

Rythmes circadiens : entraînement d'une horloge endogène par la lumière

Lise Martinet

L'environnement physique des êtres vivants dépend de deux phénomènes astronomiques majeurs, la rotation de la terre sur son axe et sa révolution autour du soleil. Ainsi, depuis son origine, la vie a dû faire face à des variations nycthémerales et annuelles de la lumière et de la température, défi qu'elle a relevé par des réponses adaptatives et une sélection naturelle permettant la survie de l'espèce. Pour être efficace, une telle adaptation implique un asservissement à l'évolution d'un paramètre physique du milieu, suffisamment reproductible pour assurer un entraînement constant d'un jour sur l'autre et d'une année sur l'autre. C'est ainsi que l'utilisation, par la plupart des êtres vivants, de l'alternance jour-nuit et des variations annuelles de la durée du jour comme signaux récurrents immuables a développé l'apparition de périodicités journalières et annuelles des processus biochimiques, physiologiques et comportementaux. Cette organisation temporelle permet une prévision et une adaptation permanente aux événements à venir, de telle sorte que les fonctions nécessaires à la survie de l'espèce aient lieu au moment le plus favorable de la journée (recherche de nourriture par exemple) et de l'année (éclosion, naissance des jeunes, entre autres).

De telles réponses adaptatives sous-

entendent la capacité de discrimination entre jours longs et jours courts, entre matin et soir, c'est-à-dire la capacité d'une mesure photopériodique du temps. En effet, les rythmes journaliers et annuels ne sont pas une simple réponse imposée par les changements de l'environnement mais découlent d'un système interne de mesure du temps.

Deux éléments au moins des mécanismes permettant la mesure du temps semblent largement présents chez les eucaryotes :

– la persistance de rythmes circadiens endogènes en l'absence de synchroniseur externe (lumière ou obscurité continue), persistance qui témoigne d'une organisation temporelle relevant d'un oscillateur endogène auto-entretenu, l'horloge circadienne ;

– l'existence de phases de photosensibilité au cours du cycle de 24 heures pendant lesquelles la lumière provoque une cascade de réactions conduisant, d'une part, à l'entraînement de l'horloge circadienne par l'alternance jour/nuit et, d'autre part, à la stimulation ou à l'inhibition de fonctions à périodicité d'un an (reproduction par exemple).

Pour aborder l'étude des phénomènes circadiens, deux démarches ont été largement utilisées :

– l'analyse du système de l'extérieur par déduction des propriétés des rythmes circadiens en réponse à un changement de l'environnement lumineux ;

– l'analyse du système de l'intérieur par la recherche des structures anatomiques impliquées dans les réponses à la lumière et par l'étude de leur fonctionnement en conditions naturelles ou artificielles.

Propriétés des rythmes circadiens

C'est un astronome français, Jean-Jacques d'Ortous de Mairan, qui en 1729 fit la première démonstration expérimentale de la persistance de rythmes circadiens en l'absence de variations de l'environnement. Ayant remarqué que les feuilles du *Mimosa pudica* s'ouvraient chaque matin et se refermaient chaque soir, il transporta la plante dans une pièce où la lumière très faible ne variait pas et constata que les feuilles continuaient à s'ouvrir et à se fermer régulièrement. L'utilisation d'un rythme endogène comme mécanisme de mesure du temps a ensuite été démontrée chez l'abeille par von Frisch et Beling en 1930 ; attirées chaque jour à la même heure par un bol d'eau sucrée, les abeilles étaient capables d'anticiper le moment à venir puisqu'elles ont continué à apparaître, au moins pendant quelques jours, en l'absence d'appât.

Les propriétés des rythmes circadiens ont été énoncées à partir des travaux de Bunning, Pittendrigh et Aschoff parmi d'autres. De nombreux rythmes comportementaux (activité locomotrice, veille/sommeil, prise de boisson ou de nourriture) et hormonaux (cortisol, mélatonine) servent de support à cette analyse.

La figure 1 schématise les propriétés des rythmes circadiens ; la figure 2 illustre ces propriétés à partir d'un exemple

L. Martinet : Laboratoire de physiologie sensorielle, Inra, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France.

Tirés à part : L. Martinet

Définitions

Nycthémère : succession naturelle du jour et de la nuit.

Photopériode : phase claire du nycthémère (L = light).

Scotopériode : phase sombre du nycthémère (D = dark).

Rythme nycthéméral (journalier) : oscillation à période de 24 heures que présentent la plupart des processus biochimiques, physiologiques et comportementaux.

Rythme circadien : oscillation à période proche de 24 heures (de circa = environ, diem = jour), d'origine endogène, persistant en l'absence d'un synchroniseur externe (lumière = LL, ou obscurité = DD, constante).

Synchroniseur : tout système extérieur oscillant, capable d'imposer sa période à un processus biologique avec une certaine relation de phase.

Entraînement : réponse de l'animal par laquelle la période du rythme endogène devient égale à celle du synchroniseur et conserve avec celui-ci une relation de phase constante.

Libre cours : état de l'animal privé de repères temporels externes permettant ainsi la mise en évidence de rythmes endogènes circadiens.

Jour subjectif, nuit subjective : notion reposant sur la perception interne du temps écoulé chez l'animal en libre cours. On admet que le jour subjectif correspond à la phase d'activité chez les espèces diurnes et de repos chez les espèces nocturnes ; inversement, la nuit subjective correspond à la phase de repos chez les diurnes et d'activité chez les nocturnes.

Temps circadien : par convention, le temps 12 (TC 12) correspond au début de la nuit (extinction de la lumière en conditions artificielles).

Horloge endogène (oscillateur) : entité anatomique responsable des rythmes endogènes persistant en l'absence de synchroniseur.

Phase photosensible : phase du rythme circadien au cours de laquelle la lumière peut induire un effet sur la fonction envisagée.

Courbe de réponse de phase : courbe obtenue, chez des animaux en DD, par balayage du cycle de 24 heures par une stimulation lumineuse de courte durée (flash) en mesurant l'avance ou le retard de phase pour chaque point du rythme circadien.

Photopériodisme : processus utilisant la variation annuelle de la durée du jour afin de synchroniser les cycles de vie avec les saisons.

Definitions

un oscillateur principal, des oscillateurs secondaires asservis et les rythmes qu'ils génèrent.

• La nature endogène des rythmes circadiens est une propriété innée, génétiquement programmée, de la physiologie des eucaryotes

Des mutations qui n'affectent qu'un seul gène et altèrent la période du rythme ont été trouvées chez divers eucaryotes, une crucifère *Arabidopsis*, un ascomycète *Neurospora*, un insecte, *Drosophila melanogaster* et, à ce jour, chez deux vertébrés, le hamster doré et la souris. Chez ces mutants homozygotes, les périodes varient entre 20 et 28 heures. Une drosophile présentant une période de 16 heures vient d'être obtenue par mutagenèse dirigée.

Chez la drosophile, le gène *period* (*per*) semble au cœur du mécanisme de l'horloge et la protéine nucléaire PER, qui est nécessaire aux oscillations circadiennes de la transcription de son propre gène, participe ainsi à un mécanisme d'autorégulation.

• En conditions naturelles (LD), l'alternance des jours et des nuits maintient constante la période (T = 24 h) et la phase du rythme circadien

Une avance ou un retard artificiel du rythme lumineux est suivi d'une avance ou d'un retard identique du rythme biologique étudié (figure 2A). Si la période du cycle LD est expérimentalement modifiée, l'oscillateur peut être entraîné aussi longtemps que la valeur de T n'est pas trop différente de 24 heures. Cette fourchette comprise entre 20 et 28 heures est celle observée pour la période des mutations spontanées. Il est vraisemblable que des périodes trop différentes de 24 heures ne sont pas compatibles avec l'adaptation de l'espèce à son environnement et, donc, avec sa survie. Cependant, les rythmes de 16 heures, obtenus expérimentalement chez la drosophile, semblent encore entraîna- bles par la lumière.

concret, le rythme d'activité locomotrice d'un rongeur nocturne, le hamster doré.

• En l'absence de synchroniseur externe (lumière ou obscurité continue), des rythmes d'une période t proche de 24 heures persistent (figure 2B)

Ces rythmes, omniprésents chez les eucaryotes, témoignent de l'existence d'un oscillateur (horloge endogène) qui fonc-

tionne de façon autonome et à sa fréquence propre qu'il impose aux effecteurs qui lui sont asservis.

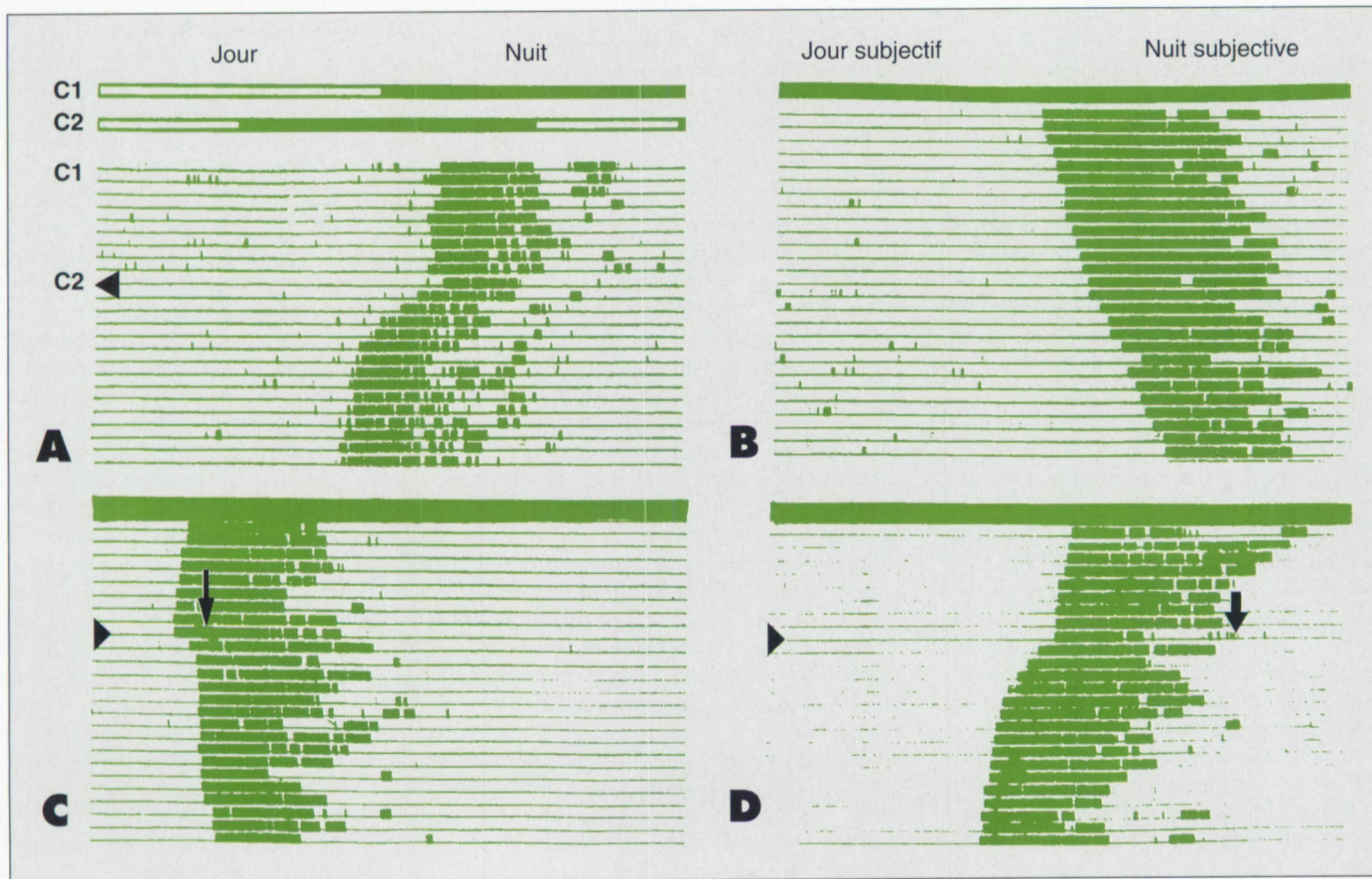
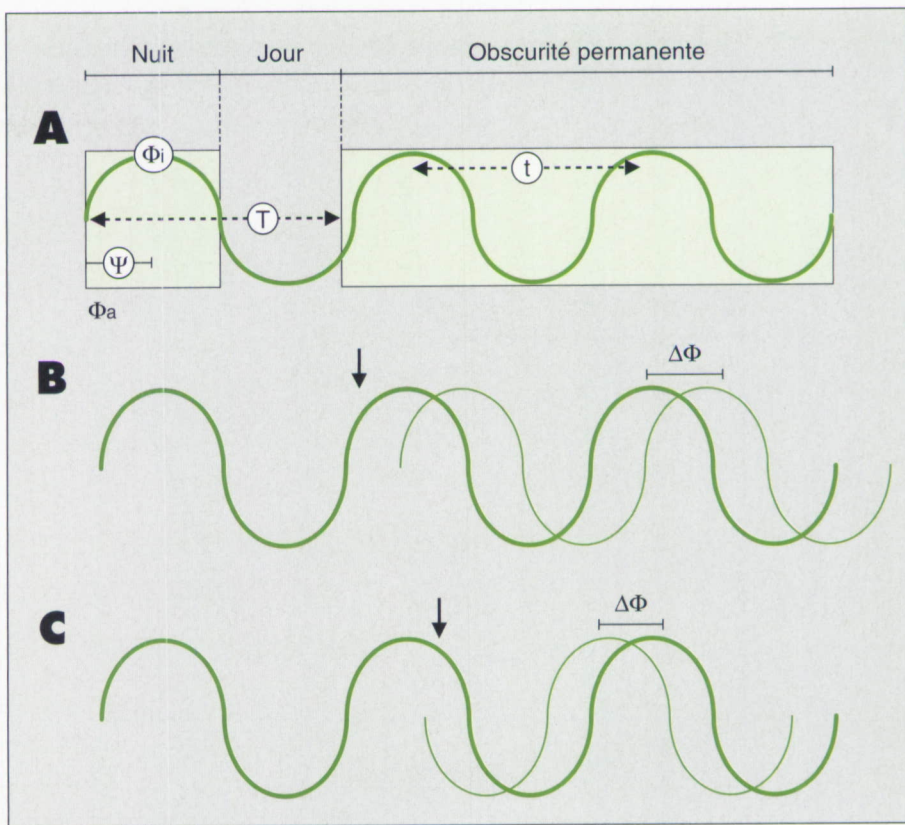
Ces rythmes endogènes peuvent persister très longtemps. En effet, des rythmes circadiens d'activité locomotrice ont été observés chez des souris élevées pendant plusieurs générations en lumière permanente. Cependant, certains rythmes disparaissent en quelques jours ; ce phénomène peut être dû à un découplage entre

Figure 2. Rythme d'activité locomotrice chez un hamster mis dans une cage équipée d'une roue reliée à un système d'enregistrement ; chaque tour de roue produit un signal ; l'activité correspond au tracé épaissi. Les actogrammes journaliers sont disposés l'un au-dessous de l'autre : (A) le rythme d'activité est entraîné par le cycle jour/nuit (C₁) ; une avance de phase du cycle lumineux (C₂) induit en quelques jours une avance identique du rythme d'activité ; (B) en obscurité permanente, le rythme d'activité, en libre cours, reflète la période de l'horloge interne. Elle est ici supérieure à 24 heures ; (C) un flash (↓) en début de nuit subjective entraîne un retard de phase le jour suivant ; (D) un flash identique en fin de nuit subjective entraîne au contraire une avance de phase. Les barres horizontales situées en haut de chaque actogramme représentent la scotopériode en vert et la photopériode en blanc [1].

Figure 2. Rhythm of locomotory activity of a hamster in a cage fitted with a wheel hooked up to a recording device.

Figure 1. Représentation schématique du rythme circadien de sensibilité à la lumière : (A) en conditions naturelles jour/nuit, la période du rythme T est égale à 24 heures ; il existe une relation constante entre la phase du rythme lumineux Φ_a et celle du rythme endogène Φ_i ; en obscurité permanente, le rythme en libre cours exprime sa période propre t d'environ 24 heures ; (B) une brève interruption de l'obscurité permanente par un flash (\downarrow) au début de la nuit subjective provoque un changement de phase Φ qui retarde Φ_i (tracé fin) ; (C) un flash identique en fin de nuit subjective provoque un changement de phase qui avance Φ_i .

Figure 1. Diagram of the light sensitivity circadian rhythm.



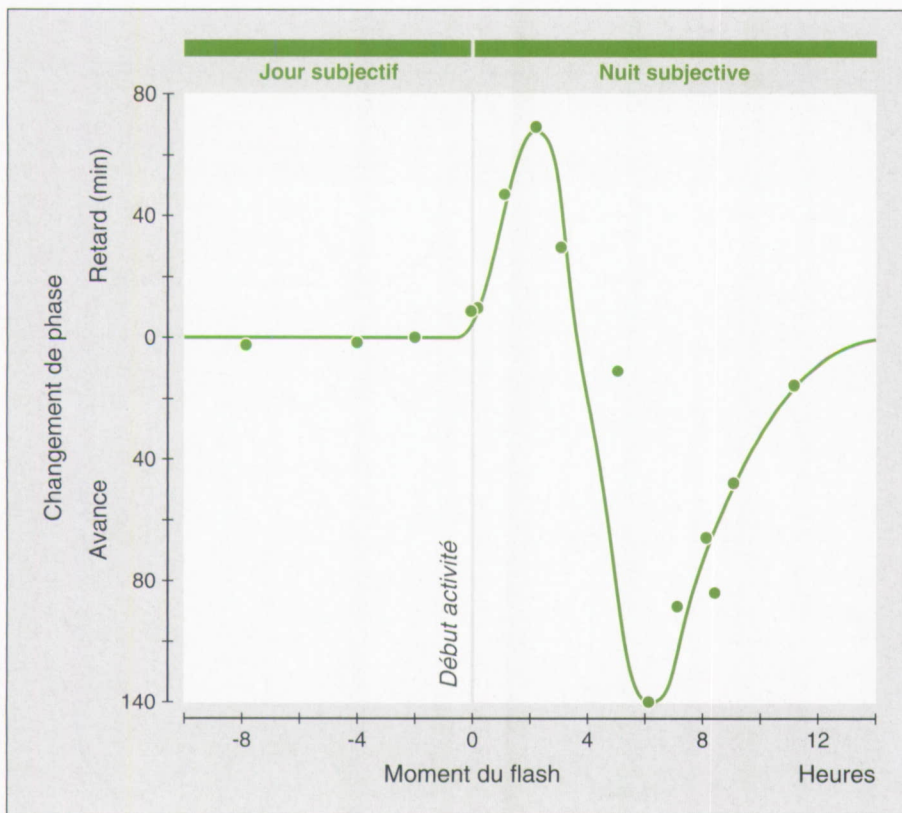


Figure 3. Courbe de l'évolution de l'amplitude du déphasage du rythme circadien en fonction du moment de la stimulation lumineuse chez un hamster mis en DD et soumis à un flash de 10 minutes à différentes heures du cycle de 24 heures.

Figure 3. Phase response curve according to time of light stimulus in a hamster under DD and given a ten-minute flash of light at different times of the 24-hour cycle.

• **En obscurité permanente (DD), il existe des fenêtres temporelles de photosensibilité** pendant lesquelles le rythme circadien peut être déphasé par une stimulation lumineuse de courte durée (*flash*). En dehors de ces fenêtres, la lumière est sans effet. L'amplitude et la direction du changement de phase varient en fonction du moment de l'exposition à la lumière (*figures 2C, 2D*).

À partir de ces réponses, en balayant l'ensemble du cycle de 24 heures par des flashes, il est possible d'établir des courbes de réponse de phase (*figure 3*), dont l'allure est constante quelle que soit l'espèce et qui reflètent la phase du rythme circadien de l'horloge dont on peut ainsi suivre la marche.

En lumière permanente (LL), il existe de la même manière des phases de scotosensibilité. Une courbe de réponse de phase peut être obtenue en balayant la photopériode par de courtes périodes d'obscurité ; elle est inverse de celle obtenue en DD par des flashes.

rité ; elle est inverse de celle obtenue en DD par des flashes.

• **La période du rythme endogène est largement indépendante des variations de la température ambiante**

En effet, pour être fiable, l'horloge circadienne doit être insensible aux variations de l'environnement autres que celles de la lumière. La période varie de moins de 20 % pour un changement de 10 °C de la température ambiante, alors qu'un changement identique provoque une modification de 200 à 300 % des réactions biochimiques. Cependant, un changement de la température corporelle (poïkilothermes, hibernants) peut être responsable d'un changement de phase du rythme.

Il existe d'autres synchroniseurs que la lumière, tels que la température ambiante, l'accessibilité à la nourriture, les interactions sociales. Dans cet article, seul sera envisagé le rôle majeur de la lumière.

re. Ce sont les mammifères et les oiseaux qui serviront de modèles pour cette revue.

Le système circadien

Le système circadien de mesure du temps est composé d'un ensemble de structures nerveuses interconnectées qui permettent l'organisation temporelle des processus physiologiques et comportementaux sur un mode circadien. La séquence des événements impliqués dans l'entraînement de ce système par la lumière et dans la mesure photopériodique du temps comprend trois étapes majeures : la réception du signal photique, son intégration cellulaire par l'horloge et, en aval, l'asservissement de systèmes effecteurs à cette horloge qui leur impose son rythme.

Trois structures, dérivées du diencephale, participent à ce système : ce sont la rétine, la glande pinéale et les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus.

La réception du signal photique

• **Chez les oiseaux**, les photorécepteurs impliqués dans la détection des cycles lumineux responsables de la synchronisation des rythmes circadiens sont localisés dans la rétine et dans la glande pinéale. Les photorécepteurs pinéaliens, qui possèdent les mêmes pigments que la rétine (rhodopsine et cône-opsine), sont des cellules modifiées mais analogues à des cônes et des bâtonnets. Les protéines (Å-transducine, arrestine et recoverine) impliquées dans la phototransduction sont identiques dans les deux organes. La *figure 4* montre les ressemblances entre l'organisation de la rétine chez les vertébrés et de la glande pinéale chez les vertébrés non mammaliens.

D'autres photorécepteurs, dont on connaît l'existence depuis les travaux de Benoit chez le canard il y soixante ans, ont été identifiés dans le septum et l'hypothalamus par la mise en évidence, dans ces structures, de pigments reconnus par des anticorps dirigés contre les opsines rétinienne. Ces récepteurs profonds sont indispensables au contrôle des cycles annuels de la reproduction par la photopériode ; leur implication éventuelle au niveau du système circadien reste à démontrer.

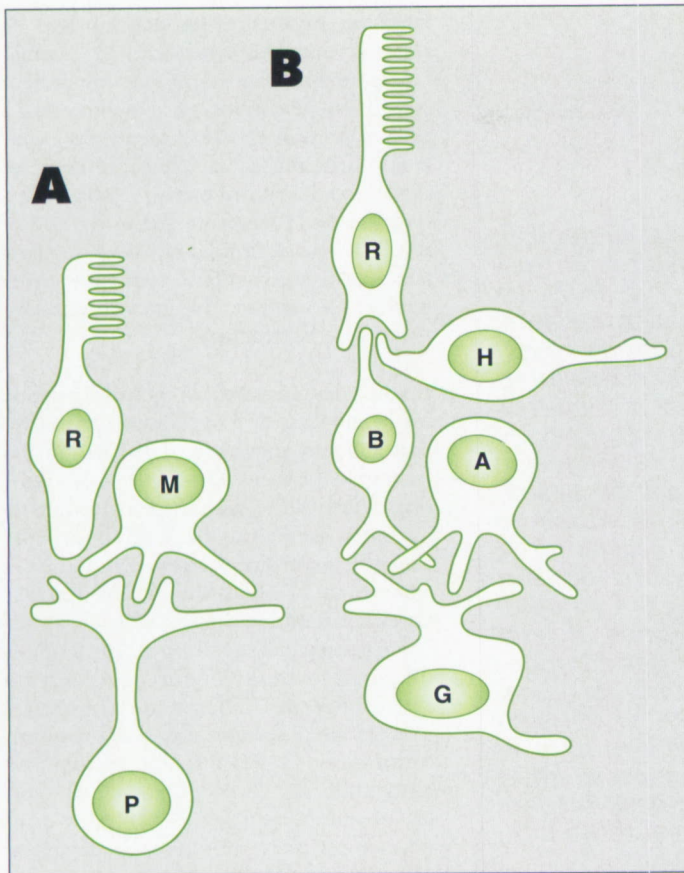


Figure 4. Organisation neuronale : (A) de la glande pinéale chez la grenouille ; (B) de la rétine chez l'ensemble des vertébrés. Dans la rétine, le photorécepteur (R) est composé d'un pôle récepteur de photons et d'un pôle émetteur de messages destinés à des neurones de deuxième (B cellule bipolaire), puis de troisième ordre (G cellule ganglionnaire). Interneurones multipolaires (M), cellules horizontales (H) et cellules amacrines (A) multiplient les communications. Dans la glande pinéale des oiseaux, le pôle récepteur et les cellules bipolaires ont partiellement régressé ; chez les mammifères, seul subsiste le pinéalocyte (P) qui a perdu sa capacité de photoréception [2].

Figure 4. Neuronal organisation : (A) of the pineal gland in the frog ; (B) of the retina for vertebrates as a whole.

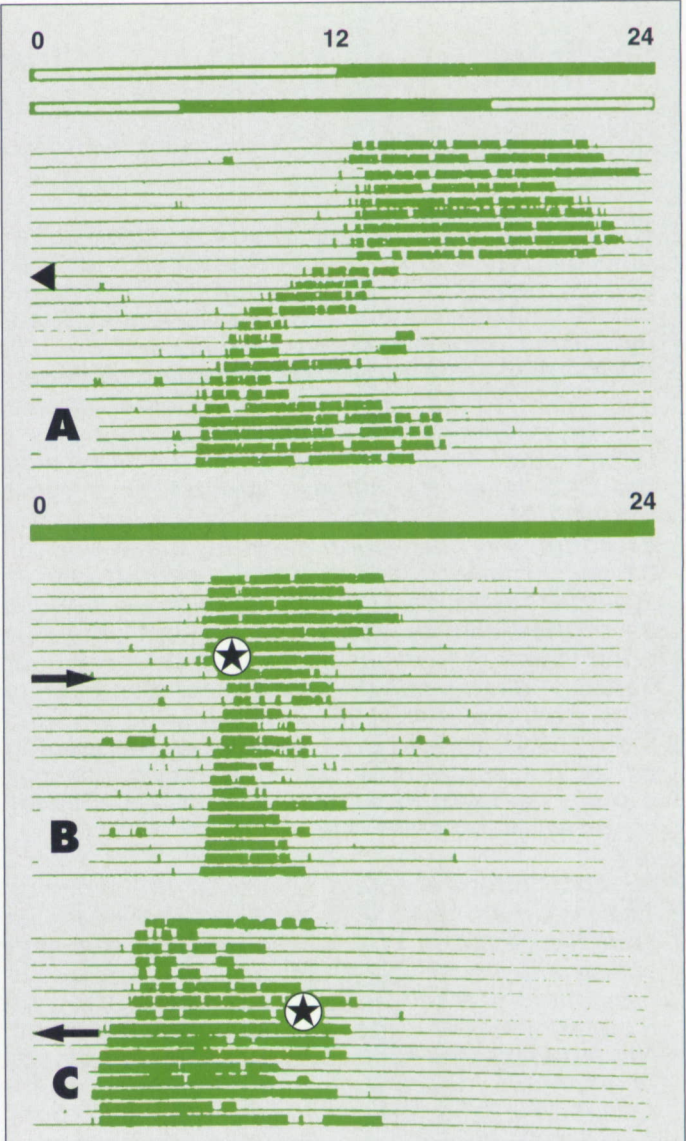


Figure 5. Rythmes d'activité locomotrice chez des hamsters traités au glutamate pendant les 10 premiers jours de la vie. La réponse à une avance de phase de 6 heures de la scotopériode (A), ou à un flash (⊛), 1 heure (B) ou 6 heures (C) après le début de la nuit subjective, n'est pas modifiée [3].

Figure 5. Rhythms of locomotory activity in hamsters treated with glutamate during the first ten days of life.

• **Les mammifères** ne possèdent pas de photorécepteurs extra-oculaires : la photoréception se fait donc exclusivement au niveau de la rétine, par un système différent du système visuel ; en particulier, la sensibilité et la rapidité des réponses du système circadien à la lumière sont très inférieures à celles concernant l'acuité visuelle.

Des sous-populations de photorécepteurs et de cellules ganglionnaires spécifiques du système photique circadien ont été mises en évidence :

– chez la taupe et chez les souris homozygotes pour la mutation *rd/rd*, la dégénérescence des photorécepteurs, conduisant à la cécité, n'altère pas la photosensibilité du système circadien ;

– chez le hamster dont la cécité est induite par des injections postnatales de glutamate, l'entraînement des rythmes circadiens d'activité par la lumière persiste (figure 5). Le glutamate, en provoquant une excitation prolongée des synapses appartenant aux neurones situés à l'extérieur de la barrière hémato-encéphalique, induit la mort de la plupart des neurones

Summary

Circadian rhythms. The light-driven endogenous clock

L. Martinet

The 24-hour and one-year rhythms observed in most biological, physiological and behavioural processes do not result from responses determined by variations in photoperiod, but from an internal system of temporal measurement: the circadian system. Part of an organism's genetic make-up, this endogenous rhythmicity allows the temporal sequences of variations in the internal milieu to be organised for optimal adaptation to environmental changes. The system's functioning is characterised by three stages: firstly, reception of the light signal; secondly, on the CNS level, the cellular integration of the signal by a self-maintaining oscillator (circadian clock) of period close to 24 hours, the integration allowing the endogenous oscillation to be synchronised onto a 24-hour period; and lastly, the effector systems' response to the clock's signals modulating the amplitude of their activity on its own rhythm under conditions of temporal isolation (constant light or dark), or a 24-hour period under natural lighting conditions. The fundamental property of circadian rhythms is that a short stimulus of light can phase-shift them either forwards or backwards, depending on the time at which the stimulus is received during the 24-hour cycle. Interrupting the night by a pulse of light has allowed a phase response curve, of constant rate no matter what the species, to be plotted.

In birds, photoreception occurs at the pineal gland and retina. The circadian clock is located in the pineal gland. In mammals, only the retina is photoreceptive, and the hypothalamic suprachiasmatic nuclei (SCN) act as substrate to the clock. Circadian oscillation is a cell property since it is also observed *in vitro* in isolated chicken pinealocytes or isolated rat SCN neurones. Nevertheless, the molecular mechanism behind circadian oscillation remains obscure. On the other hand, in mammals at least, reception of the light signal by a specific population of retinal cells involves a chain reaction of events, certain steps of which are just beginning to be understood: release of a neurotransmitter, glutamate, by retinal projections at the SCN, induction of genes of early expression, and probably of late expression coding for neuropeptides. Amongst the various clock outputs, only that allowing the rhythmic synthesis of melatonin by the pineal gland has been properly elucidated. Released only at night, melatonin has feedback control over the clock via high-affinity receptors and controls seasonal functions by informing the organism of annual variations in day length.

Cahiers Agricultures 1996 ; 5 : 9-21.

de deuxième (cellules bipolaires et amacrines) et de troisième (cellules ganglionnaires) ordres de la rétine. On ne connaît pas actuellement le mécanisme qui permet aux cellules rétinienne impliquées dans le système circadien de rester insensibles à l'excitotoxicité du glutamate.

L'horloge circadienne : oscillateur primaire

Les rythmes circadiens de nature endogène peuvent dépendre soit d'un oscillateur unique soit de multiples oscillateurs, de même rang ou hiérarchisés.

Chez les oiseaux et les mammifères, le système circadien comprend un oscillateur primaire et au moins un oscillateur asservi. La démarche expérimentale qui a permis la mise en évidence de cet oscillateur primaire a été identique chez les oiseaux et les mammifères, à savoir destruction de la structure présumée contenir l'horloge et implantation d'un greffon contenant cette structure pour rétablir les rythmes, ou encore maintien *in vitro* de la structure.

• Chez les oiseaux, la glande pinéale est le substrat de l'oscillateur primaire

Son ablation provoque la disparition des rythmes circadiens (figure 6A); la transplantation d'une glande pinéale dans la chambre antérieure de l'œil d'un hôte préalablement pinélectomisé restaure ces rythmes et la phase du rythme restauré est celle du donneur (figure 7).

Le maintien en survie *in vitro* de glande pinéale montre que la sécrétion rythmique de mélatonine (figure 8) persiste en l'absence du synchroniseur lumineux; la période du rythme est alors celle de l'horloge contenue dans les pinélocytes (figure 9A). Des données identiques, obtenues à partir de pinélocytes isolés, suggèrent que la glande pinéale est composée de multiples oscillateurs qui, en situation normale, sont couplés et se synchronisent mutuellement.

• Chez les mammifères, ce sont les noyaux suprachiasmatiques (NSC) de l'hypothalamus qui forment le substrat anatomique de l'oscillateur primaire

La destruction de ces noyaux, localisés à la surface dorsale du chiasma optique, provoque la disparition des rythmes circadiens (figure 6B). La greffe de NSC de nouveau-nés dans le troisième ventricule d'un adulte à NSC détruits restaure certains rythmes circadiens tels que activité locomotrice et prise de boisson. Si la période de l'horloge du greffon est différente de celle de l'hôte, la période des rythmes restaurés chez l'hôte sera celle du greffon, comme le montre l'utilisation de greffons homozygotes pour la mutation *tau* (période circadienne courte d'environ 20 heures) chez des receveurs dont la période était proche de 24 heures avant la lésion. Le mécanisme par lequel le greffon transmet une information à l'hôte privé de ses NSC ou reçoit l'information provenant d'un receveur intact est inconnu actuellement; il peut être de nature nerveuse ou humorale.

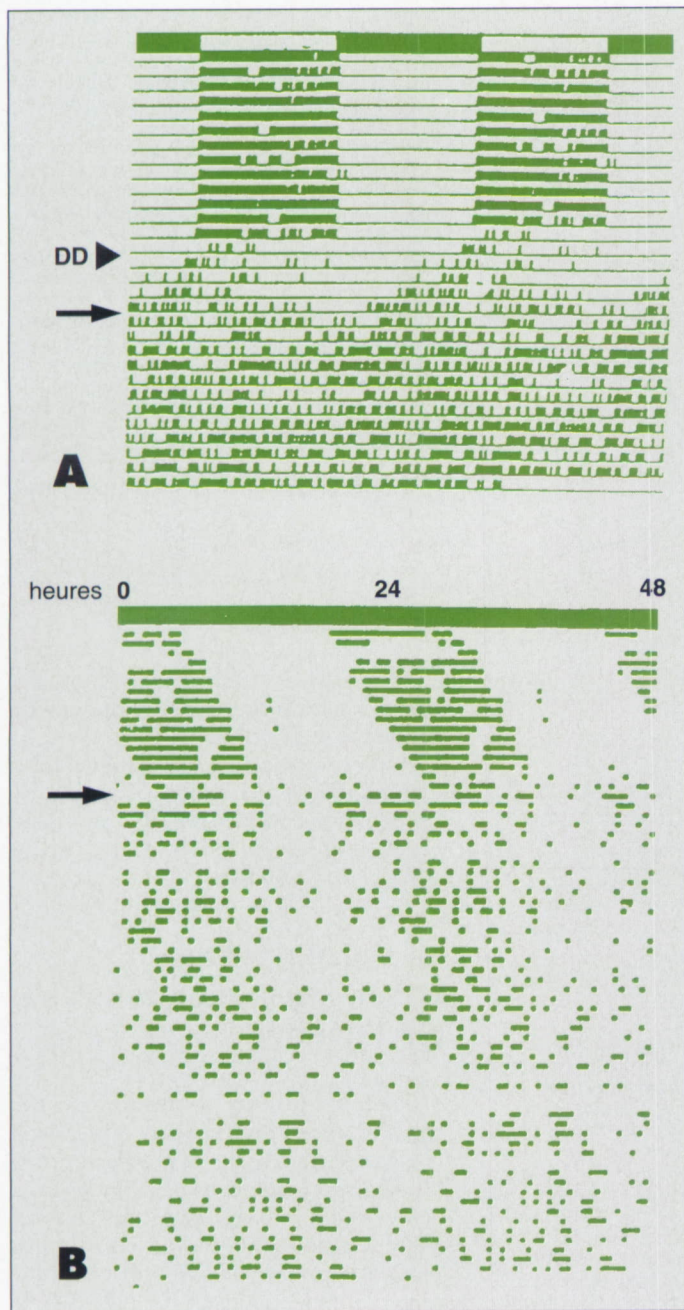


Figure 6. Effets de la destruction de l'horloge circadienne sur les rythmes d'activité locomotrice : (A) chez le moineau, bien que le passage d'un cycle LD 12 : 12 en DD diminue beaucoup l'activité chez une espèce diurne, on observe nettement l'apparition du libre cours ; après pinéalectomie (→), les rythmes circadiens disparaissent pour laisser place à une activité répartie sur toute la durée du cycle de 24 heures [4] ; (B) chez le rat, c'est la destruction des noyaux suprachiasmatiques (→) qui provoque la disparition des rythmes circadiens.

Figure 6. Effects of destroying the circadian clock on rhythms of locomotor activity in the sparrow and in the rat.

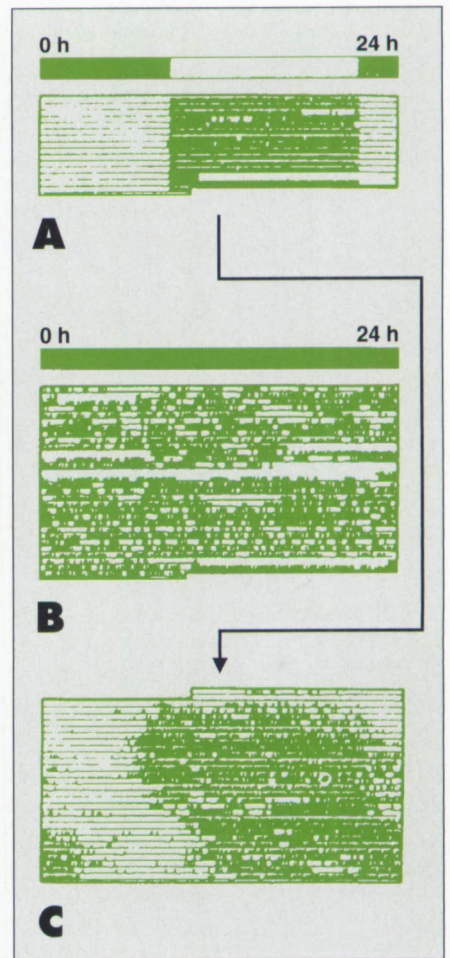


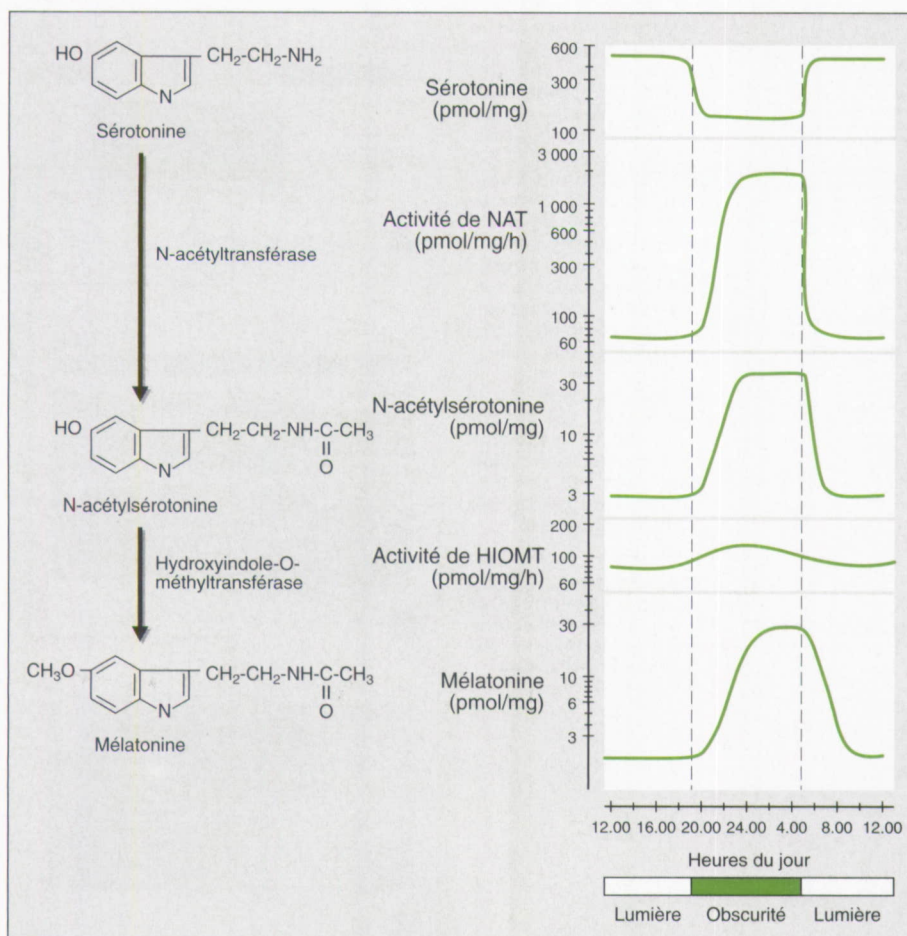
Figure 7. Transplantation d'une glande pinéale dans la chambre antérieure de l'œil d'un moineau préalablement pinéalectomisé : (A) cycle lumineux et rythmes d'activité du donneur ; (B) activité du receveur après pinéalectomie ; le rythme circadien a disparu ; (C) restauration du rythme après la transplantation [5].

Figure 7. Transplant of a pineal gland into the anterior chamber of the eye of a previously pinealectomised sparrow.

Bien que composés d'un petit nombre de cellules (10 000 au maximum chez le rat), les NSC représentent une structure dense et complexe faite de petits neurones de nature chimique très variée (neuropeptides et neurotransmetteurs) et d'une population importante d'astrocytes. Les NSC se caractérisent par des rythmes de consommation de glucose, d'activité

électrique spontanée, de synthèse de protéines, qui persistent *in vivo* chez des animaux en isolement temporel et *in vitro* dans des explants hypothalamiques contenant les NSC (figure 10). Activité métabolique oxydative et activité électrique sont plus élevées de jour (réel ou subjectif) que de nuit. La mise en évidence d'une plasticité morphologique des astrocytes au cours du rythme circa-

dien suggère que les cellules gliales pourraient aussi intervenir dans la marche de l'horloge [10]. Comme celle des oiseaux, l'horloge des mammifères semble composée de multiples oscillateurs puisque des cellules dispersées de NSC sont encore capables d'émettre des signaux circadiens. Il est vraisemblable que le réseau formé de ces multiples oscillateurs mutuellement syn-



◀ **Figure 8.** Sécrétion de mélatonine par la glande pinéale : à gauche, voie de synthèse à partir de la sérotonine ; à droite, rythme nyctéméral du contenu de la pinéale en sérotonine et en mélatonine et de l'activité des deux enzymes impliquées dans la synthèse de mélatonine. La production de mélatonine, synthétisée et libérée uniquement pendant la nuit, est contrôlée par l'alternance jour/nuit soit directement grâce aux photorécepteurs pinéaliens (oiseau), soit indirectement *via* le tractus rétinohypothalamique, les noyaux supra-chiasmatiques et les ganglions cervicaux supérieurs de la chaîne orthosympathique (oiseau, mammifère). La noradrénaline, libérée pendant la nuit par le nerf pinéalien, augmente l'activité N-acétyltransférase, l'enzyme clé de la synthèse de mélatonine, *via* des récepteurs $\alpha 1$ et $\beta 1$ [6].

Figure 8. Melatonin secretion by the pineal gland.

chronisés renforce le fonctionnement autonome de l'horloge. L'oscillation circadienne semble donc une propriété de la cellule. Mais, actuellement, nous ne savons rien des bases biochimiques et moléculaires de la machinerie circadienne.

Le signal photique et son intégration cellulaire par l'horloge

- **Chez les oiseaux**, le mécanisme par lequel les photorécepteurs pinéaliens transmettent les signaux photiques à l'horloge pinéaliennne reste inconnu, mais leur implication dans cette transmission a été élégamment démontrée. Si des pinéaloctes maintenus *in vitro* sont soumis à un cycle lumineux (LD 12 : 12), le rythme de sécrétion de mélatonine est alors entraîné sur une période de 24 heures (figure 9B). Un flash en début de nuit retarde le pic de sécrétion, tandis qu'en fin de nuit il l'avance, selon la courbe de réponse de phase décrite dans la figure 3. Ces déphasages par la lumière montrent que ce sont bien les photorécepteurs, présents dans les pinéaloctes, qui sont responsables de l'entraînement de l'oscillateur pinéalien.

- **Chez les mammifères**, la transmission du signal photique des cellules ganglionnaires de la rétine vers les NSC est assurée par une voie directe, le tractus réti-

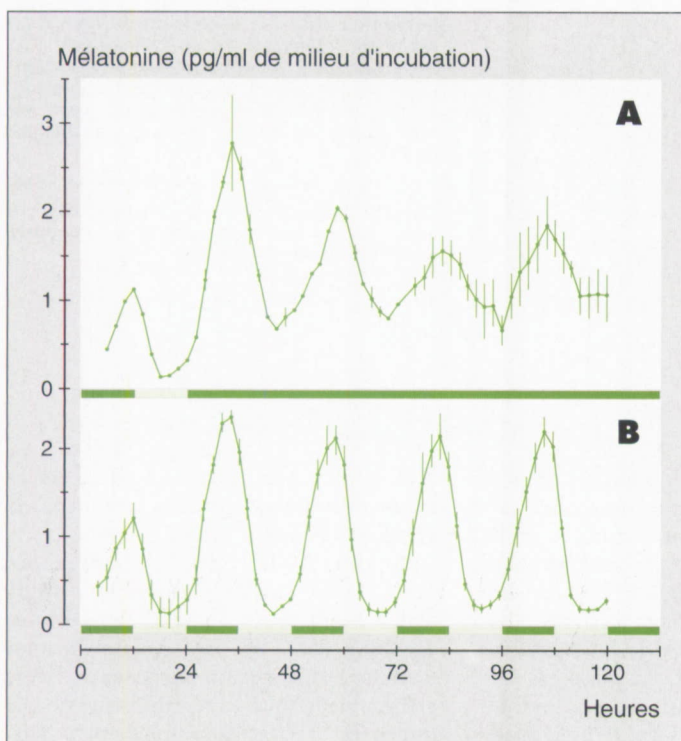


Figure 9. Sécrétion rythmique *in vitro* de mélatonine par des cellules dispersées de glande pinéale de poulet : (A) en obscurité constante, la persistance d'une période proche de 24 heures témoigne de l'existence d'une horloge circadienne dans les pinéaloctes ; (B) sous un cycle lumineux LD 12 : 12, le rythme endogène est entraîné par l'alternance jour/nuit grâce à la présence des photorécepteurs pinéaliens [7].

Figure 9. Rhythmic secretion of melatonin *in vitro* by isolated cells of the pineal gland of a chicken.

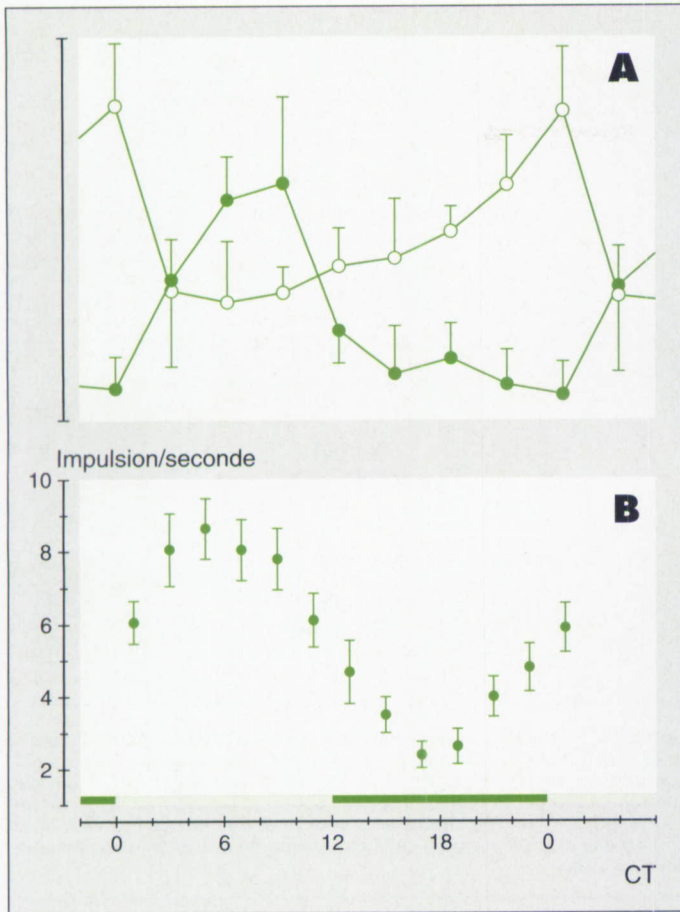


Figure 10. Rythmes circadiens dans les noyaux suprachiasmatiques du rat maintenus *in vitro* : (A) de la synthèse protéique (O) mesurée par l'incorporation de leucine tritiée, du métabolisme oxydatif (●) mesuré par celle de 2-désoxy-glucose marqué au carbone C¹⁴ ; (B) de l'activité électrique spontanée [8, 9].

Figure 10. Circadian rhythms in rat suprachiasmatic nuclei kept *in vitro*.

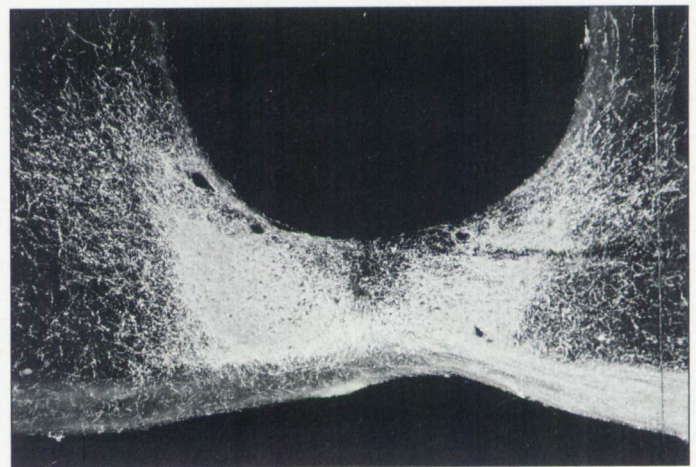
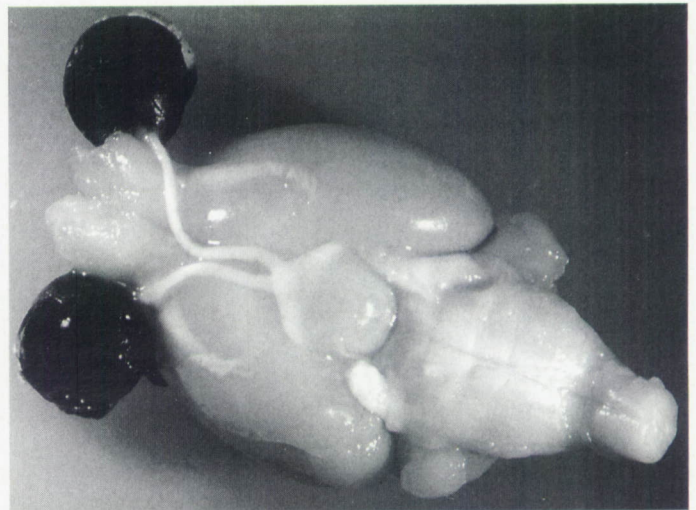


Figure 11. Photographie (A) de la face ventrale du cerveau de hamster montrant les yeux, les nerfs optiques, le chiasma optique et les tractus optiques. Les fibres rétinienne du tractus hypothalamique quittent le tractus optique au niveau du chiasma pour pénétrer dans les noyaux suprachiasmatiques ; (B) des projections rétinienne composant le TRH dans les NSC d'un hamster. Un traceur, ici la sous-unité B de la toxine cholérique couplée à la peroxydase du raifort, injecté dans la chambre antérieure de l'œil est capté par les cellules ganglionnaires et migre, grâce au transport axonal, jusqu'à leurs terminaisons dans les NSC (cliché A : J. Servière, cliché B : I. Chambille).

Figure 11. Photograph of the ventral surface of the hamster brain showing the eyes, optic nerves, chiasma and tracts (A) ; and retinal projections making up the TRH of the suprachiasmatic nuclei in a hamster (B).

no-hypothalamique (TRH), et une voie indirecte après un relais dans les corps genouillés latéraux.

Le TRH, formé par les axones d'un petit contingent de cellules ganglionnaires, est inclus dans le nerf optique et le quitte au niveau du chiasma optique pour pénétrer dans les NSC (figure 11). Après énucléation des globes oculaires ou section des nerfs optiques en amont du chiasma, le signal photique ne peut plus atteindre les NSC, l'entraînement de l'horloge par l'alternance jour/nuît est alors supprimé. Au contraire, si les tractus optiques sont

sectionnés en aval du chiasma, l'entraînement par la lumière subsiste, montrant ainsi que le tractus rétinio-hypothalamique est nécessaire à la transmission du signal photique.

Quelques séquences de la transmission du signal photique vers l'horloge commencent à être connues, mais il manque encore beaucoup de maillons à la chaîne des événements qui permettent l'entraînement de l'horloge par la lumière et donc des rythmes qu'elle contrôle :

- le neurotransmetteur principal du tractus rétinio-hypothalamique est un petit

peptide, le N-acétyl-aspartylglutamate, qui fait partie d'un groupe majeur de neurotransmetteurs, les acides aminés excitateurs. Du glutamate a été mis en évidence par immunocytochimie dans les boutons présynaptiques des terminaisons rétinienne dans les NSC. De plus, l'injection d'un antagoniste des récepteurs de ce peptide avant un flash inhibe le changement de phase du rythme d'activité qui aurait dû suivre ;

- l'exposition à la lumière induit des modifications au niveau des NSC. En particulier, un flash peut induire

Figure 12. Effet de la lumière, chez le rat, sur l'induction des gènes *jun-B* et *c-fos* ; (A) un flash à CT 18 (nuit subjective) provoque l'apparition de la protéine dans les noyaux des cellules des NSC ; (B) NSC d'un animal témoin. Déphasage de l'activité locomotrice (C) et induction des ARN messagers de *jun-B* (D) et de *c-fos* (E) par un flash à TC 14, 19 et 21 [1, 11].

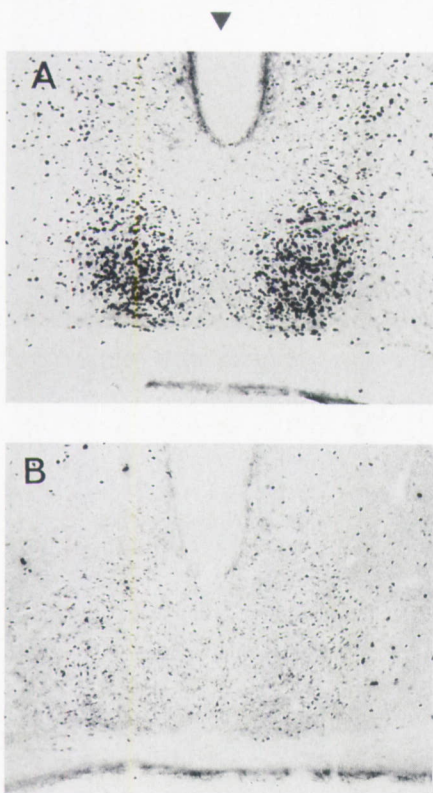


Figure 12. Effect of light on the induction of *jun-B* and *c-fos* genes in the rat.

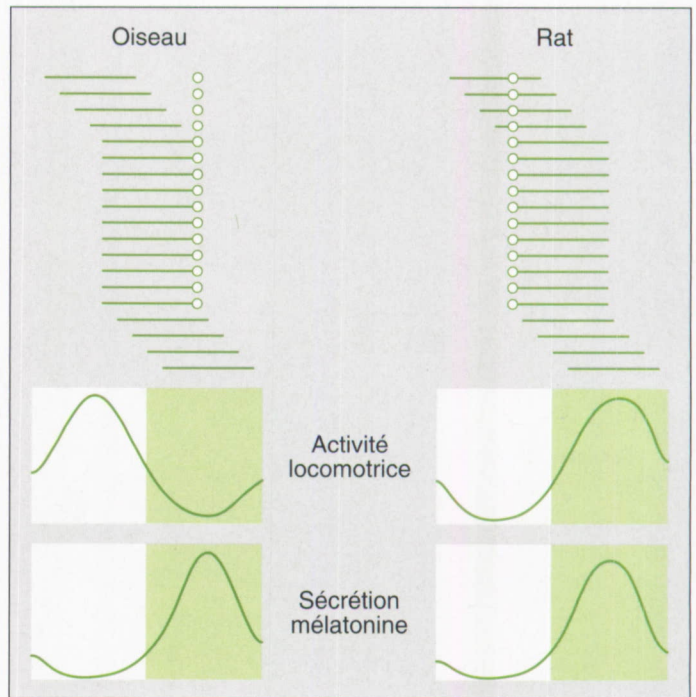
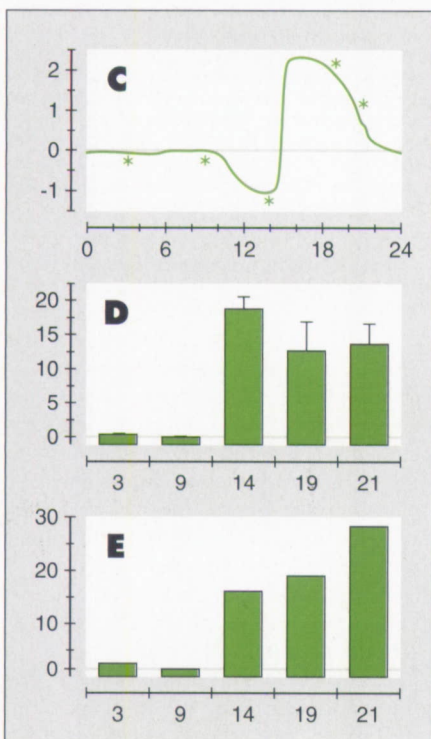


Figure 13. Entraînement des rythmes circadiens d'activité chez l'oiseau et le rat, mis en conditions de libre cours, par des injections quotidiennes de mélatonine (o) à 24 heures d'intervalle. La phase de l'entraînement par la mélatonine correspond à la phase du cycle d'activité (début de l'activité chez une espèce nocturne, fin de l'activité chez une espèce diurne) et non à celle du rythme de sécrétion de la mélatonine [14, 15].

Figure 13. Entrainment of circadian rhythm of activity in the bird and the rat under free-running conditions by daily injections of melatonin at 24-hour intervals.



l'expression de plusieurs gènes d'expression précoce tels que *c-fos* (figures 12A, 12B) ou *jun-B*. La concordance entre le moment où la lumière induit l'expression de ces gènes et un changement de phase du rythme d'activité suggérerait que ces gènes pourraient être impliqués dans le mécanisme moléculaire à l'origine des changements de phase de l'horloge (figures 12C, 12D, 12E), ce qui vient d'être démontré : si on bloque l'expression de *c-Fos* et *Jun-B*, normalement induite par un flash, par des oligonucléotides antisens, on inhibe aussi le changement de phase du rythme d'activité [12]. Les produits de transcription de ces gènes pourraient à leur tour induire des gènes d'expression tardive responsables de la synthèse de neuropeptides par

exemple ; en effet, nous venons de montrer au laboratoire que, chez le hamster, après une stimulation lumineuse pendant la nuit, quelques neurones contenant le peptide intestinal vasoactif (VIP) ou le peptide de libération gastrique (GRP) coexpriment *c-Fos* [13].

L'implication présumée des gènes d'expression précoce dans le mécanisme d'entraînement de l'horloge par la lumière est confortée par plusieurs observations :

- la zone d'apparition des cellules immunoréactives pour la protéine Fos à la suite d'un flash se superpose au champ terminal des projections rétinienne (figures 11B, 12A) ;
- l'injection d'un antagoniste des récepteurs du glutamate avant un flash pen-

– l'addition de glutamate, le neurotransmetteur présumé des projections rétiniennes, dans le milieu d'incubation de NSC maintenus en survie pendant plusieurs jours induit l'apparition de la protéine c-Fos, ceci uniquement pendant la nuit subjective, vraisemblablement *via* une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire libre.

Parmi les nombreux peptides mis en évidence dans les NSC par hybridation *in situ* et par immunocytochimie, certains présentent des variations qui persistent en absence d'entraînement par la lumière : c'est le cas de la vasopressine. Pour d'autres, comme le VIP, les variations observées au cours du nyctémère disparaissent en obscurité permanente. Le rôle éventuel de ces peptides dans le fonctionnement de l'horloge reste largement incompris. Le VIP pourrait intervenir au niveau de l'entrée du signal photique et, donc, participer à l'entraînement de l'horloge. La vasopressine, qui présente un rythme circadien très précis dans le liquide céphalo-rachidien, pourrait intervenir à la sortie de l'horloge en transmettant des signaux rythmiques vers des oscillateurs asservis ou directement vers les effecteurs périphériques.

Les oscillateurs secondaires, asservis à l'horloge

• **Chez les oiseaux**, ce sont les NSC qui joueraient le rôle d'oscillateurs secondaires asservis à la glande pinéale. La sécrétion rythmique de mélatonine constitue la sortie, les « aiguilles » de l'horloge, et il est vraisemblable que la « lecture de l'heure » se fasse au moins en partie au niveau des NSC qui possèdent une forte densité de récepteurs à la mélatonine. En effet, il est possible d'entraîner les rythmes d'activité chez un oiseau pinéalectomisé par des injections quotidiennes de mélatonine (figure 13). Cependant, les NSC reçoivent aussi des signaux photiques directs en provenance de la rétine comme chez les mammifères. L'importance relative de la transmission des signaux photiques *via* la glande pinéale ou directement vers les NSC reste mal établie. Les NSC pourraient aussi jouer le rôle d'un oscillateur primaire couplé et non totalement asservi à la glande pinéale, ce qui reste à démontrer.

• **Chez les mammifères**, la glande pinéale constitue un oscillateur secondaire asservi aux NSC qui lui imposent leur rythme. Pendant le jour (réel ou subjectif), l'activité électrique spontanée des NSC inhibe la libération de noradrénaline par les terminaisons du nerf pinéalien ; pendant la nuit, lorsque cette activité diminue, la fixation de la noradrénaline sur ses récepteurs stimule la synthèse de mélatonine (figure 8). Bien que la glande pinéale ne soit pas un oscillateur primaire auto-entretenu, la sécrétion rythmique de mélatonine exerce un rétrocontrôle sur le fonctionne-

ment des NSC. Comme chez les oiseaux, il est possible d'entraîner des rythmes désynchronisés ou en libre cours par des injections programmées de mélatonine (figure 13). La présence de récepteurs à la mélatonine dans les NSC et la disparition de l'entraînement des rythmes par la mélatonine chez des rats à NSC lésés plaident en faveur d'une action directe de l'indolamine sur les NSC. Les schémas présentés dans la figure 14 résument l'état actuel de nos connaissances sur le système circadien des oiseaux et des mammifères tels qu'ils ont été décrits de manière très simplifiée

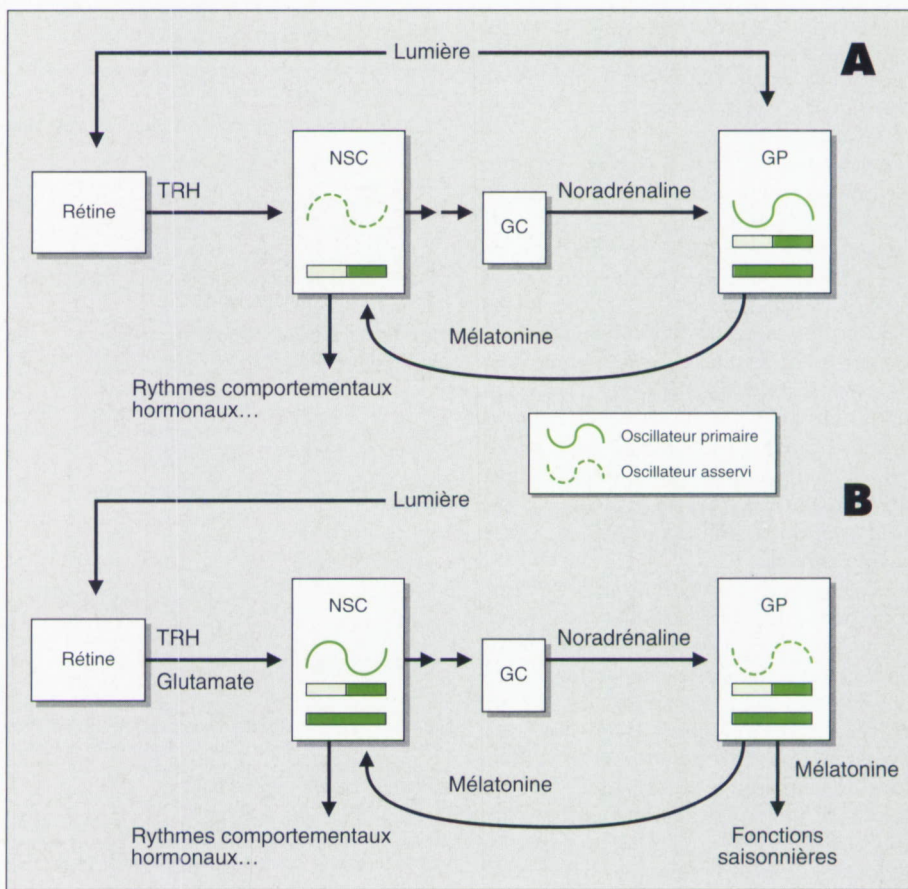


Figure 14. Représentation schématique du système circadien : (A) chez l'oiseau, l'oscillateur circadien contenu dans la glande pinéale est entraîné par la lumière directement *via* les photorécepteurs pinéaliens et indirectement *via* le tractus rétino-hypothalamique (TRH), les noyaux supra-chiasmatiques (NSC) et les ganglions cervicaux supérieurs (GC). C'est la sécrétion rythmique de mélatonine par la glande pinéale qui entraîne à son tour les NSC d'où partent les signaux nerveux ou neuroendocriniens vers les effecteurs ; les NSC, dont on ne sait pas s'ils sont capables d'osciller de façon autonome, reçoivent aussi une information photique directe *via* la rétine et le RHT ; (B) chez le mammifère, les NSC, sièges de l'oscillation circadienne, sont entraînés directement par la lumière *via* la rétine et le RHT. Parmi les signaux rythmiques émis par les NSC, celui atteignant la glande pinéale *via* les GC va induire la sécrétion rythmique de mélatonine qui exerce une double fonction, à savoir un rétrocontrôle sur l'oscillateur circadien et une mesure de la durée du jour utilisée par les effecteurs à activité saisonnière.

Figure 14. Diagram of the circadian system in the bird and in the mammal.

dans cette revue. Ces schémas n'expliquent pas ce qui se passe en aval des NSC. La machinerie cellulaire, nerveuse ou neuro-endocrinienne qui permet à l'horloge de transmettre l'oscillation circadienne à l'ensemble de l'organisme reste pratiquement inconnue.

Conclusion

Récurrence et prédictibilité sont deux caractéristiques des rythmes solaires. Depuis Claude Bernard, on sait que la constance du milieu interne est nécessaire au maintien de la vie. Or, l'ensemble des observations sur l'organisation temporelle des êtres vivants, qui montre en réalité une plasticité récurrente du fonctionnement cellulaire, doit élargir le concept de l'homéostasie à celui d'une homéostasie prédictive.

L'intérêt des recherches sur les rythmes circadiens et sur l'horloge qui les génère est multiple. En effet, elles montrent, comme toutes les études de chronobiologie, la dimension biologique du temps et, par là même, elles sont nécessaires pour pallier les dysfonctionnements de la synchronisation interne de l'organisme ou pour faciliter l'adaptation, si nécessaire, de l'individu à un nouvel environnement. L'horloge circadienne participe également à la mesure photopériodique du temps qui permet à l'organisme de se préparer en synchronie avec le cycle solaire annuel.

Chez l'homme, l'organisation du système circadien et les réponses à la lumière sont identiques à ce qui vient d'être décrit chez les mammifères. Les perturbations des rythmes du sommeil lors de voyages transcontinentaux en sont un bon exemple ; les courbes de réponse à la lumière entraînant une avance ou un retard de phase des rythmes en fonction du temps circadien en font une parfaite démonstration expérimentale [16].

Les contraintes économiques et sociales (voyages transcontinentaux, travail à horaires variables), de nombreuses pathologies liées au vieillissement ou à certaines formes de cécité peuvent conduire

à un dysfonctionnement de l'organisation circadienne. Le rôle de la mélatonine, qui augmente le couplage entre le rythme de l'horloge circadienne et le synchroniseur externe, a retenu l'attention des cliniciens [17] et a suscité dans l'industrie pharmaceutique des recherches sur la synthèse de molécules chronobiotiques, agonistes ou antagonistes de la mélatonine, qui devraient être disponibles prochainement [18] ■

Bibliographie

Biological clocks. Symposia on quantitative biology. Cold Spring Harbor 1960 ; vol. 18.

Cassone VM. Melatonin : time in a bottle. *Oxford Rev Reprod Biol* 1990 ; 12 : 319-67.

Hall JC. Genetics of circadian rhythms. *Ann Rev Genet* 1990 ; 24 : 659-97.

Inouye SIT, Shibata S. Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res* 1994 ; 20 : 109-30.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM. *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. New York : Oxford University Press, 1991.

Meijer JH, Rietveld WJ. Neurophysiology of the circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev* 1989 ; 69 : 671-707.

Mick G, Jouvet M. Rythmes circadiens : leurs bases anatomiques, fonctionnelles et moléculaires. *Med Sci* 1995 ; 11 : 52-61.

Morin LP. The circadian visual system. *Brain Res Rev* 1994 ; 67 : 102-27.

Références

1. Chambille I, Doyle S, Servière J. Photic induction and circadian expression of Fos-like protein immunohistochemical study in the retina and suprachiasmatic nuclei of hamster. *Brain Res* 1993 ; 612 : 138-50.

2. Hartwig HG, Oksche A. Neurobiological aspects of extraretinal photoreceptive systems : structure and functions. *Experientia* 1982 ; 38 : 991-6.

3. Chambille I, Servière J. Neurotoxic effects of neonatal injections of monosodium L-glutamate on the retinal ganglion cell layer of the golden hamster : anatomical and functional consequences on the circadian system. *J Comp Neurol* 1993 ; 338 : 67-82.

4. Gaston S, Menaker M. Pineal function : the biological clock in the sparrow. *Science* 1968 ; 160 : 1125-7.

5. Zimmerman NH, Menaker M. The pineal : a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 ; 76 : 999-1003.

6. Klein DC, Auerbach DA, Namboodiri MA, Wheler GHT. Indole metabolism in the mammalian pineal gland. In : Reiter RJ, ed. *The pineal gland* (vol. 1). Boca Raton : CRC Press, 1981 : 199-228.

7. Robertson LM, Takahashi JS. Circadian clock in cell cultures. *J Neurosci* 1988 ; 8 : 12-30.

8. Shibata S, Hamada T, Tominaga K, Watanabe S. An *in vitro* circadian rhythm of protein synthesis in the rat suprachiasmatic nucleus under tissue culture conditions. *Brain Res* 1992 ; 584 : 251-6.

9. Shibata S, Moore RY. Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res* 1988 ; 438 : 374-8.

10. Lavielle M, Servière J. Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *NeuroReport* 1993 ; 4 : 1243-6.

11. Kornhauser JM, Nelson DE, Mayo KE, Takahashi JS. Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science* 1992 ; 255 : 1581-4.

12. Wollnik F, Brysch W, Uhlmann E, Gillardon F, Bravo R, Zimmermann M. Block of *c-Fos* and *Jun-B* expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci* 1995 ; 7 : 388-93.

13. Aïoun J, Peytevin J, Chambille I, Martinet L. Les neurones immunoréactifs au GRP et au VIP des noyaux suprachiasmaticques sont-ils directement impliqués dans la réception du signal photique chez le hamster syrien ? 2^e Colloque Soc Neurosci. Lyon, mai 1995, Abstr A30.

14. Gwinner E, Benzinger I. Synchronization of a circadian rhythm in pinealectomized European starlings by daily injections of melatonin. *J Comp Physiol A* 1978 ; 127 : 209-13.

15. Redman J, Armstrong S, Ng KT. Free-running activity rhythm in the rat : entrainment by melatonin. *Science* 1983 ; 219 : 1089-91.

16. Lewy AJ, Sack RL, Frederikson RH, Reaves M, Denney DD, Zielske DR. The use of bright light in the treatment of chronobiologic sleep and mood disorders : the phase response curve. *Psychopharmacol Bull* 1983 ; 19 : 523-5.

17. Lewy AJ, Ahmed S, Latham Jackson JM, Sack RL. Melatonin shifts human circadian rhythms according to a phase-response curve. *Chronobiol Int* 1992 ; 9 : 380-92.

18. Martinet L, Guardiola-Lemaitre B, Mocaër E. Entrainment of circadian rhythms of activity by S-20098, a melatonin agonist, is dose and plasma concentration dependent. *Pharmacol Biochem Behav* 1996 (sous presse).

Résumé

Les rythmes de 24 heures et d'un an observés dans la plupart des processus biochimiques, physiologiques et comportementaux ne résultent pas d'une réponse imposée par les variations de la durée d'éclairement, mais découlent d'un système interne de mesure du temps, le système circadien. Cette rythmicité endogène, inscrite dans le patrimoine génétique des êtres vivants, permet l'organisation de séquences temporelles des variations du milieu intérieur en vue d'une adaptation optimale aux changements de l'environnement. Trois étapes caractérisent le fonctionnement de ce système : en amont, la réception du signal photique ; au niveau central, l'intégration cellulaire de ce signal par un oscillateur (horloge circadienne) auto-entretenu, d'une période proche de 24 heures, intégration qui permet la synchronisation de l'oscillation endogène sur une période de 24 heures ; enfin, en aval, la réponse des systèmes effecteurs aux signaux de l'horloge qui modulent l'amplitude de leur activité sur son rythme propre, en situation d'isolement temporel (lumière ou obscurité constante), ou sur une période de 24 heures, en conditions naturelles d'éclairement. La propriété fondamentale des rythmes circadiens est leur possibilité de déphasage par une brève stimulation lumineuse dans un sens, avance ou retard, qui dépend du moment où elle est reçue au cours du cycle de 24 heures. Le balayage de la nuit par un tel flash a permis de tracer une courbe de réponse de phase dont l'allure est constante, quelle que soit l'espèce.

Chez les oiseaux, la photoréception se fait au niveau de la glande pinéale et de la rétine ; l'horloge circadienne est localisée dans la glande pinéale. Chez les mammifères, seule la rétine est photoréceptrice ; ce sont les noyaux supra-chiasmatisques (NSC) de l'hypothalamus qui servent de substrat à l'horloge. L'oscillation circadienne est une propriété de la cellule puisqu'elle est encore observée *in vitro* par des pinéaloctes isolés de poulet ou des neurones isolés de NSC de rat ; cependant, le mécanisme moléculaire à l'origine de l'oscillation circadienne reste incompris. En revanche, au moins chez les mammifères, la réception du signal photique par une population spécifique de cellules rétinienne met en jeu une cascade d'événements dont on commence à connaître quelques étapes : libération par les projections rétinienne au niveau des NSC d'un neurotransmetteur, le glutamate ; induction de gènes d'expression précoce puis, vraisemblablement, d'expression tardive codant pour des neuropeptides. Parmi les nombreuses sorties de l'horloge, seule celle permettant la synthèse rythmique de mélatonine par la glande pinéale est bien élucidée. La mélatonine, uniquement sécrétée pendant la nuit, exerce un rétrocontrôle sur l'horloge *via* des récepteurs de haute affinité et contrôle les fonctions saisonnières en informant l'organisme des variations annuelles de la durée du jour.