées par l'agenda sommeil et corroborées par actigraphie. Cependant l'analyse de l'activité journalière au cours des trois semaines précédentes les enregistrements en laboratoire montre un décalage de la rythmicité avec une avance d'environ 1.5-h chez les sujets Per3-5/5. D'autre part la température centrale, au cours de la CR suggère une variation de la rythmicité autant au niveau de l'amplitude que de la moyenne. Ces résultats préliminaires corroborent l'hypothèse que le polymorphisme du gène PER3 module chez l'homme les paramètres circadiens autant physiologiques que comportementaux.

Supporté par la BBSRC, BSS/B/08523.

(Suite de la page 29)



**worldsleep07**  
5th World Sleep Congress  
of the WFSRSMS  
**Cairns Australia**  
**2-6 September 2007**

**ENTER SITE >>**

<http://www.worldsleep07.com/Call-Symposia.htm>

Call for symposia deadline 1<sup>st</sup> October 2006



**IBRO**  
Melbourne  
2007

**IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE**  
**MELBOURNE AUSTRALIA JULY 12-17 2007**

<http://www.ibro2007.org/abstracts.html>

Call for abstracts deadline 31 January 2007

(Suite page 59)



## CLOCK et l'horloge circadienne: "with or without you..."

Hugues Dardente

Douglas Hospital Research Centre, 6875, LeSalle bld Montréal (QC), Canada,

[hugues.dardente@mail.mcgill.ca](mailto:hugues.dardente@mail.mcgill.ca)

Dans un article récemment publié dans la revue *Neuron*, DeBruyne et al. révèlent que les souris invalidées (Knock-Out, KO) pour le gène *Clock* ne présentent aucune altération majeure du rythme d'activité locomotrice circadien ce qui laisse à penser que CLOCK, contrairement à ce que l'équipe de Takahashi avait précédemment rapporté, n'est pas nécessaire au fonctionnement de l'horloge circadienne. Toutefois, les deux modèles murins, KO dans un cas et mutant dans l'autre, ne sont pas fonctionnellement équivalents. Dans ce commentaire, je me propose donc d'expliquer brièvement ce qui différencie ces deux modèles et de donner quelques pistes qui vous permettront, je l'espère, de mieux comprendre pourquoi ce résultat, s'il n'est pas totalement inattendu, ouvre par contre des perspectives fondamentales dans les domaines de la génétique et de la biologie moléculaire des rythmes circadiens.

Dans l'horloge moléculaire présidant au contrôle des rythmes circadiens tout semble simple. Les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 jouent un rôle central. Ces deux protéines dimérisent via les domaines PAS (Per-ARNT-Sim), entrent alors dans le noyau et contrôlent la transcription de différents gènes cibles par suite de leur liaison sur des éléments de réponse de type E-Box présents dans le promoteur ou des séquences introniques desdits gènes cibles. Certains de ces gènes, en particulier les gènes *Period 1-3* et *Cryptochromes 1-2*, sont eux-mêmes des éléments de l'horloge puisque les protéines peuvent hétérodimériser (ou peut-être même multimériser), entrer à leur tour dans le noyau et inhiber le dimère CLOCK/BMAL1, bouclant ainsi la boucle (Reppert et Weaver, 2002; Lowrey et Takahashi, 2004). Durant les dernières années de nombreux autres éléments ont été identifiés: les récepteurs nucléaires orphelins des familles REV-ERB et ROR (Preitner et al, 2002; Ueda et al, 2002; Sato et al, 2004; Akashi et Takumi, 2005; Guillaumond et al, 2005), TIMELESS (Barnes et al, 2003), les protéines DEC1-2 (Honma et al, 2002) sont des exemples d'une liste qui s'allonge à bon train. D'une manière générale la contribution de ces acteurs au mécanisme moléculaire semble ne pas être fondamentale puisque les souris mutantes ou invalidées pour ces gènes (plusieurs d'entre elles n'ont toutefois pas encore été caractérisées) demeurent rythmiques, tout du moins sur le plan comportemental si on limite ce-

lui-ci à l'activité locomotrice de roue. Ces gènes semblent donc être plutôt impliqués dans la stabilité et la précision des rythmes que dans leur genèse; deux termes très imprécis toutefois, qui couvrent maladroitement une ignorance assez large quant au mécanisme d'action de chacun d'entre eux. Mais les protéines CLOCK et BMAL1 jouent-elles vraiment un rôle central dans l'horloge moléculaire?

Pour BMAL1, la réponse semble devoir être positive puisque les souris invalidées pour ce gène (qui semblent être des null-mutants bien qu'un court peptide correspondant au N-terminal de BMAL1, en amont du domaine bHLH, domaine de liaison à l'ADN, soit toujours exprimé; Bunger et al, 2000) sont immédiatement arythmiques en obscurité constante. Pour CLOCK la question a toujours été beaucoup plus délicate. Partant du postulat risqué qu'il était possible, comme Konopka et Benzer l'avaient préalablement démontré chez la drosophile pour le gène *Period*, d'isoler un locus (portion d'ADN contenant un gène) dont la mutation pourrait à elle seule entraîner une modification notable des rythmes, l'équipe de Joseph Takahashi a entrepris au début des années 1990 un criblage génétique à l'ENU (Ethyl-Nitrosourée, agent mutagène affectant la lignée germinale mâle, induisant de façon aléatoire et statistique une mutation par spermatozoïde, voir Vitaterna et al, 1994) chez la souris. L'approche semblait justifiée puisque Ralph et Menaker (1988) avait déjà fourni la preuve de principe qu'une mutation d'un chromosome autosome pouvait affecter de façon héritable et prévisible (suivant une loi Mendélienne) le phénotype du hamster doré (le mutant *Tau* dont le phénotype résulte d'une mutation ponctuelle affectant la cinétique enzymatique de la caséine kinase I  $\epsilon$ , Lowrey et al, 2000). Cette approche sans précédent de génétique inverse (forward genetic; partir d'un phénotype pour remonter jusqu'à sa cause génétique), par opposition aux approches classiques de la génétique (reverse genetic; supprimer un gène par invalidation pour en inférer le(s) rôle(s) sur le plan phénotypique) s'est avérée payante avec l'identification subséquente par clonage positionnel du gène *Clock* (Vitaterna et al, 1994; King et al, 1997; Antoch et al, 1997). Les souris hétérozygotes *Clock* présentent une période endogène plus longue. Les souris homozygotes, initialement rythmiques en conditions constantes avec une période très longue, deviennent rapidement arythmiques. Ceci démontre-t-il vraiment que CLOCK est essentiel au maintien



(Suite de la page 56)

des rythmes circadiens ? La réponse est à la fois oui et non. Le point majeur ici est que cette souche murine, le « mutant *Clock* » est un mutant et non une souche invalidée (souris KO, technique par laquelle une construction générée *in-vitro* est utilisée pour obtenir, par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires, une souche murine qui n'exprimera pas de protéine fonctionnelle pour le gène ciblé par la construction) pour le gène *Clock*. L'approche par ENU entraîne statistiquement, comme nous l'avons vu, une mutation ponctuelle du génome. Dans le cas du mutant *Clock*, la mutation est une transversion (mutation aboutissant à l'échange d'une base purique (A et G) par une base pyrimidique (T et C) ou l'inverse; par opposition au terme transition) convertissant une adénine en thymidine. Le résultat est l'absence d'un site donneur d'épissage aboutissant à l'absence de l'exon 19 (d'où le nom donné au mutant *Clock*, *ClockD19*) et conséquemment la délétion de 51 acides aminés dans la protéine *CLOCK* $\Delta$ 19. Cette délétion n'affecte pas le domaine bHLH, ni le domaine PAS tous deux situés en amont. Toutefois, cette partie de la protéine ainsi qu'une région C-terminale plus distale, riche en glutamine (Q-rich region) semblent importantes pour la transactivation (capacité à activer la transcription de gènes cibles) induite par le dimère *CLOCK/BMAL1* (Gekakis et al, 1998; Takahata et al, 2000). C'est d'ailleurs la seule indication dont on dispose pour expliquer le phénotype du mutant *Clock* : déficit transactivationnel (Gekakis et al, 1998). Les raisons moléculaires convertissant l'absence de l'exon 19 (et donc des 51 acides aminés absents de la protéine) en une activité transcriptionnelle réduite sont totalement inconnues. Donc, au final, la protéine *CLOCK* $\Delta$ 19 peut toujours dimériser avec *BMAL1* (car le domaine PAS est intact) et le dimère peut toujours se lier aux séquences E-Box (car le domaine bHLH est lui aussi intact). Il existe ainsi de fortes présomptions que cette protéine puisse en fait être un dominant négatif de la protéine *CLOCK*, c'est-à-dire posséder toutes les fonctions nécessaires à une dimérisation avec *BMAL1* et une liaison à l'ADN adéquates, tout en étant dépourvue de tout rôle en tant que facteur de transcription. Ceci implique que le phénotype de ce mutant puisse éventuellement être expliqué non pas par un rôle direct de *CLOCK* dans l'horloge mais par le fait que cette pro-

téine déficiente séquestre certains facteurs importants (comme *BMAL1*) les rendant alors indisponibles, occupe sur l'ADN des sites cruciaux pour l'expression des rythmes en lieu et place d'autres facteurs centraux, ou bien ne peut lier d'autres cofacteurs nécessaires à l'activation de la transcription (par exemple des facteurs qui reconnaîtraient les 51 acides aminés absents de cette protéine mutante) bloquant ainsi l'horloge. Pour l'heure aucune explication définitive n'a été avancée et les raisons pour lesquelles le mutant *Clock* est arythmique sont, dans le meilleur des cas, obscures.



**Escala doble hélix ADN  
Salvador Dalí**

Pour progresser il était donc nécessaire d'obtenir un null-mutant du gène *Clock*, ce à quoi sont parvenus Reppert et coll. (DeBruyne et al, 2006). Le résultat paraît, de prime abord, très surprenant : les souris invalidées pour le gène *Clock* (null-mutant; aucune protéine détectable) sont parfaitement rythmiques en obscurité constante. Ceci signifie-t-il que le rôle de *Clock* a été surestimé, que *Clock* ne joue aucun rôle dans l'horloge moléculaire? C'est sûrement aller un peu vite en besogne, et ce pour plusieurs raisons. Bien qu'elles soient effectivement toujours rythmiques (activité locomotrice de roue) les souris invalidées pour *Clock* présentent certaines particularités

indiquant que ce gène joue un rôle dans l'horloge. Dans les SCN, les rythmes d'expression de la plupart des gènes de l'horloge sont perturbés (*Per1*, *Rev-erba*, *Bmal1*). Par ailleurs, l'amplitude des rythmes des ARNm de différentes sorties moléculaires de l'horloge (*Avp*, *Pk2* et *Dbp*) présentent une amplitude diminuée. Enfin les réponses à la lumière, bien qu'évaluées très partiellement, semblent également affectées. Pourquoi alors ces souris sont-elles toujours rythmiques? Bien évidemment, si *Clock* est aussi indispensable qu'on le pense, alors les souris devraient être arythmiques. Est-il envisageable qu'un autre composant de l'horloge puisse remplir les fonctions de *Clock* dans les noyaux suprachiasmatiques (NSC) et ainsi effectuer un sauvetage phénotypique? A l'heure actuelle le seul homologue connu de *Clock* est un autre facteur de transcription de la famille bHLH/PAS connu sous le nom de Neuronal PAS domain protein 2 (*Npas2*, aussi connu sous le nom de MOP9; King et al, 1997; Zhou et al, 1997; Hogenesch et al, 2000). NPAS2 peut, à l'instar de *CLOCK*, dimériser avec *BMAL1* et activer la transcription de gènes possédant des motifs E-Box

(Suite de la page 57)

(Hogenesch et al, 1998; Kume et al, 1999; Jin et al, 1999; Shearman et al, 2000). Toutefois, les souris invalidées pour ce gène ne présentent pas d'altération notable des rythmes circadiens (Dudley et al, 2003). Néanmoins, NPAS2 a été impliqué dans le fonctionnement de divers oscillateurs hors des NSC, notamment dans le cerveau antérieur (Reick et al, 2001) et dans le muscle lisse vasculaire (McNamara et al, 2001). Dans ces tissus NPAS2 remplit toutes les conditions requises pour être qualifié d'homologue fonctionnel de CLOCK. Qu'en est-il dans les NSC? En fait, le gène *Npas2* semble ne pas être exprimé dans les NSC (Shearman et al, 1999). Alors ? En fait l'étude de Shearman, seule du genre, basait ses conclusions sur des résultats d'hybridation *in-situ* (HIS) radioactive, technique certes sensible mais toutefois pas assez pour permettre la détection d'ARNm faiblement exprimés. Il semble donc impossible d'exclure un rôle putatif de NPAS2 dans les NSC. À titre de précédent dans les rythmes il semble intéressant de rappeler que le récepteur MT2 de la mélatonine, s'il est exprimé dans les NSC tel que révélé par des techniques très sensibles de RT-PCR nichée, demeure parfaitement indétectable par HIS. Néanmoins les résultats obtenus pour les souris invalidées pour le MT1 (Liu et al, 1997) et les souris invalidées pour les récepteurs MT1 et MT2 (Jin et al, 2003) indiquent clairement que cette faible expression du MT2 est suffisante pour médier certains effets de la neurohormone.

Il convient donc d'être prudent dans l'interprétation des résultats de l'étude de DeBruyne et al. (2006). Eux-mêmes conscients du problème, les auteurs se sont intéressés à un potentiel phénomène de compensation chez ces souris; processus par lequel l'ablation d'un gène indispensable à l'expression d'une fonction vitale entraîne la surexpression d'un ou plusieurs autres gènes (généralement des homologues structuraux et fonctionnels) pouvant remplir une fonction analogue permettant ainsi un sauvetage phénotypique du mutant. Confirmant le rôle présupposé de *Npas2* comme analogue fonctionnel de *Clock*, et validant le mécanisme de compensation, DeBruyne et al. (2006) ont montré que *Npas2* se trouvait être surexprimé dans le foie des souris invalidées pour *Clock* comparativement aux souris de phénotype « sauvage ». Malgré cela, de façon similaire à ce qui avait été observé dans les NSC, l'expression de divers gènes de l'horloge et de sorties de l'horloge demeure perturbée. Par contre, et ce point est majeur, aucune compensation n'a été observée dans les NSC, l'expression de *Npas2* (si toutefois elle existe) demeure indétectable par HIS. Comme noté précédemment il demeure possible qu'une expression très faible dans les NSC soit suffisante pour maintenir la rythmicité chez ces souris. Il est donc maintenant nécessaire de générer des

souris invalidées non seulement pour *Clock* mais aussi pour *Npas2*, ce que les équipes de David Weaver et Steven Reppert sont en train de faire. Plusieurs possibilités sont alors envisageables. L'absence des deux facteurs de transcription peut être létale et il sera alors impossible, où du moins beaucoup plus difficile, de juger leurs rôles respectifs (il existe d'ailleurs au moins un précédent dans le domaine des rythmes avec les souris homozygotes pour *Timeless*, Gotter et al, 2000). Par contre, si les souris sont viables on se trouvera alors face à une dichotomie intéressante : soit les souris sont arythmiques, validant de fait le rôle de *Npas2* comme analogue fonctionnel de *Clock* dans les NSC, (bien qu'exprimé très faiblement) ou bien les souris demeurent rythmiques. Il sera alors temps d'échafauder un nouveau modèle sur les ruines de celui qui prévaut depuis 6-7 années...

### Reference List

1. Akashi M, Takumi T: The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat Struct Mol Biol* 2005, 12: 441-448.
2. Antoch MP, Song EJ, Chang AM, Vitaterna MH, Zhao Y, Wilsbacher LD *et al.*: Functional identification of the mouse circadian *Clock* gene by transgenic BAC rescue. *Cell* 1997, 89: 655-667.
3. Barnes JW, Tischkau SA, Barnes JA, Mitchell JW, Burgoon PW, Hickok JR *et al.*: Requirement of mammalian *Timeless* for circadian rhythmicity. *Science* 2003, 302: 439-442.
4. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB *et al.*: *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000, 103: 1009-1017.
5. DeBruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM: A *Clock* Shock: Mouse *CLOCK* Is Not Required for Circadian Oscillator Function. *Neuron* 2006, 50: 465-477.
6. Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S *et al.*: Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science* 2003, 301: 379-383.
7. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP *et al.*: Role of the *CLOCK* protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998, 280: 1564-1569.
8. Gotter AL, Manganaro T, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr, Possidente B, Sriram S *et al.*: A time-less function for mouse *timeless*. *Nat Neurosci* 2000, 3: 755-756.
9. Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N: Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms* 2005, 20: 391-403.
10. Hogenesch JB, Gu YZ, Jain S, Bradfield CA: The basic-helix-loop-helix-PAS orphan *MOP3* forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95: 5474-5479.
11. Hogenesch JB, Gu YZ, Moran SM, Shimomura K, Radcliffe LA, Takahashi JS *et al.*: The basic helix-loop-helix-PAS protein *MOP9* is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci* 2000, 20: RC83.
12. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M *et al.*: *Dec1* and *Dec2* are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 2002, 419: 841-844.
13. Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM: A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 1999, 96: 57-68.
14. Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Rep-

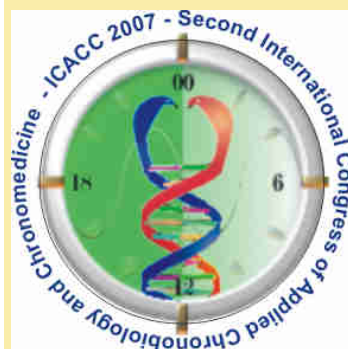
(Suite de la page 58)

- pert SM *et al.*: Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 2003, 23: 1054-1060.
15. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP *et al.*: Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 1997, 89: 641-653.
  16. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X *et al.*: mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 1999, 98: 193-205.
  17. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK *et al.*: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997, 19: 91-102.
  18. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR *et al.*: Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000, 288: 483-492.
  19. Lowrey PL, Takahashi JS: Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004, 5: 407-441.
  20. McNamara P, Seo SP, Rudic RD, Sehgal A, Chakravarti D, FitzGerald GA: Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell* 2001, 105: 877-889.
  21. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U *et al.*: The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002, 110: 251-260.
  22. Ralph MR, Menaker M: A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 1988, 241: 1225-1227.
  23. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL: NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 2001, 293: 506-509.
  24. Reppert SM, Weaver DR: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002, 418: 935-941.
  25. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P *et al.*: A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron* 2004, 43: 527-537.
  26. Shearman LP, Zylka MJ, Reppert SM, Weaver DR: Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 1999, 89: 387-397.
  27. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B *et al.*: Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 2000, 288: 1013-1019.
  28. Takahata S, Ozaki T, Mimura J, Kikuchi Y, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3. *Genes Cells* 2000, 5: 739-747.
  29. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T *et al.*: A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002, 418: 534-539.
  30. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser JM, Lowrey PL, McDonald JD *et al.*: Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science* 1994, 264: 719-725.
  31. Zhou YD, Barnard M, Tian H, Li X, Ring HZ, Francke U *et al.*: Molecular characterization of two mammalian bHLH-PAS domain proteins selectively expressed in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94: 713-718.

(Suite de la page 55)



<http://www.pco-tyrolcongress.at>



First Announcement

## Second International Congress of Applied Chronobiology And Chronomedicine

March 23 – March 28, 2007 Tunis, Tunisia

For more information, please contact Congress Secretariat:


Tel : +216 73 462 200 Office 464

Fax : +216 73 460 737

E-mail : naboughattas@yahoo.fr

## Chronobiologistes...

encore un effort pour vos contributions à Rythmes.

Vous devez participer à la vie de la Société Francophone de Chronobiologie en envoyant vos contributions à Fabienne Aujard, rédactrice en chef de 

Seules sont acceptées les contributions sous forme informatique, textes et figures, noir et blanc et couleurs. Cela assure la qualité de ce qui est produit, d'autant plus appréciable si vous optez pour la lecture électronique, qui, elle, est en couleurs !

Vous devez envoyer vos contributions en document attaché. Les fichiers seront préférentiellement sauvegardés au format \*.doc, \*.rtf, ou \*.txt après avoir été produits par un traitement de texte standard. Pour tout autre format que ces formats répandus, nous consulter.

Il est impératif de nous faire parvenir un fichier texte sans retours à la ligne multiples, tout en conservant l'accentuation. De même, ne mettez pas de lignes blanches pour marquer les paragraphes ni mises en page complexes, que nous devons de toutes façons changer pour rester dans le style du journal.

Les images pourront être en tiff, bmp, gif, jpeg, jpg ou png. Rythmes est mis en page sur un PC, donc les formats PC sont préférés, car cela évite des manipulations.

Enfin, vous enverrez vos contributions par courrier électronique à [fabienne.aujard@wanadoo.fr](mailto:fabienne.aujard@wanadoo.fr) avec copie à [jean-francois.vibert@upmc.fr](mailto:jean-francois.vibert@upmc.fr) et [beau@vjf.inserm.fr](mailto:beau@vjf.inserm.fr).

**Fabienne Aujard**  
**Jacques Beau**  
**Jean-François Vibert**

### Société Francophone de Chronobiologie

<b>Président</b>	Paul Pévet <a href="mailto:pevet@neurochem.u-strasbg.fr">pevet@neurochem.u-strasbg.fr</a>
<b>Vice président</b>	Bruno Claustrat <a href="mailto:bruno.claustrat@chu-lyon.fr">bruno.claustrat@chu-lyon.fr</a>
<b>Secrétaire général</b>	Etienne Challet <a href="mailto:challet@neurochem.u-strasbg.fr">challet@neurochem.u-strasbg.fr</a>
<b>Secrétaire adjointe</b>	Sophie Lumineau <a href="mailto:Sophie.Lumineau@univ-rennes1.fr">Sophie.Lumineau@univ-rennes1.fr</a>
<b>Trésorière</b>	Fabienne Aujard <a href="mailto:fabienne.aujard@wanadoo.fr">fabienne.aujard@wanadoo.fr</a>
<b>Trésorière adjointe</b>	Berthe Vivien-Roels <a href="mailto:vivien@neurochem.u-strasbg.fr">vivien@neurochem.u-strasbg.fr</a>

Les articles publiés dans ce bulletin reflètent l'opinion de leurs auteurs, et en aucun cas celle de la Société Francophone de Chronobiologie.

### Ont contribué à ce numéro

**Fabienne Aujard**  
**Jacques Beau**  
**Bernard Bruguerolle**  
**Hugues Dardente**  
**Etienne Challet**  
**Sophie Lumineau**  
**Paul Pévet**  
**Jean-François Vibert**

Rythmes est édité par la Société Francophone de Chronobiologie, Siège Social : Faculté des Sciences et Techniques. Laboratoire de Biologie Animale et Appliquée, 23 rue du Dr Paul Michelon, 42023 Saint-Étienne Cedex 2. Directeur de la publication : Paul Pévet. Rédactrice en chef : Fabienne Aujard. Comité de rédaction : Fabienne Aujard, Jacques Beau, Jean-François Vibert. Réalisation : Jacques Beau et Jean-François Vibert. Impression : Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.

Site Web : <http://www.sf-chronobiologie.org> Numéro ISSN 0154-0238.