

# Les rythmes circadiens : implications médicales et zootechniques

---

Véronique Gayrard-Physiologie-ENVT

## **Introduction**

Les rythmes circadiens observés dans les processus physiologiques et comportementaux sont une donnée fondamentale de tous les êtres vivants. Ils reflètent la nécessité pour certains événements de se produire de façon optimale à un moment précis du jour.

La reconnaissance de la structure temporelle de l'organisme a des implications en médecine clinique en termes d'établissement des valeurs chronobiologiques de référence, de détection précoce de situations à risque et dans le cadre des approches thérapeutiques qui prennent en compte les variations temporelles des effets désirables et/ou indésirables d'un médicament.

Les rythmes circadiens sont à la base du processus de mesure de la durée du jour utilisé par les animaux photopériodiques pour adapter leur physiologie, en particulier la physiologie de la reproduction aux variations saisonnières de l'environnement climatique et trophique. Ces mécanismes physiologiques de mesure de la durée du jour ont des applications zootechniques dans le cadre de la maîtrise de la reproduction saisonnière des petits ruminants.

## SOMMAIRE

1. Physiologie des rythmes circadiens .....	3
1.1. Historique et propriétés des rythmes circadiens .....	3
1.1.1. Historique .....	3
1.1.2. Propriétés des rythmes biologiques.....	4
1.2. Synchronisation des rythmes circadiens.....	8
1.2.1. Les synchroniseurs .....	9
1.2.2. Libre cours des rythmes .....	10
1.2.3. Décalage de phase .....	11
1.2.4. Effet « masque ».....	11
1.3. Les mécanismes de la rythmicité : les horloges biologiques.....	12
1.3.1. L'horloge circadienne: .....	13
1.3.2. Mécanismes moléculaires de l'horloge.....	16
1.3.3. Entraînement de l'horloge moléculaire.....	21
1.3.4. Transduction des signaux de sortie de l'horloge.....	23
2. Rythmes circadiens et médecine clinique .....	26
2.1. Etablissements des valeurs de référence et détection des situations à risque	26
2.1.1. Facteurs de variation de l'expression des rythmes circadiens .....	26
2.1.1. Importance des variations circadiennes des paramètres biologiques dans l'établissement d'un diagnostic.....	29
2.1.3. Détection des situations à risque pour des maladies .....	31
2.2. Chronopharmacologie : concepts et mécanismes chronopharmacologiques	33
2.2.1. Historique et concepts .....	33
2.2.2. Mécanismes chronopharmacologiques .....	35
2.3. Rythmes circadiens et chronothérapie .....	40
3. Rythmes circadiens et physiologie saisonnière.....	43
3.1. Photopériodisme et mesure de la durée du jour.....	43
3.1.1. Système saisonnier .....	43
3.1.2. Modèles pour expliquer la mesure du temps.....	44
3.2. Contrôle photopériodique des rythmes saisonniers de reproduction.....	45
3.2.1. Contrôle photopériodique de la reproduction des ovins .....	45
3.2.2. Etats photoréfractaires.....	48
3.3. Rôle de la mélatonine chez les animaux photopériodiques.....	50
3.3.1. Contrôle de la sécrétion de mélatonine .....	50
3.3.2. Synthèse de la mélatonine et variations circadiennes et saisonnières.....	52
3.3.3. Les effets de la mélatonine.....	53

# 1. Physiologie des rythmes circadiens

## 1.1. Historique et propriétés des rythmes circadiens

---

### 1.1.1. Historique

L'existence de rythmes journaliers chez les plantes et les animaux est connue depuis très longtemps. Aussi loin qu'au 4<sup>e</sup> siècle avant JC, Androsthènes, scribe d'Alexandre le Grand avait noté que les feuilles de certains arbres s'ouvraient au cours de la journée et se refermaient au cours de la nuit. La première publication scientifique que l'on peut rattacher à l'existence d'une horloge biologique date de 1729. Un astronome français, Jacques d'Ortous de Mairan rapporta à l'Académie Royale des Sciences de Paris son observation des feuilles du mimosa. Il avait noté que les feuilles de cette plante s'ouvraient au cours de la journée et se fermaient au cours de la nuit et que ce rythme persistait lorsque la plante était maintenue dans l'obscurité, en l'absence de la donnée environnementale que constitue l'éclairement journalier. Bien qu'il ait été intéressé par ce phénomène botanique, il a poursuivi ses recherches en astronomie.

Trente ans s'écoulèrent avant que d'autres répètent son observation, en montrant que les mouvements foliaires n'étaient pas dus à des variations de la température ambiante. Il faudra attendre un siècle avant qu'Augustin de Candolle remarque, en 1832, que le rythme des mouvements foliaires avait une période un peu inférieure à 24h. Ces observations ont été ensuite généralisées par le botaniste et physiologiste allemand, Wilhem Pfeffer. Ces rythmes ont alors été considérés comme une curiosité botanique et n'ont pas été reconnus comme les produits d'un mécanisme de mesure du temps.

Dans les années 1920-1930, Carl Von Frish (éthologiste autrichien, prix Nobel en 1973) et son étudiante, Ingeborg Beling montrèrent que les abeilles ne butinent les fleurs qu'à des moments spécifiques. Ils entraînent des abeilles à visiter une station d'alimentation en nectar entre 16h00 et 18h00. Les abeilles ne visitaient la station qu'au cours de cette tranche horaire et continuaient à la visiter plusieurs jours après le retrait du nectar. Ils avaient également montré que la suppression des données environnementales comme l'éclairement journalier ne modifiait pas le comportement des abeilles qui obéissait à une programmation interne. Quelques décennies plus tard (années 50), Gustav Kramer prouvait l'existence d'une horloge biologique. Kramer

démontrait que les étourneaux qui dirigent leur migration sur le soleil étaient capables de compenser le mouvement apparent de notre étoile dans le ciel. Ainsi, placés dans une pièce munie d'un éclairage fixe, les étourneaux orientaient leur envol dans une direction qui variait progressivement avec l'heure, définie au préalable par des cycles jour-nuit artificiels et arbitraires par rapport au « vrai jour » et à la « vraie nuit ». Il a ainsi montré que l'horloge de l'animal était synchronisée par les données environnementales.

En 1952, Colin Pittendrigh démontra que, contrairement à la plupart des activités métaboliques, les mécanismes biochimiques de l'horloge n'étaient pas influencés par la température corporelle et que la période de l'horloge était indépendante de la température (« compensation de température »). Pittendrigh avait repris des travaux de Kalmus sur le rythme d'éclosion d'une espèce de mouche, *Drosophila pseudoobscura*. Chez *Drosophila pseudoobscura*, les éclosions n'ont lieu que pendant les cinq ou six premières heures du jour, ce rythme persiste en obscurité constante. Lorsque Kalmus avait accompagné l'extinction définitive des lumières d'une chute de température de 10°C, il avait observé que le pic d'éclosion suivant était retardé de 12 heures par rapport à des cultures maintenues à la température initiale. Il en avait conclu que la période du rythme d'éclosion passait de 24 à 36h. La suite de l'expérience reprise par Pittendrigh a montré que le second pic d'éclosion était beaucoup moins en retard que le premier et que le rythme reprenait ensuite avec une période quasi-inchangée, proche de 24h, ce qui montre la compensation de température. Pittendrigh montra également que l'heure des pics d'éclosion quotidiens dans l'obscurité constante pouvait être fixée au gré de l'expérimentateur, en fonction de l'heure à laquelle il éteignait définitivement la lumière. Cet article établissait ainsi les principales caractéristiques universelles de l'horloge dite circadienne (du latin circa, environ et dies, journée, pour indiquer qu'elle effectue un tour de cadran en à peu près 24h) : persistance en conditions constantes (« libre cours »), période déterminée génétiquement, sensibilité de la phase à des stimuli environnementaux (entraînement ou décalage de l'horloge) et compensation de température pour la période.

### **1.1.2. Propriétés des rythmes biologiques**

Un rythme représente une oscillation régulière récurrente, l'unité répétée et à laquelle le rythme se réfère est un cycle. Le temps nécessaire pour l'aboutissement d'un cycle

(c'est-à-dire l'intervalle de temps après lequel une phase distincte de l'oscillation est reproduite) correspond à la période (qui est la réciproque de la fréquence du rythme).

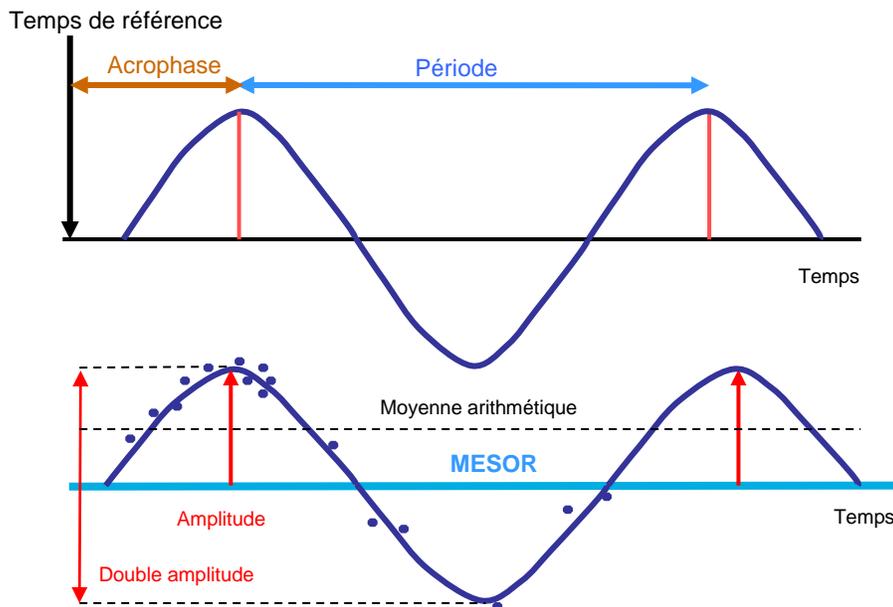
#### ▪ **Période des rythmes biologiques**

Les périodes des rythmes biologiques rencontrés en biologie et médecine varient entre la fraction de seconde (cycle d'un simple neurone), quelques secondes (cycles cardiaque activité électrique d'un muscle cardiaque. et respiratoires), quelques heures comme la période de certains rythmes (la mitose chez *Physarum* a une période d'environ 8 à 12 heures) à environ 24h.

Les variations périodiques de période inférieure aux variations circadiennes (hautes fréquences), les rythmes appelés ultradiens se surimposent aux rythmes circadiens du même paramètre. Les rythmes circadiens se surimposent à leur tour aux rythmes de plus longue période (ou faibles fréquences, appelés rythmes infradiens, qui incluent parmi d'autres, les rythmes qui ont une période de 1 semaine (rythmes circaseptan), les rythmes qui ont une période d'environ 30 jours (rythmes circatrigintan) les rythmes qui ont une période d'environ un an (rythmes circannuels et/ou variations saisonnières) : rythme de reproduction, de migration....

#### ▪ **Moyenne ajustée du rythme : MESOR**

La valeur moyenne d'un rythme pourrait être idéalement représentée par la moyenne de toutes les valeurs instantanées de la variable oscillante au cours d'une période. Cependant, pour les séries temporelles de données biologiques comme en médecine clinique, les mesures continues sont rarement faisables. Les données disponibles sont des données ponctuelles obtenues à des intervalles de temps souvent irréguliers. Dans ce dernier cas, la moyenne arithmétique ne représentera pas correctement le moyenne du rythme mais sera biaisée et déviée vers les valeurs observées dans la zone de la plus forte densité de mesures (figure 1). Si le rythme peut être défini et ajusté à un modèle mathématiques, une courbe sinusoïdale, une moyenne ajustée du rythme ou une estimation statistique de la moyenne du rythme (MESOR) est préférable. Le MESOR représente la valeur à mi-chemin entre les plus fortes et les plus faibles valeurs de la fonction sinusoïdale utilisée pour ajuster le rythme. Le MESOR sera égal à la moyenne arithmétique des données si et seulement si les données ont été obtenues à des intervalles de temps identiques au cours de la totalité du cycle.



**Figure 1 : Définition des paramètres d'une fonction rythmique ajustée aux données (sinusoïde).** MESOR, moyenne ajustée du rythme ; période, durée d'un cycle (exprimée en unités de temps) ; Amplitude, la moitié des changements prédictibles du rythme décrits par le modèle mathématique ou moitié de la différence entre le point le plus élevé et le point le plus bas du modèle mathématique ; acrophase, moment de l'occurrence de la valeur la plus élevée du modèle ajusté, en relation avec la phase de référence choisie par l'investigateur (minuit heure locale pour les rythmes circadiens) exprimé en unités de temps ou en degrés angulaires (négatifs) (une période =  $360^\circ$ ) dans le sens des aiguilles d'une montre par référence au temps zéro ( $0^\circ$ =la phase de référence).

#### ▪ Etendue d'un rythme ou amplitude

L'étendue d'une oscillation peut être exprimée par la différence entre le point le plus élevé et le point le plus bas de la période ou par son amplitude dans le cas où le rythme peut être défini par un modèle mathématique sinusoïdal (figure 1).

#### ▪ Organisation temporelle d'un rythme ou phase

L'ajustement temporel d'un rythme peut être exprimé par le moment de l'occurrence de sa valeur la plus élevée (pic) et celui de sa valeur la plus faible (vallée). Cependant, cette approche est sensible à l'effet des valeurs aberrantes et la localisation temporelle des valeurs pic et vallée doit être confirmée par l'étude de plusieurs cycles qui vont permettre d'estimer la variance de ces paramètres. Alternativement, la détermination mathématique de la phase du rythme par ajustement des données à un modèle approprié sera souvent préférable. La localisation temporelle du rythme est ainsi définie

par le point le plus élevé (acrophase) et le point le plus bas (bathyphase) du modèle ajusté, en relation avec la phase de référence choisie par l'investigateur (minuit heure locale pour les rythmes circadiens, le 1<sup>er</sup> janvier pour les rythmes circannuels). Le moment d'occurrence de la phase (l'acrophase) du rythme en relation avec la phase de référence est appelé l'angle de phase et est exprimé en unités de temps ou en degrés angulaires (une période =  $360^\circ$ ) dans le sens des aiguilles d'une montre par référence au temps zéro ( $0^\circ$ =la phase de référence, figure 2). Dans ce dernier cas, l'angle de phase est habituellement exprimé en degrés négatifs. La relation de phase entre 2 rythmes de même période est décrit par la différence d'angle de phase entre les phases des rythmes correspondants, e.g., l'acrophase du rythme du cortisol plasmatique à 7h00 ( $-105^\circ$ ) montre une différence d'angle de phase de 4h ( $60^\circ$ ) par rapport à l'acrophase du cortisol urinaire à 11h00. La différence d'angle de phase est positive si un rythme détermine la phase du suivant (sa phase correspondante a lieu plus tôt) ou un signe négatif si la phase d'un rythme est distancée par celle du rythme auquel il est comparé, e.g., le rythme du cortisol urinaire est distancé de 4h par celui du cortisol plasmatique ( $-60^\circ$ ). Un décalage de la phase vers une heure plus avancée du cycle mesuré est désigné comme une avance de phase et un décalage vers une heure plus tardive est désigné comme un retard de phase. Ainsi, plusieurs jours après un réveil matinal, l'acrophase du cortisol plasmatique est observée à 5h00, soit une avance de phase de 2h ( $+30^\circ$ ). A l'inverse, après plusieurs jours de grasses matinées, l'acrophase du cortisol plasmatique est observée à 9h00, soit un retard de phase de 2h ( $-30^\circ$ ).

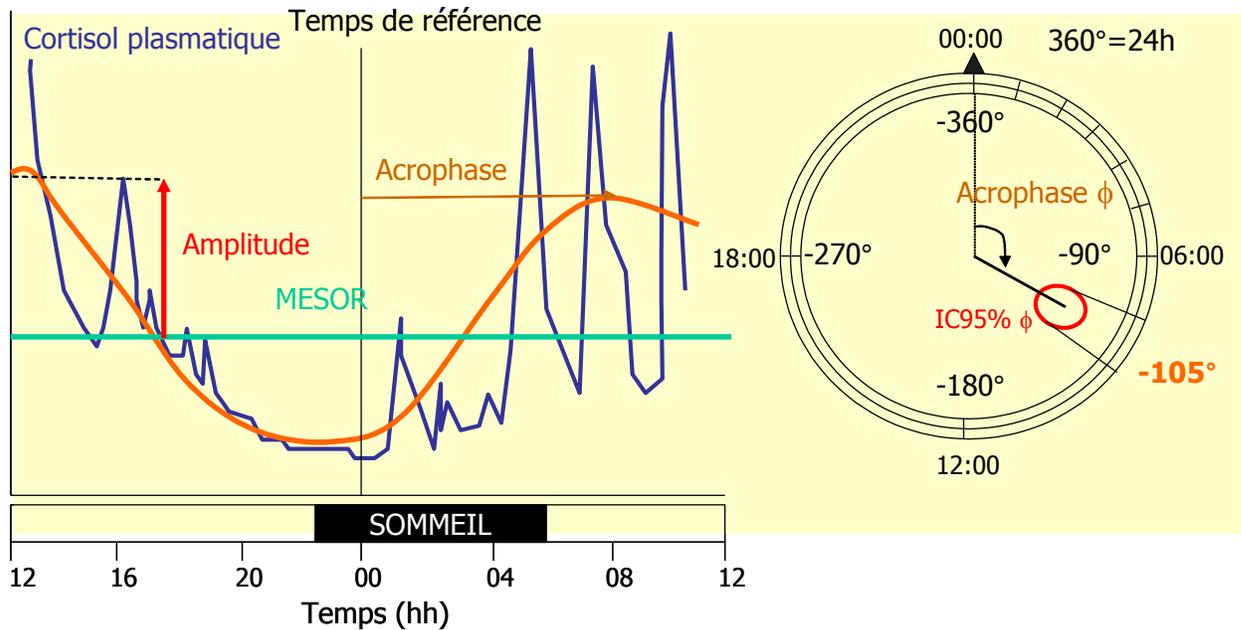


Figure 2 : **Description des paramètres d'un rythme** (concentrations plasmatiques en cortisol). A gauche, la courbe sinusoidale est ajustée et les paramètres du rythme sont déterminés comme le MESOR, l'amplitude et l'acrophase. Droite : représentation polaire. La période est figurée par un cercle, l'heure de référence est minuit au sommet du cercle. La direction du vecteur exprimée en degrés négatifs par rapport à la phase de référence indique l'acrophase, sa longueur donne l'amplitude. L'ellipse délimite l'intervalle de confiance à 95% de l'acrophase et de l'amplitude. L'acrophase du rythme du cortisol plasmatique se situe à 7h00, l'angle de phase est de  $-105^\circ$ .

## 1.2. Synchronisation des rythmes circadiens

La vie sur terre s'est développée dans un contexte rythmique. La rotation de la terre autour de son axe et autour du soleil avec ses alternances de lumière/obscurité, et chaleur/froid a depuis les premiers temps imprimé son organisation temporelle sur la matière vivante.

Ainsi, les changements rythmiques observés en biologie et médecine peuvent dans certains cas représenter une réponse aux changements rythmiques de l'environnement. Cependant, la plupart de ces rythmes dans le rang des fréquences circadiennes et quelques rythmes de fréquence ultradienne reflètent seulement en partie la réaction de l'organisme à un évènement périodique de l'environnement ; ils sont souvent en relation avec des processus périodiques génétiquement déterminés. Ces rythmes génétiquement déterminés (rythmes endogènes) sont maintenus après la suppression de toutes les informations périodiques environnementales comme des oscillations autonomes. La reconnaissance d'une composante endogène des rythmes nécessite la persistance du rythme dans des conditions constantes dans lesquelles toutes les

données temporelles environnementales ont été supprimées comme cela a été montré pour des sujets humains isolés dans des caves naturelles pour l'étude des rythmes circadiens. Dans ces conditions, la phase du rythme généralement dévie sensiblement mais de façon constante du cycle environnemental auquel il est habituellement entraîné (synchronisé), il évolue en libre cours par rapport au cycle synchroniseur. En revanche, les variations rythmiques directement imposées à l'organisme par des facteurs exogènes (température environnementale) vont disparaître quand la « driving force » sera supprimée.

Le terme « circa » (environ) est utilisé pour désigner l'imprécision des variations rythmiques des systèmes biologiques en comparaison avec leur contrepartie en physique. Bien que la plupart des rythmes soient génétiquement déterminés, ils sont continuellement modulés, modifiés et ajustés temporellement (entraînés ou synchronisés) par des événements périodiques environnementaux. Les cycles environnementaux géophysiques comme le cycle astronomique (jour/nuit) ou notre milieu social avec son alternance repos-activité ou éveil/sommeil, l'exposition à des stimuli lumineux, le moment de la prise alimentaire peuvent induire des réponses périodiques mais dans la majorité des cas, ils vont entraîner (synchroniser) les rythmes endogènes et déterminer leur organisation temporelle. L'entraînement d'une oscillation endogène implique que l'oscillation qui sert d'entraîneur (cycle jour/nuit) contrôle la phase du rythme entraîné (rythme biologique) qui tend à maintenir une certaine différence d'angle de phase avec ces oscillations environnementales. La fonction rythmique qui exerce un contrôle de la phase du rythme endogène est désignée comme le synchroniseur ou « zeitgeber ». Un rythme endogène ne peut être entraîné que vers des fréquences peu différentes de sa fréquence initiale. En dehors de ce «rang d'entraînement », au cours de l'exposition à une période environnementale inacceptable pour l'oscillateur endogène (cycles lumière/ obscurité de 8h ou 30h agissant sur un rythme circadien), le rythme ne sera pas synchronisé mais évoluera en libre cours avec sa propre fréquence qui peut toujours être modulée par des stimuli environnementaux.

### **1.2.1. Les synchroniseurs**

L'influence et l'importance des différents synchroniseurs comme la lumière, l'environnement social ou le moment de la prise alimentaire agissant sur les rythmes

endogènes peuvent varier d'un paramètre à l'autre. Plusieurs synchroniseurs peuvent à travers leur intervention déterminer l'organisation temporelle d'une fonction rythmique en relation avec son environnement et d'autres rythmes. Certains synchroniseurs peuvent exercer un effet dominant sur certains rythmes, ainsi, le moment de la prise alimentaire détermine l'organisation temporelle des rythmes circadiens de la prolifération cellulaire intestinale et de certains paramètres métaboliques mais intervient peu ou pas dans le contrôle du rythme circadien du nombre de lymphocytes circulants. Un changement de l'un des différents synchroniseurs peut conduire à des modifications de la relation temporelle entre les rythmes. De même, plusieurs synchroniseurs agissant sur le même paramètre rythmique peuvent perturber la relation temporelle habituelle entre ce paramètre et d'autres fonctions rythmiques et leurs synchroniseurs.

Sous l'influence « conflictuelle » de différents synchroniseurs, un composant du système circadien peut rester entraîné alors que l'autre est en libre cours. La structure temporelle humaine n'est pas nécessairement la même chez les sujets qui vivent dans des conditions environnementales différentes et selon les modes sociaux. Des stimuli environnementaux peuvent conduire à des altérations à court terme des paramètres mesurés qui ne persistent pas au-delà de la durée du stimulus (effet masque). Les rythmes de différentes fréquences qui caractérisent une variable physiologique sont soumis de façon permanente à de nombreux et quelquefois de façon compétitive à des synchronisateurs environnementaux et des stimuli « masquants ». Ainsi, une multitude de facteurs déterminent à tout moment le stade du cycle de l'organisme pour un paramètre donné et en fonction de ce stade, la susceptibilité aux agents environnementaux (chronesthésie).

### **1.2.2. Libre cours des rythmes**

Dans des conditions environnementales constantes, les rythmes circadiens ont une période proche de 24h et sont synchronisés entre eux. Cependant, au cours d'une exposition prolongée à de telles conditions, le rythme veille-sommeil peut brutalement s'allonger (28-30h ou plus) ou raccourcir (<22h) et se désynchroniser ainsi des autres rythmes qui continuent à évoluer en libre cours avec une période de 24h. Cette désynchronisation interne spontanée est observée plus fréquemment chez les sujets âgés suggérant le rôle adaptatif du maintien de la synchronisation interne, ce

mécanisme sous-jacent devenant déficient au cours du vieillissement. Les rythmes en libre cours peuvent également être observés dans différentes conditions cliniques.

### **1.2.3. Décalage de phase**

Les rythmes circadiens peuvent suivre le décalage de leur synchroniseur dominant non pas de façon abrupte mais après plusieurs cycles transitoires. Si plusieurs synchroniseurs agissent sur la période d'un rythme, ce rythme a tendance à suivre son synchroniseur dominant (régime lumineux) bien qu'il puisse être modifié dans son organisation temporelle par des synchroniseurs secondaires (moment de la prise alimentaire). La vitesse d'adaptation d'un rythme après un changement brutal de la phase des oscillations synchronisantes varie avec selon (i) la nature du rythme : le rythme circadien de la température corporelle et des corticostéroïdes plasmatiques s'adaptera à un décalage soudain de plusieurs heures de la phase du synchroniseur plus rapidement et avec moins de cycles transitoires que les rythmes circadiens de certains paramètres excrétoires (ii) l'amplitude du décalage de phase et (iii) sa direction. La phase d'adaptation après une avance de phase (vol transméridien vers l'Est), est plus longue que celle observée suite à un retard de phase (vol vers l'Ouest). La vitesse d'adaptation est aussi partiellement déterminée par l'intensité du synchroniseur : un stimuli lumineux intense (3000-10000 lux) va induire un décalage de phase plus rapidement que le régime lumineux habituel (1000 lux). Au cours de la phase d'adaptation, la relation de phase entre les rythmes qui ont différentes vitesses d'adaptation (rapides, lentes), sera altérée conduisant à une désynchronisation interne des rythmes. La relation de phase entre les rythmes est importante pour certaines fonctions, une perturbation transitoire peut avoir des manifestations cliniques comme le « jet lag » associé à une diminution des performances, des troubles du sommeil, des désordres gastro-intestinaux. Des tentatives d'accélération de la phase d'adaptation ont eu lieu avec des neodiazépines, la mélatonine, la lumière...

### **1.2.4. Effet « masque »**

Les stimuli environnementaux peuvent conduire à des altérations à court terme des paramètres rythmiques, leur durée n'excède pas celle du stimuli (effet masque). Ainsi un bain chaud peut altérer la température corporelle sans interagir avec le rythme circadien

de température. L'effet d'un stimuli externe va dépendre de sa nature et de son intensité mais également du moment où il est appliqué. Ces effets peuvent modifier voire supprimer l'expression du rythme circadien. Les mesures réalisées lors d'un examen clinique vont inclure les composantes endogènes du rythme et les effets « masque » des facteurs environnementaux. Il est donc essentiel de préciser les circonstances de l'obtention des mesures.

Un rythme circadien peut être masqué par des signaux environnementaux auxquels l'organisme est sensible indépendamment du potentiel effet entraîneur du signal lorsqu'il est donné périodiquement. Cependant, de nombreux stimuli environnementaux peuvent non seulement exercer un effet direct sur la variable rythmique mais agir également comme synchroniseur et ajuster l'organisation temporelle du rythme endogène. Vice versa, un stimuli qui sert de synchroniseur peut exercer un effet masque sur le même rythme et en plus de son ajustement de phase peut conduire à une amplification de l'amplitude circadienne due à l'effet masque. Ainsi, l'amplitude des rythmes circadiens de température, de pression sanguine, catécholamines et corticostéroïdes est plus importante chez un sujet au cours de son activité quotidienne qu'au cours du sommeil. Certains rythmes sont fortement affectés par la sommeil, comme la sécrétion de GH. Des tentatives ont été faites pour estimer la composante exogène d'un rythme circadien et de la soustraire du rythme observé pour révéler la composante endogène (modèles de régression) mais l'interprétation des résultats est difficile.

### ***1.3. Les mécanismes de la rythmicité : les horloges biologiques***

---

Les rythmes circadiens représentent un mécanisme de régulation ubiquitaire rencontré dans toutes les cellules eucaryotes et les organismes multicellulaires. La rythmicité circadienne a été à l'origine du concept d'horloge biologique.

L'origine génétique des rythmes circadiens a été démontrée pour la première fois chez les plantes. Chez le haricot, Bünning (1935) a montré que le rythme circadien du mouvement des tiges et des feuilles différait entre 2 types génétiques avec une périodicité de 23 vs 27h. Des expériences d'hybridation ont produit des plantes avec des caractéristiques hybrides et une période intermédiaire d'environ 25h. Ces études ont montré que les caractéristiques des rythmes sont transmises de génération en

génération selon les lois de la génétique. Les horloges ou pacemakers sont des oscillateurs primaires qui manifestent une oscillation endogène déterminée génétiquement de façon indépendante des données externes et qui fournit à l'organisme des signaux temporels qui synchronisent une multitude de rythmes dans le même rang de fréquence. Une des grandes avancées dans le domaine des neurosciences a été la localisation de l'horloge des mammifères dans une région de l'hypothalamus juste dorsale au chiasma optique et légèrement latérale par rapport au III<sup>e</sup> ventricule, le noyau suprachiasmatique, une structure bilatérale comportant 16 000 neurones chez le rat (figure 3).

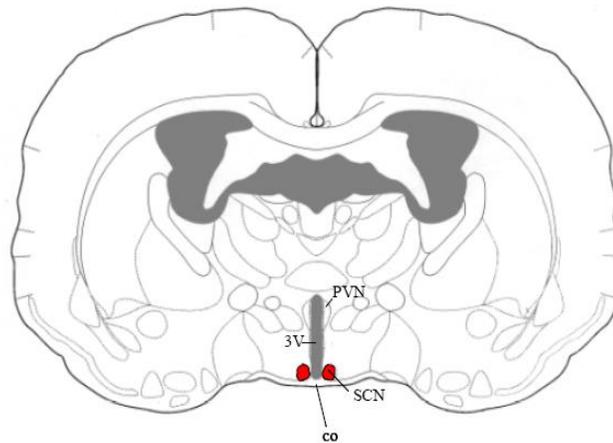


Figure 3 : **Localisation des noyaux suprachiasmatiques chez le hamster doré** (d'après Morin et Wood, 2001). 3V, troisième ventricule ; co, chiasma optique ; PVN, noyaux paraventriculaires hypothalamiques ; SCN, noyaux suprachiasmatiques.

Les noyaux suprachiasmatiques n'ont pas une structure homogène et peuvent être subdivisés en plusieurs parties en fonction du contenu en neuropeptides en une partie dorso-médiane (neurones à « Arginine vasopressin », AVP) et en une partie ventrolatérale (neurones à « Vasoactive intestinal peptide », VIP). D'autres neuropeptides sont exprimés comme le GRP (« Gastrin releasing peptide » dont les neurones se situent dans le SCN ventrolatéral; les neurones à somatostatine se situent entre le SCN ventrolatéral et le SCN dorsomédian. Des enregistrements d'activité électrique ont montré que l'activité spontanée des neurones du SCN est circadienne.

### **1.3.1. L'horloge circadienne:**

*Les propriétés de l'horloge des NSC : entraînement et libre cours*

Les rythmes d'activité des rongeurs de laboratoire peuvent être suivis et analysés, à l'aide de cages munies d'une roue à laquelle l'animal a un accès permanent. La roue est reliée à un système d'enregistrement informatique. Le schéma obtenu est appelé « actogramme » (figure 4) et permet d'évaluer les différents paramètres des rythmes d'activité locomotrice des rongeurs (période, amplitude, etc).

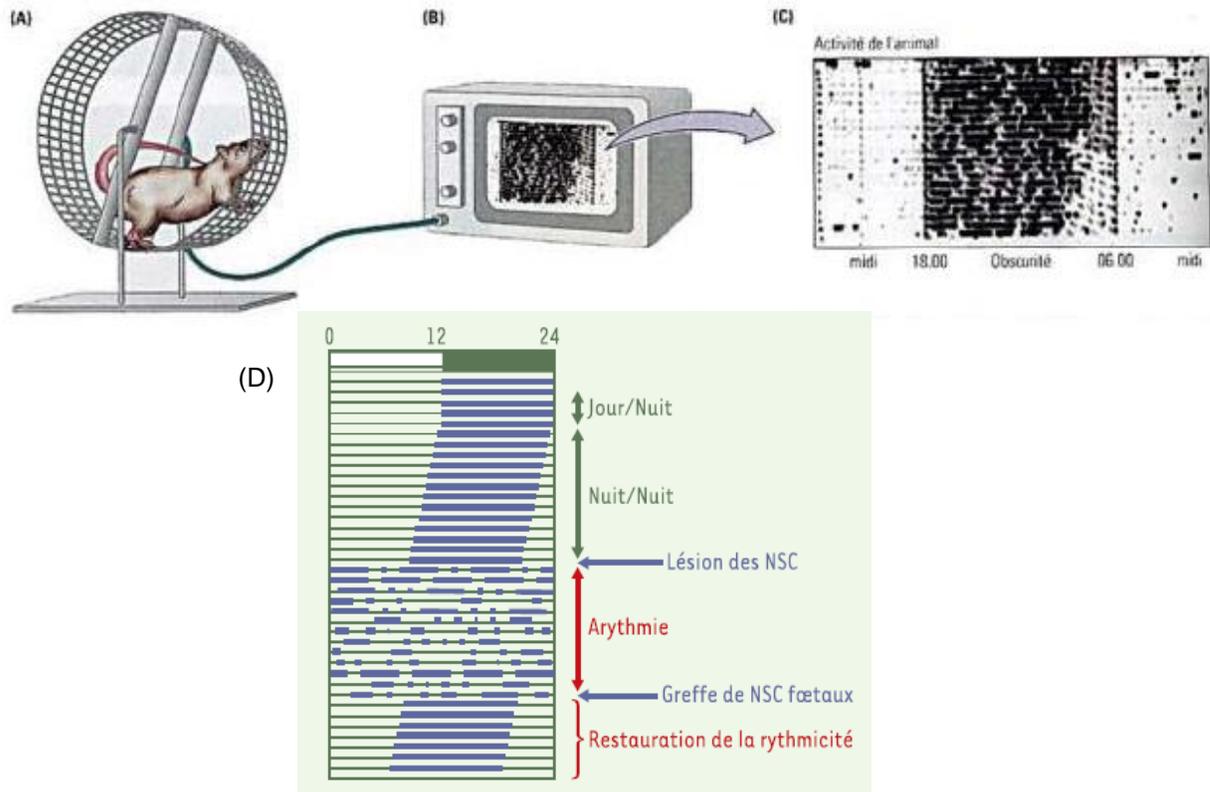


Figure 4 : **Rythme d'activité locomotrice des rongeurs : rôle des noyaux suprachiasmatiques.** (A) le rat a un accès libre à une roue d'activité (B) la roue est reliée à un système d'enregistrement informatique et les rotations de la roue sont enregistrées sous la forme d'un trait vertical (C) Le schéma obtenu est appelé « **actogramme** » : chaque ligne représente la répartition de l'activité de l'animal au cours de 24h. On constate que l'animal (ici un rongeur nocturne) est actif pendant la phase nocturne du nyctmère. (D) La barre supérieure de l'actogramme indique la condition (artificielle) journalière d'éclairage dans laquelle est maintenu le rongeur. Elle consiste en 12 heures de lumière (de 0 à 12, rectangle blanc) et 12h d'obscurité (de 12 à 24, rectangle vert). Lorsque l'animal maintenu dans ce régime d'alternance de 12 heures de jour et 12 heures d'obscurité (cinq premières lignes de cet actogramme), sa période d'activité dans la roue est limitée à la période nocturne. Au cours de chaque cycle, le début de l'activité coïncide très exactement avec le début de la nuit. Dans les conditions d'obscurité constante, l'activité reste organisée, avec des périodes de repos et d'activité. Toutefois, elle semble dériver vers la gauche ; chaque jour, ce rongeur se met à courir dans sa roue un peu plus tôt que la veille, on appelle cette dérive un « **libre-cours** ». La lésion des noyaux suprachiasmatiques (NSC) entraîne la perte d'une activité temporellement organisée. Enfin, la greffe de NSC fœtaux à un animal dont les NSC sont lésés permet de rétablir une activité temporelle organisée

Lorsque l'animal est maintenu dans un régime lumineux d'alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (cinq premières lignes de l'actogramme), sa période d'activité dans la roue est limitée à la période nocturne. Au cours de chaque cycle, le début de l'activité coïncide très exactement avec le début de la nuit. L'alternance de périodes de repos (durant le jour) et d'activité (durant la nuit) suit une période d'exactly 24 heures : on dit que cette activité est « entraînée » par l'alternance jour-nuit.. Dans les conditions d'obscurité constante, l'animal ne dispose plus de repère temporel. Dans ces conditions, l'activité demeure organisée, avec des périodes de repos et d'activité (rythme circadien). Toutefois, elle semble dériver vers la gauche ; chaque jour, ce rongeur se met à courir dans sa roue un peu plus tôt que la veille : on appelle cette dérive un « libre-cours ». On parle alors de **nuit subjective** (actif) et de **jour subjectif** (au repos) pour l'animal. *La période de l'horloge interne de l'animal, ou période en libre cours (t), est habituellement un peu en dessous ou au dessus de 24 h.*

Elle démontre que l'animal possède un système endogène de mesure du temps, dont la période est légèrement différente de 24 heures (ici, inférieure à 24 heures). L'activité locomotrice, comme tous les autres rythmes, d'ailleurs, requiert donc des « donneurs de temps » (principalement la lumière) afin d'assurer une synchronisation exacte avec les cycles extérieurs de 24 heures. La lésion des noyaux suprachiasmatiques (NSC) entraîne la perte d'une activité temporellement organisée, démontrant ainsi que les NSC constituent le substrat neuro-anatomique de la rythmicité. Enfin, la greffe de NSC foetaux à un animal dont les NSC sont lésés permet de rétablir une activité temporelle organisée. Les oscillations circadiennes intrinsèques des neurones NSC ont été mises en évidence ainsi que le déterminisme génétique de la période des oscillations. Une lésion bilatérale des NSC perturbe plusieurs mais pas la totalité des rythmes circadiens.

*L'horloge interne principale des mammifères est située dans le noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus, dans le cerveau. Le NSC est composé de quelques milliers de neurones, dont le rôle est de générer, entretenir et contrôler les rythmes circadiens physiologiques. Un animal dont le NSC est détruit perd tout rythme circadien d'activité en obscurité constante; la rythmicité peut lui être redonnée en lui greffant le NSC d'un autre animal. Le NSC est donc bel et bien l'horloge endogène. L'animal avec une lésion du NSC a cependant des rythmes circadiens d'activité en*

*alternance lumière/obscurité: ceux-ci dépendent directement des cycles de lumière (phénomène de masque).*

### **1.3.2. Mécanismes moléculaires de l'horloge**

L'existence de mécanismes moléculaires à la base du système circadien a été suggérée initialement par la simple observation de Konopaka et Benzer (1971) selon laquelle l'activité locomotrice rythmique de la drosophile (*melanogaster*) est héritable et peut être altérée par mutagenèse. A partir de mouches présentant des cycles d'activité locomotrice de période différente, les auteurs ont identifié le premier mutant de l'horloge circadienne *D. melanogaster* en 1971 qu'ils ont appelé « Period ». Trois gènes « Period » (Per) ont été clonés, chacun d'eux code pour des facteurs de transcription et la mutagenèse dirigée chez la souris a permis l'identification d'un facteur de transcription supplémentaire de la « basic helix-loop-helix (bHLH)-Period -Arnt-Single-minded (PAS) family dans la partie positive « limb » de l'horloge. L'observation de l'accumulation et de la disparition de la protéine PER suite à sa transcription a conduit Hardin et al. (1990) à proposer que le mécanisme central de l'horloge implique une boucle de rétrocontrôle transcription-traduction.

La compréhension des bases moléculaires de la rythmicité circadienne a connu un formidable essor au cours de ces dix dernières années. Une dizaine de gènes sont impliqués dans la génèse et la distribution des messages rythmiques et sont qualifiés de "gènes horloges". Les produits de ces gènes forment des boucles d'autoactivation et d'autoinhibition transcriptionnelles et traductionnelles permettant ainsi la formation de messages rythmiques sur une période d'environ 24h. Ces boucles sont hautement régulées tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau post-traductionnel. D'autres gènes, les "gènes contrôlés par l'horloge" (CCG, clock controlled genes), ont une transcription dépendante des gènes horloges et forment la voie de sortie des messages rythmiques. Les gènes horloges sont exprimés aussi bien au sein de l'horloge principale que sont les SCN qu'en périphérie.

Les interactions entre les produits des gènes horloges permettent l'apparition de trois boucles moléculaires qui sont soit activatrice (une boucle positive) soit inhibitrices (deux boucles négatives) de la transcription. C'est essentiellement à partir de la création

d'animaux mutants pour ces gènes, que leur implication dans la rythmicité circadienne, a pu être démontrée et caractérisée.

Une représentation schématique et simplifiée des boucles de régulation est donnée dans la figure 5.

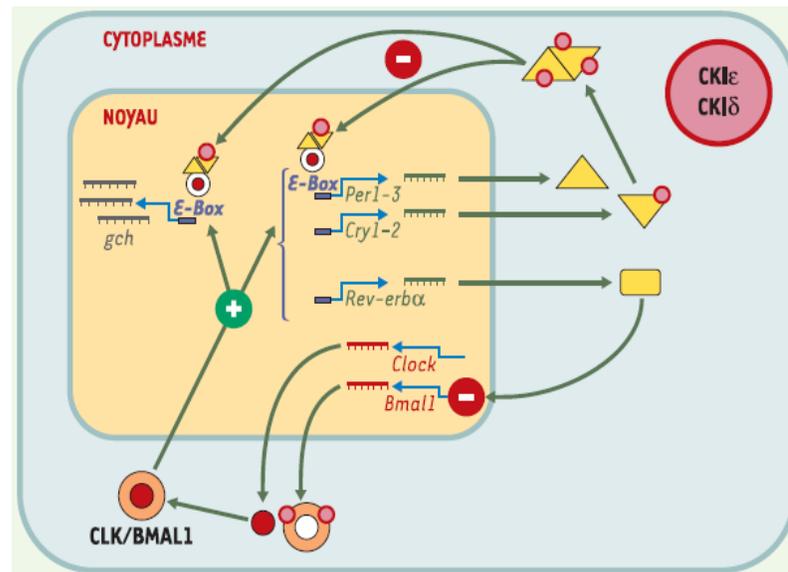


Figure 5 : **Modèle des boucles moléculaires de régulations transcriptionnelles et traductionnelles des gènes de l'horloge.** gène *Clock* ("Circadian locomotor output cycles kaput"), gène *Bmal1* ("Brain and muscle ARN-t like protein 1"); CLK, protéine CLOCK ; CLK/BMAL1 : dimère CLOCK/BMAL1, *Per1-3*, gènes *Period* (3 gènes); *Cry1-2*, gènes codant des flavoprotéines, les Cryptochromes (2 gènes) ; gène *Rev-erba* ; *gch* : gènes contrôlés par l'horloge.

L'hétérodimère CLK/BMAL1 est transloqué dans le noyau où il agit comme stimulateur de la transcription et gènes possédant des séquences E-box dans leur promoteurs, incluant les gènes *Per* et *Cry* et *Rev-erba*. Les protéines PER et CRY forment à leur tour des complexes, sont transloquées dans le noyau et peuvent inhiber la transcription induite par CLK/BMAL1, et donc leur propre expression. La transcription de *Rev-erba* est augmentée par le dimère CLOCK/BMAL1 et en retour, REV-ERBα inhibe celle de *Bmal1*. Les translocations nucléaires ainsi que la stabilité des dimères sont dépendantes de modifications post-traductionnelles, en particulier de phosphorylations par diverses kinases (notamment les caséine kinases (CK)  $\epsilon$  et  $\delta$ ). Le dimère CLK/BMAL1 stimule également la transcription de nombreux autres gènes contenant des E-box ; ces gènes sont dits contrôlés par l'horloge (*gch*) et assurent les sorties physiologiques de celle-ci

La boucle de régulation positive fait intervenir le gène *Clock* ("Circadian locomotor output cycles kaput"). L'expression du gène *Clock* dans les SCN est arythmique en alternance lumière/obscurité comme en obscurité constante chez le rat et la souris mais est rythmique chez le mouton. En revanche, dans le foie, son expression est dépendante du temps. Les souris mutantes pour ce gène (*Clock<sup>mut</sup>*, mutation par délétion) présentent des niveaux faibles d'ARNm de tous les autres gènes horloges

montrant ainsi l'implication du gène *Clock* dans la régulation positive de la transcription des gènes de horloge. Le second gène de cette boucle est le gène *Bmal1* ("Brain and muscle ARN-t like protein 1"). Contrairement au gène précédent, l'expression de *Bmal1* est rythmique, tant au niveau des messagers qu'au niveau protéique, dans les SCN comme en périphérie. Dans les SCN, les pics de présence d'ARNm et de protéine se situent de nuit. Les deux protéines de la boucle positive appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH ("basic helix loop helix") à domaines PAS ("Period-Arn-sim"). Ces séquences permettent la fixation à l'ADN et leur dimérisation, respectivement. Après que ces protéines se soient hétérodimérisées, il en résulte un complexe qui peut reconnaître une séquence particulière de l'ADN appelée E-box, de séquence 5'-CACGTG-3'. Ainsi, les protéines CLOCK et BMAL1 nouvellement formées se dimérisent pour se fixer à l'ADN et provoquer une augmentation de l'activité transcriptionnelle de l'ensemble des autres gènes horloges et des CCG contrôlés par une E-Box (figure 5). Les séquences bHLH et PAS sont donc essentielles au fonctionnement des dimères CLOCK/BMAL1.

La première boucle négative est constituée par la famille des gènes *Period* (*Per*) et par des gènes codant des flavoprotéines, les *Cryptochromes* (*Cry*). Trois gènes *Pers* et deux gènes *Crys* sont décrits chez la plupart des mammifères (l'homme présente un quatrième gène *Per*). Les gènes *Pers* sont exprimés aussi bien dans les SCN qu'en périphérie et présentent des valeurs maximales d'ARNm décalées entre-eux dans le temps. La construction de souris transgéniques avec le promoteur de *Per1* couplé à la luciférase (*Per1:LUC*) ont permis de mettre en évidence les variations circadiennes de présence des ARNm de *Per1* in vivo, en suivant les mêmes animaux tout au long de la journée. Les PERs, tout comme CLOCK et BMAL1, sont des protéines à domaines PAS et présentent des maximum de présence, quelques heures après les pics d'ARNm.

Dans le cas des gènes *Crys*, une expression rythmique de *Cry1* a été décrite avec un pic d'ARNm à la transition jour/nuit chez différentes espèces alors que pour *Cry2*, des différences entre les études réalisées chez une même espèce existent. Les protéines CRYs présentent des valeurs maximales à la transition jour/nuit. Les protéines PER et CRY forment des complexes PER1,2,3/CRY1,2 qui pourront pénétrer dans le noyau où ils peuvent inhiber leur propre transcription en diminuant la transactivation due à

CLOCK/BMAL1. La démonstration de la présence d'une seconde boucle négative est plus récente que celle des autres boucles. Certains résultats laissaient déjà supposer son existence en montrant que PER2, en plus de l'inhibition de sa propre transcription, pourrait activer celle de Bmal1. Cet effet n'est pas direct et fait intervenir le gène Rev-erba. La transcription de Rev-erba est augmentée par le dimère CLOCK/BMAL1 et en retour, REV-ERBa inhibe celle de Bmal1 par l'intermédiaire des séquences ROREs ("REV-ERBa / ROR Response element") situées sur le promoteur de Bmal1. Nous avons vu précédemment que les hétérodimères PERs/CRYs inhibent la trans-activation due à CLOCK/BMAL1 donc aussi celle de Rev-erba. Ainsi, PER2 active indirectement la transcription de Bmal1, en inhibant celle de Rev-erba, ce qui diminue les quantités de REV-ERBa qui, elle, inhibe la transcription de Bmal1. En quelque sorte, il y a une levée d'inhibition de la transcription de Bmal1. Les translocations nucléaires ainsi que la stabilité des dimères sont dépendantes de modifications post-traductionnelles, en particulier de phosphorylations par diverses kinases (notamment les caséine kinases (CK) Iε et Iδ).

En résumé de cette description des principaux acteurs moléculaires, le fonctionnement nyctéméral des boucles suivrait le schéma temporel suivant : en début de jour, les dimères CLOCK/BMAL1 présentent leur niveau de fixation maximale à l'ADN et entraînent ainsi la transcription des gènes Per1 et Rev-erba, puis Per3, puis Per2 et, en fin de jour, celles de Cry1 et de Cry2. Les protéines formées s'accumulent dans le cytoplasme et peuvent être phosphorylées, par la caséine kinase Iε ce qui entraîne leur dégradation. Les séquences temporelles des localisations nucléocytoplasmiques précises des protéines horloges sont assez controversées mais, il semble clair que, suite à leur hétérodimérisation, les complexes PERs/CRYs pénètrent dans le noyau. Le mécanisme d'entrée dans le noyau est encore peu connu mais pourrait faire intervenir des importines α au moins pour CRY2. Une fois dans le noyau, les protéines horloges de la première boucle négative inhibent leur propre transcription en bloquant l'action des dimères CLOCK/BMAL1. On peut dire que les dimères CLOCK/BMAL1 sont activateurs de la transcription mais que les trimères CLOCK/BMAL1/CRY1 en sont inhibiteurs. Cet effet d'inhibition paraît d'ailleurs être essentiel au bon fonctionnement circadien. De plus, REV-ERBa amplifie cet effet, en diminuant de jour, les quantités d'ARNm de Bmal1. En fin de nuit, les gènes horloges des deux boucles négatives présentent leurs valeurs

minimales d'ARNm, Bmal1 et CLOCK/BMAL1 ne sont plus inhibés...un nouveau cycle recommence. La figure 5 donne une Vue simplifiée des mécanismes moléculaires de L'expression des gènes horloges n'est pas limitée aux SCN, et de nombreuses études rapportent une expression rythmique de ces gènes en dehors des SCN (autres parties du cerveau, foie, muscle, rein etc). Des décalages de phase des pics d'ARNm des gènes horloges ont été observés en fonction du tissu ou de l'organe. Ainsi, l'acrophase du rythme de présence des ARNm de Per1 se situant en début de jour dans les SCN, les valeurs maximales sont obtenues au même moment dans la Pars tuberalis de l'adénohypophyse mais seulement 7h après dans les poumons et de 4 à 10h après, en fonction des études, dans le foie et dans le coeur. Certains organes, dont les testicules, ne semblent pas présenter de variations journalières de l'expression des gènes horloges. Des organes de rat, et dans tous les cas, les tissus (foie, rein, coeur, muscle) présentent des oscillations circadiennes pendant plusieurs cycles en culture. Ceci démontre que des organes non neuronaux contiennent des oscillateurs circadiens fonctionnels et indépendants. Même de simples cellules en culture (fibroblastes ou autres) ont une machinerie d'horloge fonctionnelle. En effet, des fibroblastes soumis à un choc de sérum se mettent à avoir des rythmes circadiens pour au moins quelques cycles

Tout comme le NSC, les horloges périphériques peuvent répondre à des Zeitgebers par des changements de la phase de leurs rythmes. Par ailleurs, permettre l'accès de rongeurs à la nourriture seulement pendant le jour (période de repos) décale les rythmes périphériques et non ceux du NSC. Il s'agit donc de signaux spécifiques à la périphérie. Bien que les tissus périphériques puissent avoir des rythmes indépendamment en culture, il ont besoin de signaux du NSC pour entretenir des rythmes circadiens de façon soutenue. En fait, le NSC semble être le seul tissu à pouvoir conserver une rythmicité soutenue pendant un grand nombre de cycles, tandis que tous les autres oscillateurs voient leurs rythmes mourir après quelques cycles s'ils ne sont pas réentraînés. La raison de cette différence n'est pas encore connue, mais une étroite communication entre neurones du NSC pourrait être en jeu. Les signaux employés par le NSC pour entraîner ou réajuster les oscillateurs périphériques ne sont pas connus. Des études récentes montrent que des molécules solubles doivent être

impliquées. Dans d'autres cas, le système nerveux autonome pourrait aussi avoir un rôle à jouer.

Les gènes horloges exprimés dans la majorité des tissus, auraient donc pour rôle de contrôler la/les fonction(s) du tissu, de l'organe. Au niveau de l'horloge principale, ils permettent de coordonner les horloges périphériques afin que celles-ci présentent des fonctionnements avec des relations de phases stables entre elles. Leur rôle au niveau des horloges périphériques n'est pas encore bien connu et, de plus, paraît être tissu spécifique.

### **1.3.3. Entraînement de l'horloge moléculaire**

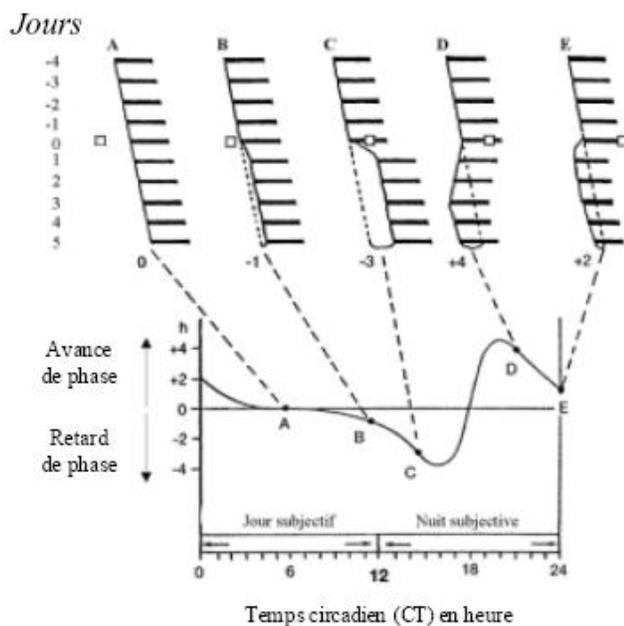
Bien que l'horloge puisse fonctionner de façon autonome (c'est-à-dire sans repère temporel), sa période est ajustée à 24 heures par différents facteurs, dont la lumière, afin d'adapter les rythmes aux conditions environnementales

Les fibres afférentes aux SCN proviennent de la rétine, des feuillets intergénéculés latéraux, des noyaux du raphé, de l'hypothalamus et des SCN eux-mêmes. Cependant, les voies principales d'entrée proviennent de la rétine. Les cellules ganglionnaires de la rétine projettent directement vers les SCN par le RHT ("Tractus rétinohypothalamique") et seule cette voie sera détaillée ici.

Deux neurotransmetteurs semblent impliqués : le glutamate principalement et le polypeptide activant l'adénylate cyclase pituitaire ; tous deux sont exprimés dans le RHT et seraient libérés dans les SCN en réponse à une stimulation lumineuse. Les cônes et les bâtonnets de la rétine permettent à la fois la transmission de l'information lumineuse visuelle mais aussi "non visuelle", c'est à dire l'information lumineuse parvenant aux SCN. Dans ce dernier cas, ils ne semblent pas être les seuls photorécepteurs impliqués. Pour la recherche de nouveaux acteurs, plusieurs candidats ont été proposés : des gènes codant des flavoprotéines, les Cryptochromes 1 et 2 et une nouvelle opsine, la mélanopsine. Les Cryptochromes font partie des gènes principaux de l'horloge moléculaire des SCN (voir paragraphe précédent) et sont exprimés dans la rétine. Leur implication dans la transmission de l'information photique a été évoquée mais les animaux de souche KO pour les gènes Cry1 et Cry2 conservent des propriétés d'entraînement similaire à celles des souris de type sauvage. L'expression du gène

Mélanopsine a été mise en évidence dans et la rétine des mammifères. Les cellules ganglionnaires exprimant ce gène projettent majoritairement vers les SCN. L'expression de Mélanopsine semble jouer un rôle dans le système circadien.

L'information photique est tout d'abord perçue par la rétine puis transmise aux SCN en suivant différentes voies. La seule voie directe dont les neurotransmetteurs principaux sont le glutamate et le PACAP, forme le RHT qui est la voie principale de l'entraînement par la lumière. Comme cela est montré dans la figure 6, l'horloge des NSC continue de fonctionner en l'absence de repère temporel (obscurité constante). Sa période est alors différente (bien que proche) de 24 heures. Comme elle demeure néanmoins organisée suivant une alternance rythmique, on peut définir, en se fondant sur un marqueur du fonctionnement de l'horloge tel que l'activité locomotrice, un jour et une nuit, dits «subjectifs » puisque l'animal est en condition d'isolement temporel. Le temps n'est plus nyctéméral, mais circadien. Il est alors possible de tester les effets d'une brève application de lumière (créneau lumineux) à différents temps circadiens sur la phase du rythme d'activité étudié. Lorsque le créneau lumineux est appliqué durant le jour subjectif, la phase du rythme est identique avant et après l'application de ce créneau: en conséquence, la différence temporelle est égale à 0. Reportée sur un graphique exprimant la différence de phase en fonction du temps circadien auquel est appliqué le stimulus lumineux, cette valeur est donc sur une ligne horizontale indiquant l'absence d'effet sur la phase. Si maintenant le créneau est appliqué au début de la nuit subjective, lorsque l'animal court dans sa roue (barre noire), on observe une modification de la phase du rythme au cours des jours suivants. L'activité locomotrice commence plus tard qu'attendu. La différence temporelle entre la phase attendue et celle observée est reportée sur la partie comprise sous la ligne horizontale; elle correspond à un retard de phase. À l'inverse, en fin de nuit, le même stimulus lumineux entraîne dans les jours qui suivent son application un début anticipé de l'activité de roue. On a donc une avance de phase dont la durée est reportée dans la partie supérieure. La répétition de ces stimulus à tous les points du rythme circadien permet ainsi d'établir une courbe, **la courbe de réponse de phase**. Elle témoigne d'une remise à l'heure de l'horloge biologique, en réponse à un stimulus (ici la lumière) en fonction du moment où celui-ci est appliqué.



□ Créneau lumineux

Figure 6 : **La lumière induit des décalages de phase de l'activité locomotrice.**

En l'absence de repère temporel (obscurité constante), la période de l'horloge est différente (bien que proche) de 24 heures. Comme elle demeure néanmoins organisée suivant une alternance rythmique, on peut définir, en se fondant sur un marqueur du fonctionnement de l'horloge tel que l'activité locomotrice, un jour et une nuit, dits «subjectifs » puisque l'animal est en condition d'isolement temporel. Le temps n'est plus nycthéméral, mais circadien. Il est alors possible de tester les effets d'une brève application de lumière (créneau lumineux) à différents temps circadiens sur la phase du rythme d'activité étudié. L'application d'un créneau lumineux (carré) en fin ou en début de nuit induit respectivement une avance et un retard de phase de l'activité locomotrice (barres horizontales noires). Par contre, l'application du créneau de lumière pendant le jour subjectif est sans effet. Le report de l'amplitude et du sens des décalages de phase en fonction de l'heure d'application de la lumière, permet d'établir une courbe de réponse de phase.

### **1.3.4. Transduction des signaux de sortie de l'horloge**

Des tranches de SCN en culture libèrent rythmiquement de l'AVP et du VIP dans le milieu de culture montrant ainsi que ces neuropeptides jouent un rôle dans la médiation des signaux efférents aux SCN. Les projections VIP ou AVP mises en évidence chez les rongeurs concernent principalement le septum latéral ventral, les noyaux périvericulaires antéroventraux, le noyau préoptique médian, les noyaux paraventriculaires thalamiques, les noyaux hypothalamiques dorso et ventro médians

(DMH et VMH) et surtout les noyaux paraventriculaires hypothalamiques (PVN) et la zone subparaventriculaire (SPVZ). Les rôles précis de chacune de ces connexions ne sont pas très bien déterminés mais les deux voies les plus documentées concernent la régulation de la libération des glucocorticoïdes et de la mélatonine. Ces deux hormones présentent un profil circadien de libération sous dépendance des SCN et représentent donc une traduction hormonale de l'activité journalière des SCN. Nous verrons en détail dans la partie 3.2. le contrôle de la synthèse de mélatonine qui illustre le contrôle par les SCN par voies nerveuses..

Les sécrétions rythmiques de ces hormones (mélatonine, glucocorticoïdes) permettent donc une action dépendante du temps sur leurs cibles. Les SCN, à la base de ces contrôles, n'agissent pas uniquement par l'intermédiaire de ces hormones. Ils possèdent également des connexions entièrement nerveuses avec différents organes, notamment le foie. La sensibilité des organes aux messages nerveux et/ou hormonaux dus aux SCN est alors différente d'un organe à l'autre. En effet, certains tissus semblent plus sensibles aux messages nerveux (coeur, muscle striés, rate) et d'autres aux messages hormonaux (foie et rein). Un même organe peut également présenter des différences de sensibilité à ces messages au regard de la fonction considérée ; Ainsi, les SCN contrôlent l'activité des différents organes par l'intermédiaire du système nerveux et du système endocrine ce qui permet une organisation temporelle des différents rythmes physiologiques.

Une greffe de SCN à un animal receveur ayant subi préalablement une lésion des SCN, suffit à réinstaurer une rythmicité comportementale ; Même dans le cas où le greffon est encapsulé (excluant toute création de synapses) et placé dans le troisième ventricule, le comportement rythmique d'activité locomotrice est rétabli. Cette étude démontre que les SCN peuvent contrôler au moins certains rythmes par libération directe de facteurs. Différents candidats semblent pouvoir intervenir, dont l'AVP. Au début des années 80, un rythme circadien d'AVP dans le liquide céphalorachidien du rat fut montré ainsi que sa synchronisation au cycle lumière-obscurité. Ce rythme est indépendant de celui retrouvé dans la circulation sanguine puisque, d'une part la perméabilité de la barrière hématoencéphalique à l'AVP est très faible et d'autre part, une hypophysectomie ne diminue pas les taux d'AVP dans le liquide céphalorachidien. En revanche, une lésion

des SCN abolit ce rythme mais aussi les niveaux détectables de ce peptide dans le liquide céphalorachidien. Les SCN pourraient libérer directement de l'AVP dans le troisième ventricule, ou par l'intermédiaire d'une structure périventriculaire, sans faire intervenir d'autres structures. Le rôle circadien précis du rythme d'AVP dans le liquide céphalorachidien n'est pas encore élucidé mais il semble intervenir dans les rythmes de veille-sommeil. L'AVP pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de l'activité locomotrice.

En conclusion, la figure 7 schématise les propriétés d'une horloge à l'échelle de l'organisme.

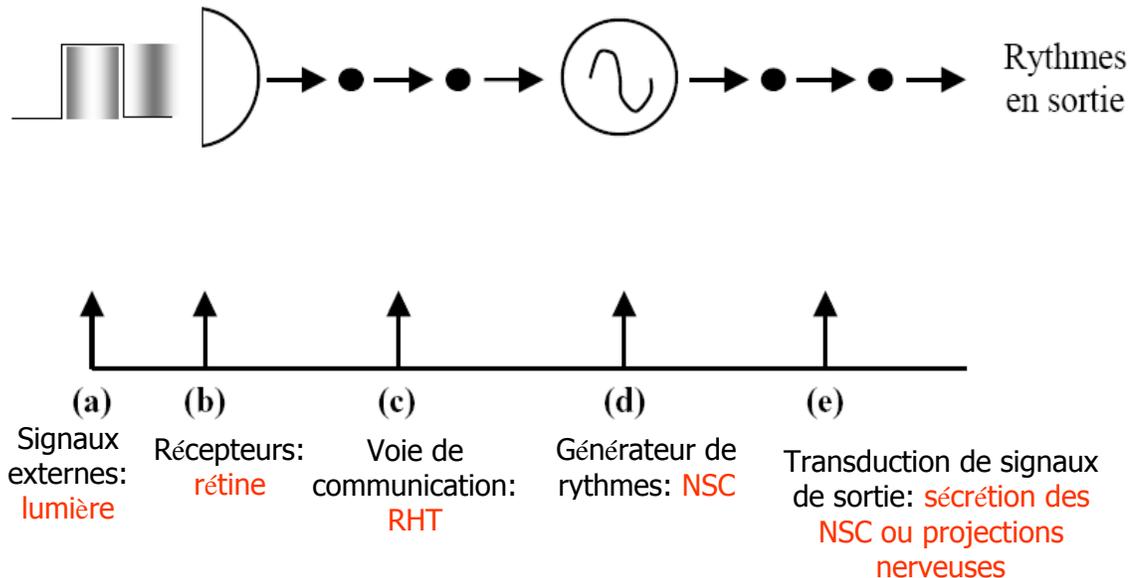


Figure 7: **Schématisation générale des propriétés d'une horloge à l'échelle de l'organisme.** Les différentes composantes correspondent à (a) des signaux externes (la lumière) perçus par (b) le récepteur (la rétine) ; en (c), ces informations sont transmises par une voie de communication (le tractus rétino-hypothalamique) à (d) un générateur de rythmes nécessaire et suffisant pour générer une rythmicité auto-entretenu (les noyaux suprachiasmatiques). Ce générateur de rythmes permet ensuite l'établissement de rythmes physiologiques et comportementaux via une transduction de signaux de sortie (e, sécrétion des SCN ou projections nerveuses).

Un "générateur de rythmes" est nécessaire et suffisant pour obtenir une rythmicité et ce, de manière endogène, un "récepteur" correspond à la perception du monde extérieur et les parties "transduction des signaux d'entrée et de sortie" correspondent aux moyens par lesquels les informations sont transmises. Une horloge permet donc de générer et de distribuer des signaux de nature rythmique à l'organisme. De plus, bien que son

fonctionnement soit totalement auto-entretenu (montré en obscurité constante), elle se synchronise avec l'environnement extérieur (montré en alternance jour/nuit) afin d'être en phase avec lui. Pour qu'une structure soit qualifiée d'horloge, elle doit être organisée selon un axe bien défini. Les différentes composantes correspondent à des signaux externes (signaux photique) perçus par le récepteur, la rétine. Ces informations sont transmises par une voie de communication, le tractus rétino-hypothalamique à un générateur de rythmes, nécessaire et suffisant pour générer une rythmicité auto-entretenu, les noyaux suprachiasmatiques. Ce générateur de rythmes permet ensuite l'existence de rythmes physiologiques et comportementaux via une transduction de signaux de sortie de l'horloge (sécrétion des SCN ou projections nerveuses). Ainsi, ces différents niveaux tissulaires d'organisation des rythmes circadiens permettent le fonctionnement circadien de l'organisme entier.

## **2. Rythmes circadiens et médecine clinique**

### ***2.1. Etablissements des valeurs de référence et détection des situations à risque***

---

Les valeurs usuelles des paramètres cliniques attendus chez des sujets cliniquement sains doivent être définies en termes de structure temporelle de l'espèce en prenant en compte le moment, l'amplitude et les relations de phase entre les variables rythmiques. Cette approche est compliquée par la difficulté à définir un état sain de la population de référence en raison de notre connaissance du déterminisme génétique des « situations de risque » et de leurs manifestations précoces sous la forme de changements subtils de la structure temporelle.

#### **2.1.1. Facteurs de variation de l'expression des rythmes circadiens**

##### **▪ Variabilité intra et inter-individuelle de l'expression des rythmes circadiens**

Les variabilités inter et intra-individuelles de l'expression d'un rythme circadien ont des implications importantes pour la pratique clinique de la médecine vétérinaire car si la variabilité inter-individuelle est supérieure à la variabilité intra-individuelle, les

traitements destinés à un patient moyen vont être insuffisants ou alternativement trop importants. D'un autre côté, si la variabilité intra-individuelle est supérieure à la variabilité inter-individuelle, la notion de patient moyen peut être utile mais l'administration du traitement devra être ajustée sur une base journalière. Pour répondre à cette question, Refinetti et Piccione (2005) ont évalué les paramètres qui caractérisent le rythme circadien de la température corporelle (niveau moyen, acrophase) chez 4 espèces dont le chien et le cheval. Chez ces 2 espèces (diurnes), la température corporelle augmente progressivement au cours de la période d'éclairage et, en particulier chez le cheval, n'atteint sa valeur la plus élevée que quelques heures après l'extinction des lumières (figure 8a). Chez le rat (un animal nocturne), la température augmente rapidement après l'extinction des lumières et descend dès le début de la phase lumineuse. Chez l'écureuil (un animal diurne), la température augmente progressivement au cours de la phase diurne et diminue rapidement après l'extinction des lumières.

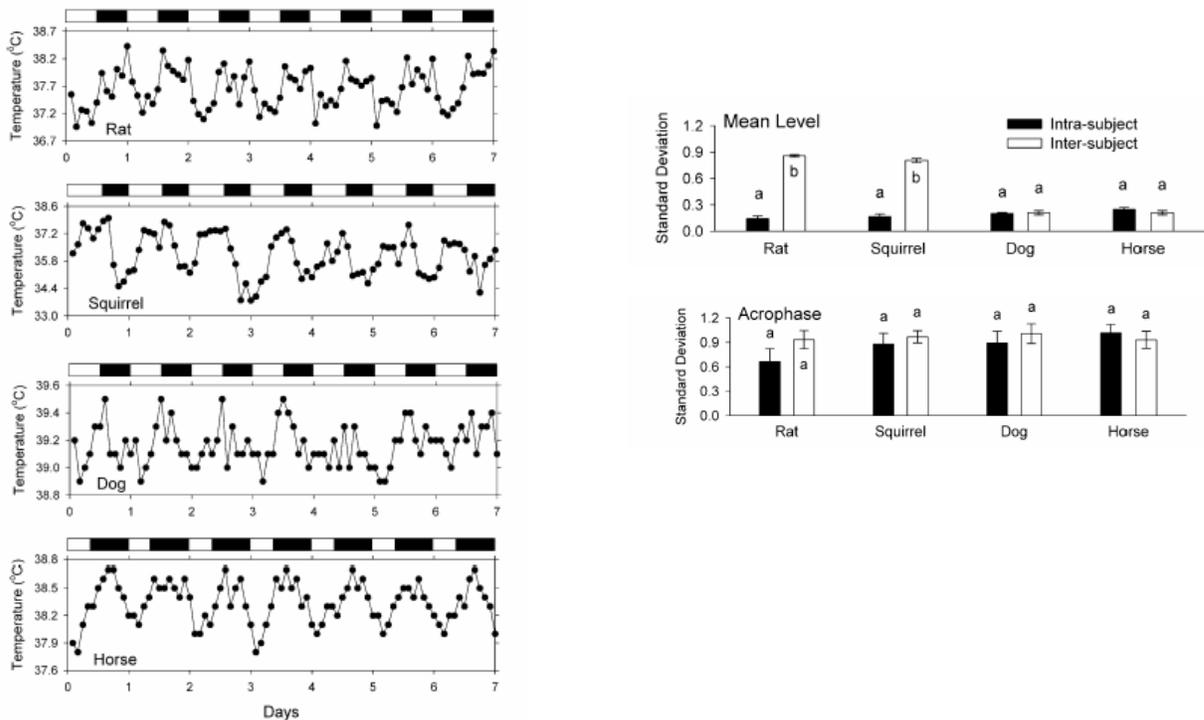


Figure 8 : (a) Variations de la température corporelle d'un individu représentatif de chacune des 4 espèces étudiées au cours de 7 jours consécutifs (12 mesures par jour). Les barres horizontales blanches et noires indiquent les durées respectives des phases de lumière et d'obscurité (b) Analyse de la variabilité intra et inter-individuelle de 2 paramètres du rythme (acrophase, niveau moyen) de la température corporelle des rats, écureuils, chiens et chevaux. Les lettres indiquent la significativité des tests statistiques. Les barres avec des lettres différentes sont statistiquement différentes (d'après Refinetti et Piccione, 2005. Journal of Thermal Biology 30 : 139).

Les auteurs ont également montré que la variabilité intra-individuelle des paramètres du rythme circadien de température n'était jamais supérieure à leur variabilité inter-individuelle (figure 8b), indiquant que l'organisation des rythmes circadiens est caractérisée par une plus grande exactitude du mécanisme de contrôle intra-individu qu'entre les individus d'une espèce. Le fait que la variabilité intra-sujets des paramètres du rythme circadien de la température corporelle ne soit jamais supérieure à la variabilité inter-individus implique que les cliniciens doivent ajuster les procédures thérapeutiques aux besoins spécifiques du patient.

#### ▪ **Evolution des rythmes circadiens au cours de la vie**

Tous les organismes ne présentent pas des rythmes circadiens actifs dès la naissance. La question émergente est celle du moment de l'initiation des rythmes.

Chez les embryons de poulet, des rythmes circadiens comme celui de la N-acétyltransferase peuvent être détectés dès leur première exposition à un cycle lumière-obscurité. Ainsi, des cycles peuvent être détectés chez les embryons de poulet dès 17 jours d'incubation si les œufs sont incubés en présence d'un cycle lumière-obscurité. Les poulets sont autonomes et peuvent survivre loin de leur mère sous réserve qu'ils soient maintenus au chaud et reçoivent de la nourriture et de l'eau en quantité suffisante.

Pour les espèces comme les mammifères chez lesquelles le nouveau né est dépendant de la mère, les rythmes ne sont pas établis à la naissance. A titre d'exemple, les chiots âgés de 8 semaines ne présentent pas le rythme circadien des concentrations plasmatiques en cortisol observé chez le chien adulte (3 ans) alors que ce rythme est perturbé chez les chiens âgés (12 ans, Palazzolo et Quadri, 1989).

Le vieillissement a souvent été mis en relation avec une perte de la structure temporelle avec une réduction de la capacité d'adaptation de nombreuses fonctions de l'organisme. La question qui est toujours le sujet de débat est ce que les altérations des rythmes sont la cause ou la conséquence du vieillissement. Des arguments en faveur d'un rôle causal résultent des observations faites chez la drosophile par Pittendrigh et Minis (1972) qui ont montré que le transfert de jeunes adultes d'un cycle lumière-obscurité de 24h à un environnement avec une périodicité inférieure (21h) ou supérieure (27h) raccourcissait la durée de vie. Au cours du vieillissement, l'amplitude de la plupart des rythmes

diminue. Cela inclue la température corporelle, la consommation d'oxygène (souris), l'excrétion de potassium et la production de mélatonine et d'hormones comme l'hormone de croissance, la testostérone, LH (homme) alors que la production d'insuline augmente. Il peut y avoir également une désynchronisation interne. Chez l'homme, la réduction de l'amplitude des rythmes au cours du vieillissement pourrait expliquer l'émergence de troubles du sommeil qui pourraient résulter d'une altération directe du cycle veille sommeil ou d'une altération de la production des hormones qui régulent le sommeil.

### **2.1.1. Importance des variations circadiennes des paramètres biologiques dans l'établissement d'un diagnostic**

La rythmicité journalière est une caractéristique fondamentale de la physiologie animale et la prise en compte des rythmes circadiens est nécessaire dans la pratique vétérinaire. Alors que de nombreuses études réalisées chez l'homme, les rongeurs ou les animaux de rente ont établi l'existence des rythmes circadiens pour de nombreuses variables physiologiques, les études réalisées chez le chien n'avaient jusqu'à récemment pas permis de mettre en évidence de façon répétable, un rythme nyctéméral de la température corporelle et de la sécrétion de nombreuses hormones. Pourtant, la réalisation de mesures standardisées des paramètres physiologiques a mis en évidence, chez cette espèce, un rythme nyctéméral de la température corporelle, de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque. Ces rythmes ont été reproduits chez le chien privé de nourriture pendant 60h (figure 9). A notre connaissance, il n'existe pas de données bibliographiques qui démontrent le caractère endogène de ces variations rythmiques. Les variations périodiques des paramètres physiologiques comme les paramètres hémodynamiques et l'ECG doivent également être prises en compte dans les études pharmacologiques lors de l'évaluation de l'inocuité sur le plan cardiovasculaire d'un traitement. Il est quelquefois difficile de distinguer les variations physiologiques normales des effets de la substance étudiée.

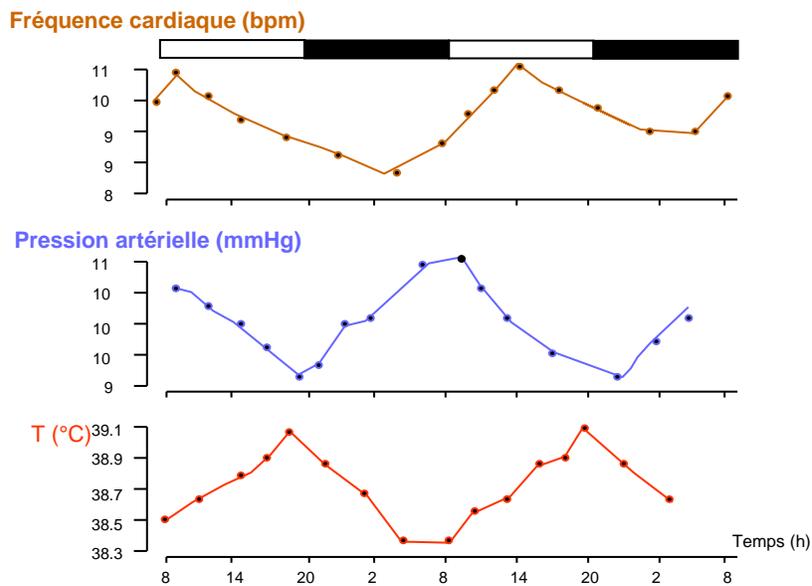


Figure 9 : Evolution temporelle de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle moyenne et de la température rectale d'un chien représentatif qui a reçu sa ration à 10h00 chaque jour (triangle). Les mesures ont été réalisées toutes les 3h. Les barres horizontales blanches et noires indiquent les durées respectives des phases de lumière et d'obscurité (d'après Piccione et al., 2005. J Vet Med A 52 :377).

L'expression d'un rythme circadien d'un paramètre biologique chez l'individu sain doit être pris en compte pour déterminer le moment optimal auquel la mesure doit être effectuée pour réaliser un diagnostic. Ainsi, la connaissance des rythmes nyctéméraux peut être mise à profit pour déterminer le moment optimal de prélèvement qui permet au mieux de discriminer un dysfonctionnement et d'établir un diagnostic. Ainsi, chez le chien, la mise en évidence de variations circadiennes des concentrations plasmatiques en thyroxine totale et libre qui s'expriment par des niveaux sériques pratiquement deux fois plus élevés à 11:00 et 14 :00 qu'à 8 :00 implique que la mesure des concentrations sériques en thyroxine doit être préférentiellement réalisée entre 11 :00 et 14 :00 pour diagnostiquer plus facilement un hypothyroïdisme chez le chien (figure 10).

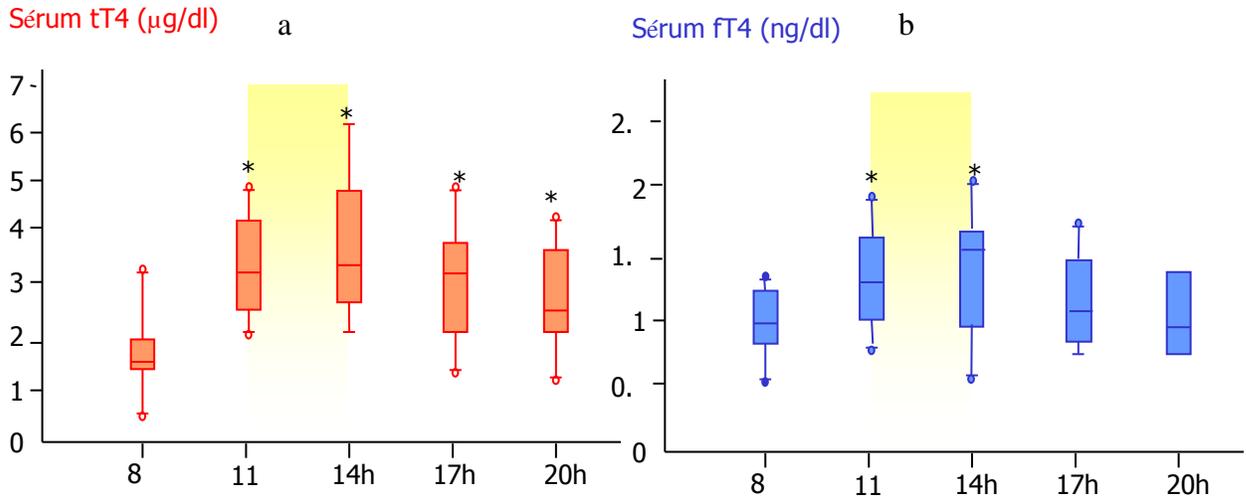


Figure 10 : Variations temporelles des concentrations plasmatiques (moyenne  $\pm$  écart-type) en thyroxine totale (a) et libre (b) évaluées toutes les 3 heures pendant 12h (de 8h00 à 20h00) chez le chien sain. La barre horizontale dans la boîte représente la médiane (voir box-plot, d'après Hoh et Oh, 2006. J Vet Sci, 7 : 25).

### **2.1.3. Détection des situations à risque pour des maladies**

Une voie prometteuse pour l'application de la chronobiologie à la médecine clinique était la détection précoce de déviations par rapport aux standards de référence chronobiologique, les changements précoces de la structure temporelle et la reconnaissance des états de risques pour des maladies communes. Dans ses premières phases, l'approche chronobiologique a pour objectif d'évaluer le risque de développer une pathologie. Si l'on admet que des changements de la structure temporelle précèdent la maladie et sont en relation avec la situation à déterminisme génétique de risque de développer certaines maladies, il apparaît intéressant de comparer et corrélérer les paramètres des rythmes avec les situations de risque établies par les données épidémiologiques.

Des altérations des paramètres du rythme de certaines fonctions endocrines ont été associée chez l'homme à un risque élevé de développer une pression artérielle élevée. La limite de ces études est la nécessité de d'obtenir des données sur une longue période. Des situations de risque transitoires pour des maladies cardiovasculaires et cérébrovasculaires apparaissent être une fonction de facteurs cardiovasculaires comme le rythme circadien des variations de pression sanguine et les changements des

paramètres de coagulation qui favorisent l'hypercoagulabilité à certaines phases du cycle et pas à d'autres..

La reconnaissance de changements de la structure temporelle en relation avec des états de risque permanents ou temporaires permet d'envisager une action préventive et/ou des tentatives d'ajustement des anomalies temporelles.

Ainsi, chez l'homme, l'amplitude du pic matinal de la pression artérielle a été mis en relation avec la prévalence des accidents cardiovasculaires chez les patients hypertendus (Kario et al., 2003. *Circulation*, 107: 1401, figure 11). La diminution de ce pic de pression pourrait représenter une cible thérapeutique pour prévenir les accidents cardiovasculaires chez les patients hypertendus.

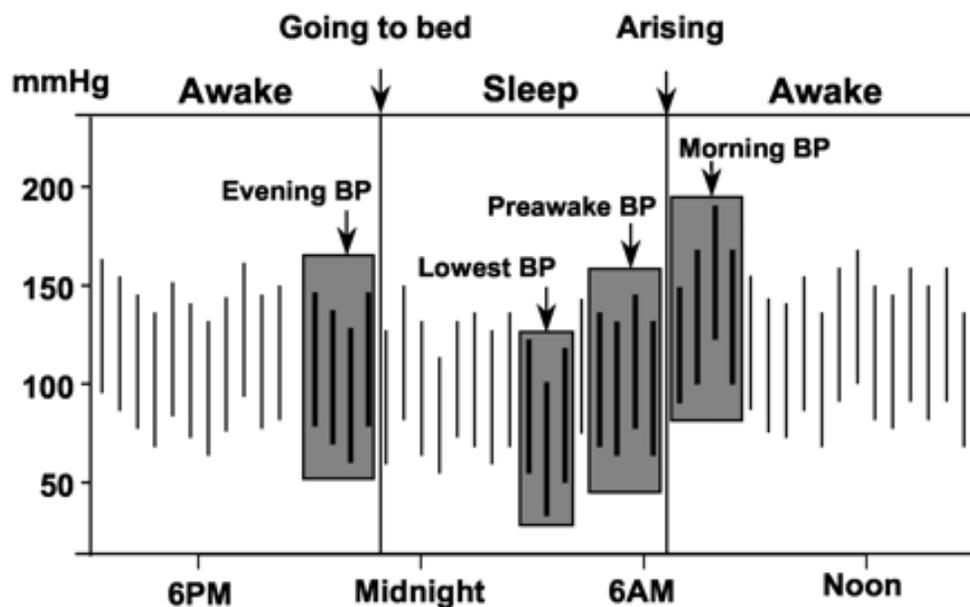


Figure 11 : Rythme circadien de la tension artérielle. Le pic matinal de tension artérielle matinale est définie comme la différence entre la moyenne des mesures de pression artérielle systolique obtenues au cours des 2 heures suivant le réveil (morning BP) et la moyenne des mesures des plus faibles valeurs de pression artérielle systolique obtenues pendant 1h (lowest BP, Kario et al., 2003. *Circulation*, 107: 1401)

Les changements des paramètres temporels des fonctions biologiques en relation avec la maladie peuvent ou bien représenter une anomalie qui survient comme la conséquence d'une maladie clinique. Alternativement, l'altération de la structure temporelle d'un organisme peut être impliquée dans l'étiologie et/ou la pathogenèse d'un état pathologique.

## **2.2. Chronopharmacologie : concepts et mécanismes chronopharmacologiques**

---

### **2.2.1. Historique et concepts**

Les observations chronobiologiques ont conduit à élaborer l'hypothèse selon laquelle la réponse d'un organisme à une substance va dépendre de l'heure à laquelle elle est administrée. Virey (1814) a été un des premiers à suggérer que les effets désirables et indésirables d'une substance peuvent varier en fonction du moment de leur administration. Cette hypothèse a été validée et la toxicité et l'efficacité de la plupart des drogues ont été mises en relation avec le moment de leur administration.

#### **Chronotoxicologie**

Toute étude pharmacologique débute par une étude de toxicité. Le paramètre le plus utilisé pour caractériser la toxicité aiguë est la DL50. Depuis les études de Halberg et al. (1959), nous savons que la toxicité aiguë de drogues dépend de façon critique du moment de leur administration. Une des premières études de chronotoxicologie concernait l'étude de la toxicité aiguë de l'ouabaïne chez la souris. La même dose de la substance a été administrée toutes les 4h pendant 24h à différents groupes de souris dans des conditions environnementales contrôlées (température, humidité, éclairage). La mortalité a été de 80% quand la substance était administrée à 09:00 et de 20% lorsque l'administration avait lieu à 21:00. La plupart de ces études ont montré que la toxicité maximale était observée à différents moments du nyctémère même pour des substances de la même famille chimique. La plupart des drogues évaluées chez les rongeurs nocturnes ont été plus toxiques au cours de la phase sombre qui correspond à leur phase d'activité. La chronotoxicité pour d'autres périodes a été étudiée pour le phénobarbital par Brugerolle et al. (1988) qui a montré que la toxicité aiguë du phénobarbital varie au cours du nyctémère mais également au cours de l'année, la toxicité étant plus élevée en janvier qu'en juillet chez la souris.

Le terme "chronopharmacologie" a été introduit par Halberg en 1960. La chronobiologie rend nécessaire la réévaluation des nombreuses données en fonction du moment où elles ont été obtenues. En raison de la structure temporelle des organismes composés d'une multitude de biorythmes, les effets et la disposition d'une drogue vont dépendre du

moment de son administration en relation avec plusieurs fréquences. Ainsi, la chronopharmacologie doit impliquer des modifications qualitatives et/ou quantitatives de l'efficacité d'une drogue en fonction de l'heure, du jour ou du mois de son administration. La pharmacologie s'intéresse à l'efficacité d'une substance et peut être divisée en 2 parties: pharmacodynamique (étude du mode d'action d'une substance) et pharmacocinétique (étude de la disposition d'une substance). Ces 2 aspects interfèrent. Des variations temporelles peuvent intervenir à tous les différents stades et Reinberg (1974) a proposé trois concepts et des termes qui impliquent ces aspects interdépendants de la chronopharmacologie: la chronesthésie, la chronopharmacocinétique et la chronergie.

La **chronesthésie** est définie comme les changements temporels de la susceptibilité biologique qui incluent les changements temporels des récepteurs des cellules cibles ou organes cibles, de la perméabilité membranaire, en d'autres mots, la chronesthésie concerne les changements temporels du mode d'action d'une drogue., i.e. sa pharmacodynamique.

La **chronopharmacocinétique** implique l'étude des changements temporels des processus d'absorption, de distribution, métabolisme et élimination d'une drogue et décrit l'influence du moment de l'administration sur les paramètres pharmacocinétiques qui décrivent ces différents processus.

La **chronergie** représente les changements rythmiques de la réponse d'un organisme à une drogue (ses effets globaux) selon sa chronesthésie et sa chronopharmacocinétique. Ainsi, l'objectif de la chronopharmacologie est de documenter les changements temporels d'ordre qualitatif et/ou quantitatifs de l'efficacité de drogues de façon à définir un meilleur usage de ces drogues dans le traitement de maladies.

La chronopharmacologie ne consiste pas seulement à étudier les variations temporelles de l'activité, de la toxicité ou de la pharmacocinétique d'une drogue en fonction du moment de son administration mais elle concerne également l'étude des possibles altérations de la structure temporelle de l'organisme qui reçoit cette administration. Les modifications possibles des rythmes biologiques induites par la substance constituent d'autres aspects de la chronopharmacologie. Les altérations des rythmes circadiens

peuvent être associées à une effet thérapeutique comme dans le cas du traitement de la dépression. Les hormones comme les corticostéroïdes, la mélatonine, des drogues comme les benzodiazépines, des stimuli lumineux semblent influencer la phase de certains rythmes circadiens (agents chronopharmacologiques). L'utilisation de ces agents peut être intéressante si les changements temporels sont des facteurs causaux de maladies organiques ou de perturbations fonctionnelles ou si une certaine synchronisation est requise pour optimiser les performances ou la résistance. L'altération de la structure circadienne peut à l'inverse avoir des conséquences physiopathologiques liées à une perturbation de l'homéostasie. Des études expérimentales réalisées chez la souris ont montré que les interférons utilisés comme agents anti-viraux et anti-cancéreux perturbent les rythmes circadiens d'activité locomotrice et de température et de l'expression des gènes Per dans les NSC (Ohdo et al., 2001. Nature Medicine, 7 : 356).

### **2.2.2. Mécanismes chronopharmacologiques**

Les études pharmacodynamiques impliquent l'évaluation de la courbe dose-réponse. Les aspects quantitatifs de la puissance et de l'efficacité sont évalués à partir de la courbe log(dose)-réponse (effet), une courbe sigmoïde est généralement obtenue. Pour des aspects comparatifs, la dose qui donne 50% de l'effet maximal est choisie (ED50) appelée la dose efficace 50. Ces études comparatives devraient prendre en compte le moment de l'administration. Un exemple des différences temporelles est donnée par l'étude de Nagayama et al. (1978) qui a montré que les courbes dose-réponse des effets sédatifs de la chlorpromazine différaient significativement en fonction de l'heure d'administration.

La plupart des études pharmacologiques ont documenté les variations temporelles de la toxicité d'une drogue ou de son efficacité mais la plupart étaient des descriptives. Les variations temporelles de l'efficacité d'une drogue peuvent être expliqués ou bien par des variations temporelles de leur mode d'action (chronopharmacodynamique ou chronesthésie) ou par des variations d'ordre pharmacocinétique (Chronopharmacocinétique).

- **Variations temporelles du mode d'action ou chronopharmacodynamique**

Les drogues peuvent être classées en différents groupes en fonction de leur mécanisme d'action: les drogues qui n'ont pas une affinité spécifique pour des récepteurs ou des cellules et dont le mode d'action implique une simple réaction physicochimique (anesthésiques locaux, diurétiques osmotiques) et la plupart des drogues qui ont une action spécifique qui s'exerce via des récepteurs. En ce qui concerne le premier groupe, les variations circadiennes des effets des anesthésiques locaux pourraient être expliquées par des variations temporelles de la perméabilité membranaire aux ions; les anesthésiques locaux agissant en modifiant la perméabilité cellulaire aux ions Ca, Na et Cl. Pour les substances qui agissent via des récepteurs spécifiques, l'approche chronopharmacologique implique l'étude des variations temporelles du nombre et/ou de l'affinité des récepteurs. Ainsi, Lemmer et Lang (1984) ont mis en évidence des différences de liaison antagoniste du dihydropropranolol tritié à la membrane des membranes du ventricule du coeur de rats sacrifiés à 8:00 ou 20:00, un nombre plus élevé de sites de liaison a été mis en évidence à 20:00 (de l'ordre de 40%), cet résultat explique au moins en partie la plus grande efficacité des  $\beta$ -bloquants au cours de la phase nocturne.

- **Variations temporelles de la disposition des médicaments ou chronopharmacocinétique**

La chronopharmacocinétique concerne l'étude des changements temporels des processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination d'une drogue et l'influence du moment de l'administration sur les paramètres pharmacocinétiques qui décrivent ces différents processus.

- Variations temporelles de l'absorption

Selon la voie d'administration, de nombreux facteurs peuvent moduler le processus d'absorption, comme la structure des membranes, les propriétés physicochimiques de la drogue, le débit sanguin, le pH et le degré de vidange du tractus gastro-intestinal. Des variations circadiennes du pH gastro-intestinal ou de la motricité, du débit sanguin intestinal et de la perméabilité membranaire peuvent être impliqués dans les variations temporelles de l'absorption. Des études ont montré que de telles variations existent pour une voie orale d'administration mais qu'elles sont fortement influencées par de nombreux facteurs comme l'alimentation, la posture et la forme

galénique de la drogue et que ces facteurs doivent être contrôlés au cours des études chronopharmacocinétiques.

- Variations temporelles de la distribution

Le processus de distribution implique le passage des drogues à travers les membranes biologiques, leur transport par les protéines plasmatiques et leur liaison aux tissus.

*Variations temporelles de la liaison aux protéines plasmatiques*

Les drogues sont transportées depuis leur site d'administration aux sites récepteurs par des protéines plasmatiques comme l'albumine, l' $\alpha_1$  glycoprotéine, les globulines et les lipoprotéines. Comme seule la fraction libre d'une drogue peut diffuser à travers les membranes cellulaires, la liaison aux protéines a d'importantes implications pharmacologiques. Beaucoup de facteurs peuvent influencer la liaison aux protéines plasmatiques: la température, le pH, les propriétés physicochimiques de la drogue, les concentrations plasmatiques de la protéine impliquée...Chacun de ces facteurs peut être soumis théoriquement à des variations temporelles. Les questions pratiques soulevées par les variations temporelles de la liaison aux protéines plasmatiques est celle de leur implication clinique. Il est généralement admis que les changements de la liaison aux protéines plasmatiques ont des conséquences cliniques seulement pour les drogues qui sont fortement liées aux protéines plasmatiques.

*Variations temporelles de la liaison aux érythrocytes et de la perméabilité membranaire*

La mise en évidence de variations temporelles de la liaison de certaines substances aux globules rouges est un argument en faveur de l'existence de variations temporelles du passage des drogues à travers les membranes biologiques pour lequel les globules rouges constituent un modèle. Une membrane particulière doit être également prise en compte : la barrière hémato-encéphalique.

- Variations temporelles du métabolisme

Le site principal du métabolisme des xénobiotiques est le foie mais d'autres tissus peuvent être impliqués : poumons, reins, sang, tractus digestif. Les substances lipophiles doivent être transformées en composés plus polaires avant d'être excrétées dans les urines ; ces biotransformations impliquent 4 grands types de réaction : oxydation, réduction, hydrolyse et conjugaison. Le métabolisme des xénobiotiques dépend de l'activité enzymatique ou du débit sanguin hépatique (xénobiotiques à fort taux d'extraction hépatique). Des variations circadiennes et ultradiennes du métabolisme hépatique ont été mises en évidence in vitro. Ainsi, un rythme circadien de l'activité d'oxydation de l'hexobarbital a été mise en évidence par Nair (1974, figure 12) ; ce rythme du métabolisme oxydatif serait contrôlé par les surrénales. Une relation inverse entre l'activité oxydase hépatique et le durée du sommeil induit par l'hexobarbital a été observé chez le rat.

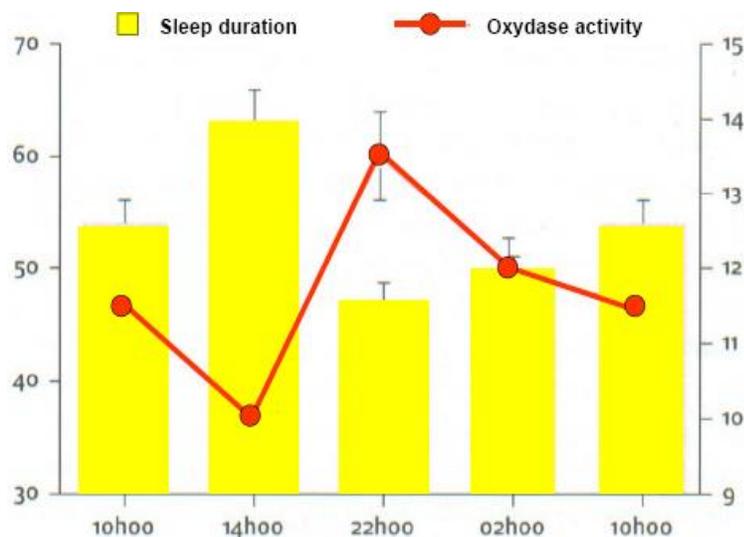


Figure 12 : Relation inverse entre les variations temporelles de la durée du sommeil induit par l'hexobarbital (en minutes) et l'activité oxydase hépatique chez le rat (d'après Nair, 1974. In Scheving LE, Chronobiology. Igaku-Shoin, Tokyo, p182).

Des variations temporelles de la clairance du propranolol chez le rat ont été associées à des variations du débit sanguin hépatique. Des variations temporelles

du métabolisme hépatique ont été mises indirectement en évidence à travers l'évaluation des concentrations et de la pharmacocinétique des métabolites.

- Variations temporelles de l'excrétion

Des variations circadiennes des principales fonctions rénales ont été mises en évidence : filtration glomérulaire, débit sanguin rénal, pH urinaire, réabsorption tubulaire. Les propriétés physicochimiques des substances sont très importantes car l'élimination rénale dépend en partie de l'ionisation des drogues et peut être modifiée par des changements de pH urinaire.

Chez le chien, un rythme circadien des concentrations sériques et du taux d'excrétion urinaire de la théophylline ont été mis en évidence au cours de l'infusion intraveineuse de théophylline. La relation de phase entre les rythmes circadiens du pH urinaire et les changements des concentrations sériques en théophylline est en faveur de l'existence d'un rythme circadien de clairance rénale de la théophylline (figure 13).

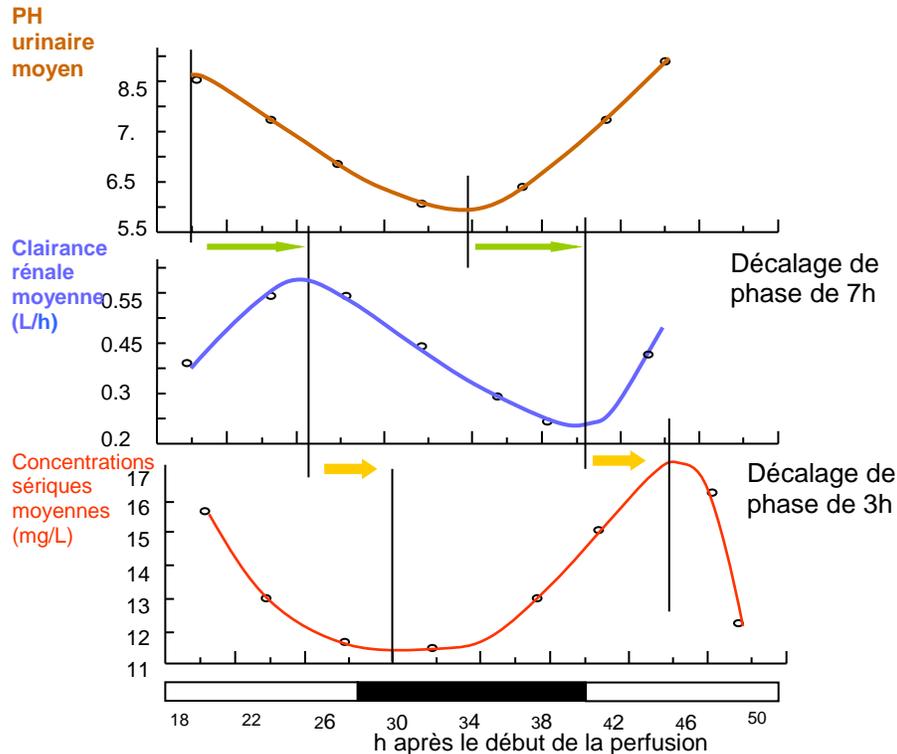


Figure 13 : Relation de phase entre les valeurs moyennes du PH urinaire, de la clairance rénale de la théophylline et des concentrations sériques en théophylline. Les données ont été obtenues avec 4 chiens qui ont reçu une infusion intraveineuse d'aminophylline de façon à atteindre l'état d'équilibre. Les barres horizontales blanches et noires indiquent les durées respectives des phases de lumière et d'obscurité. Des prélèvements de sang et d'urine ont été réalisés toutes les 4h de 20 à 48h après le début de la perfusion. La clairance rénale a été estimée en divisant le taux d'excrétion de la théophylline par la concentration sérique en théophylline au temps correspondant au milieu de la collecte d'urine. Un décalage de phase de 3h est observé pour la relation d'effet inverse entre la clairance rénale et les concentrations sériques en théophylline. Un décalage de phase de 7h est observé pour la relation directe entre le pH urinaire et la clairance de la théophylline (d'après Rackley et al., 1991).

Un exemple de variation temporelle de l'excrétion rénale et de la relation entre chronopharmacocinétique et chronotoxicité des drogues est donné par le Cis DDP (anti-cancéreux) dont l'élimination accrue lors de son administration à 6:00 a été associée à une néphrotoxicité plus élevée.

### **2.3. Rythmes circadiens et chronothérapie**

L'application des données de la chronobiologie et de la chronopharmacologie au traitement des maladies conduit à la chronothérapie. La chronothérapie concerne l'influence du moment d'un traitement sur son efficacité thérapeutique. Cette approche doit intégrer des données chronopharmacologiques et chronopathologiques. La

chronothérapie conduit à un meilleur usage des xénobiotiques dans le traitement des maladies et a pour objectif d'améliorer l'efficacité et/ou la tolérance des drogues en programmant leur administration. Chez l'homme, les maladies concernées sont celles pour lesquelles les données scientifiques justifient cette approche : asthme, arthrite, ulcère duodéal, le cancer, les diabètes, maladies cardiovasculaires, l'hypercholestéronémie, les ulcères et les désordres neurologiques.

Le SCN génère le rythme circadien activité-repos et coordonne les oscillateurs périphériques . L'alternance lumière et obscurité est le principal synchronisateur du système circadien. Cette synchronisation permet de prédire l'amplitude et la phase des rythmes du métabolisme et de la prolifération cellulaire (figure 14). Ces rythmes vont influencer la pharmacologie et la tolérance vis-à-vis d'anti-cancéreux et/ou leur efficacité. Le rythme repos-activité est un marqueur fiable du fonctionnement de l'horloge circadienne et constitue le rythme de référence utilisé pour la programmation des traitements.

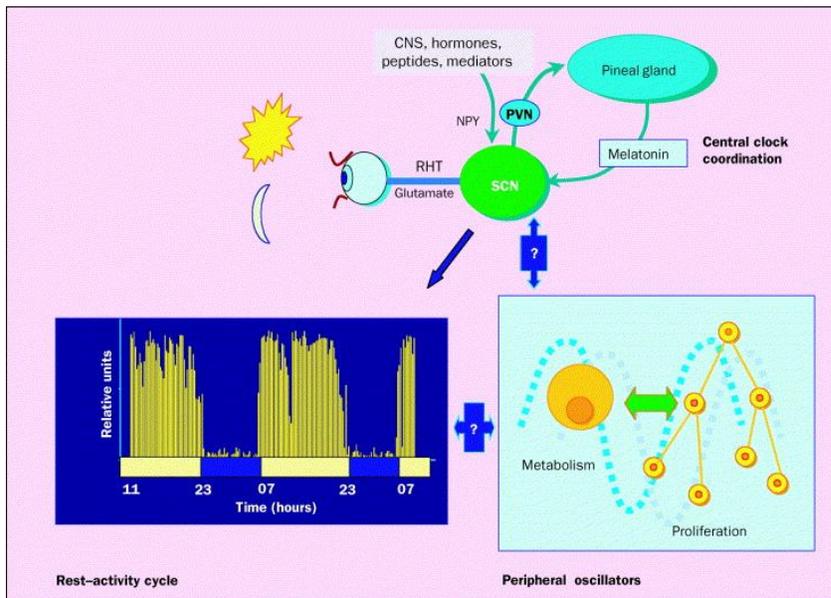


Figure 14 : Vue schématique du schéma circadien chez l'homme. Le noyau suprachiasmatique est le générateur de rythmes circadiens dont la période du SCN est contrôlée par l'alternance lumière-obscurité. permet l'établissement de rythmes physiologiques comme le rythme activité-repos et coordonne plusieurs rythmes circadiens dont ceux qui modulent le métabolisme et la prolifération cellulaires. RHT : tractus rétino-hypothalamique, PVN : noyau paraventriculaire, NPY, neuropeptide Y.

Des études expérimentales réalisées chez le rat ou la souris synchronisés avec une alternance de 12h de lumière, 12h d'obscurité ont montré que le moment de

l'administration d'un anticancéreux influence sa toxicité. Dans la plupart des cas, la survie varie d'un facteur de 2 à 8 en fonction de l'heure d'administration (figure 15). La classe thérapeutique du médicament et des organes cibles pour les effets toxiques ne permettent pas de prédire le moment où il sera le mieux toléré. Il a été montré que l'administration d'un anti-cancéreux au moment où est le mieux toléré est associée à une meilleure efficacité anti-tumorale. L'augmentation de l'efficacité est généralement permise par une augmentation de 30 à 50% des doses au moment où la tolérance est maximale. Néanmoins, des modèle tumoraux ont permis d'identifier un rythme circadien de l'activité anti-tumorale qui coïncide avec le rythme de tolérance pour des doses non toxiques (inférieures à la dose maximale tolérée). Dans les modèles expérimentaux, l'administration d'un anti-cancéreux à la dose maximale tolérée est nécessaire pour améliorer la survie. L'application de ces résultats aux patients atteints de cancer doit permettre d'élaborer le protocole qui permet d'améliorer la qualité de vie des malades à travers la réduction de l'incidence des effets toxiques en maintenant la même efficacité anti-tumorale ou qui permet de prolonger la survie ou augmenter le taux de guérison en reproduisant une tolérance identique à celle des traitements standards.

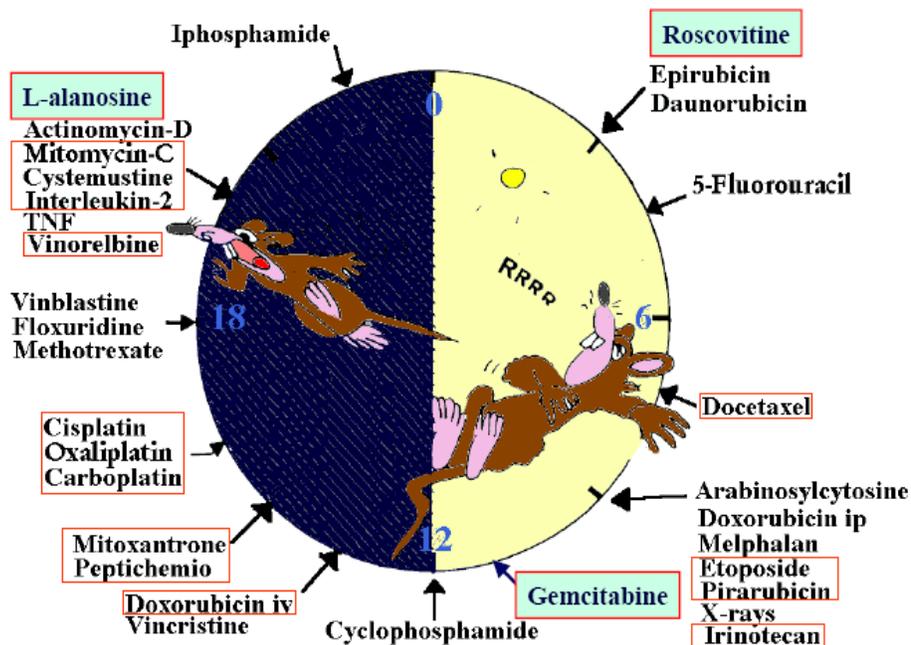


Figure 15 : Rythme circadien de la tolérance vis-à-vis d'anti-cancéreux chez la souris ou le rat. Le moment où un agent cytotatique ou immunologique est le moins toxique est indiqué par une flèche en fonction du cycle activité-repos. Iv : administration intraveineuse, TNF : Tumor Necrosis Factor (Mormont et Levi, Cancer 2003, 97 :155).

## 3. Rythmes circadiens et physiologie saisonnière

### 3.1. *Photopériodisme et mesure de la durée du jour*

---

#### 3.1.1. Système saisonnier

L'existence d'une physiologie saisonnière permet la survie de l'espèce dans un environnement variable. C'est ainsi qu'en hiver, il y a réduction à la fois de la disponibilité alimentaire et de la température environnante, l'animal doit donc être capable de s'adapter à ces changements importants de son environnement. Pour cela, les adaptations physiologiques doivent anticiper les variations périodiques de l'environnement climatique et trophique. En effet, de nombreux animaux doivent faire leur stock de graisse avant l'hiver et les oiseaux migrateurs doivent effectuer leur voyage pendant que les conditions climatiques le leur permettent. Avec la même finalité, la naissance des jeunes doit se dérouler pendant la période de l'année la plus favorable, c'est à dire, dans la majorité des cas, au printemps. Pour se repérer dans le temps annuel, la plupart des animaux saisonniers utilisent les variations de la durée d'éclairement sur 24 heures ou la photopériode. En effet, la photopériode représente un indicateur précis et robuste de la période de l'année permet à l'organisme d'anticiper les changements saisonniers et d'organiser les processus biologiques saisonniers.

Le processus par l'intermédiaire duquel les organismes sont capables d'utiliser à la fois la mesure absolue de la durée du jour et le sens de variation de la durée du jour pour réguler les changements saisonniers d'une fonction physiologique ou comportementale est appelé « photopériodisme ». Concernant les rythmes de reproduction chez les animaux sensibles à la photopériode, on distingue, les **animaux de jours longs** se reproduisant lorsque la durée du jour augmente et, les **animaux de jours courts** se reproduisant lorsque la durée du jour diminue. Il existe une relation entre la nature de la réponse photopériodique qui est selon les espèces de type jours longs (photogonadostimulation en jours croissants) et les espèces de jours courts (réactivation de la fonction gonadique en jours décroissants) et la durée de gestation. L'intervalle conception-naissance étant presque toujours constant pour une espèce donnée, la régulation de la saisonnalité porte sur le moment de la conception ; ce qui permet d'avoir dans tous les cas un maximum de naissances au printemps.

### **3.1.2. Modèles pour expliquer la mesure du temps**

Le photopériodisme est fréquemment associé à une oscillation endogène qui produit des rythmes biologiques annuels. La mesure de la durée du jour qui est une composante essentielle du photopériodisme est accomplie via un mécanisme qui implique un oscillateur circadien. Les animaux arrivent en quelque sorte à mesurer le temps extérieur, à lire la photopériode... Bunning (1960) a été le premier à suggérer que le système circadien peut être utilisé pour mesurer la durée du jour. Il a proposé que la lumière si elle est présente à une certaine phase du rythme circadien peut avoir des effets inducteurs et entraîner des réponses de type « jours longs ». En l'absence de lumière au cours de la phase photosensible, les animaux exprimeraient une réponse de type « jours courts ». L'hypothèse de Bunning a été formulée sous la forme du modèle de "coïncidence externe" (figure 16A), qui postule la présence d'une période de photosensibilité de l'organisme qui permettrait de déclencher les réponses physiologiques en fonction de la présence ou de l'absence d'éclairement pendant cette période. Dans ce modèle, ce n'est pas la durée de photopériode qui est importante en soi mais c'est le moment où la lumière est présente qui est déterminante. Ainsi, la réponse physiologique dépendra de la présence de la lumière lorsque les animaux présentent leur période endogène de sensibilité à la lumière.

Le second modèle, proposé par Pittendrigh (1960, 1972), modèle de "coïncidence interne", suppose l'existence de deux oscillateurs circadiens, l'un du matin (M, "morning") et l'un du soir (E, "evening") (figure 16B). Ces oscillateurs seraient entraînés par la transition nuit/jour et jour/nuit, respectivement. De ce fait, ni la durée de la nuit ni la durée du jour ne sont déterminantes, mais ce sont les relations de phase entre les deux oscillateurs, variables au cours des saisons, qui permettent l'adaptation des animaux.

Une schématisation de ces 2 modèles est donnée par la figure 16.

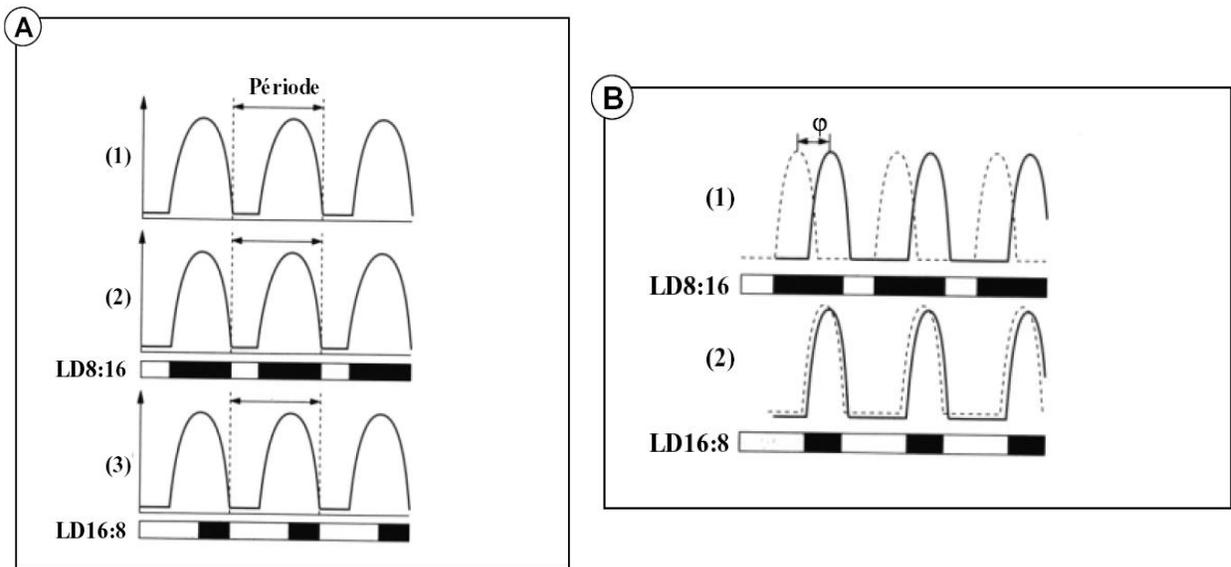


Figure 16 : **Deux modèles hypothétiques pour expliquer la mesure du temps photopériodique** (d'après Boissin et Canguilhem, 1998). Deux modèles sont proposés pour expliquer la mesure du temps photopériodique, c'est à dire en fonction des durées d'éclairage sur 24 heures (représentées par des barres blanches et noires pour les périodes de lumière et d'obscurité, respectivement). A. Le modèle de coïncidence externe. (1) représentation du cycle circadien de la période de photosensibilité, cette période est différente de 24 heures (2) les cycles LD8:16 (8h de lumière, 16h d'obscurité) confèrent une période égale à 24h et la lumière n'atteint pas la phase de photosensibilité ; (3) les cycles LD16:8 (16h de lumière, 8h d'obscurité) confèrent une période égale à 24 heures et la lumière atteint la phase de photosensibilité. B. Le modèle de coïncidence interne. Les effets physiologiques sont produits lorsque deux rythmes circadiens présentent entre eux des relations de phase particulières. Le rythme représenté en pointillé est entraîné par le cycle LD (1) et, quand la durée de l'éclairage le permet, sa phase entre en coïncidence avec le cycle représenté en trait continu

## ***3.2. Contrôle photopériodique des rythmes saisonniers de reproduction***

### **3.2.1. Contrôle photopériodique de la reproduction des ovins**

Les ovins originaires des zones tempérées manifestent d'importantes variations saisonnières de leur activité sexuelle. Ainsi ; la brebis présente au cours de l'année une alternance entre une saison sexuelle et une saison d'anoestrus. La saison sexuelle débute pendant les jours décroissants de l'automne et est caractérisée, en l'absence de gestation, par la succession de cycles oestriens d'une durée de 16 à 18 jours (figure 17). La période d'anoestrus dure 6 mois et est caractérisée par l'absence d'ovulation et de comportement d'oestrus. Chez le mâle, des variations saisonnières de l'efficacité de la spermatogenèse sont également mises en évidence.

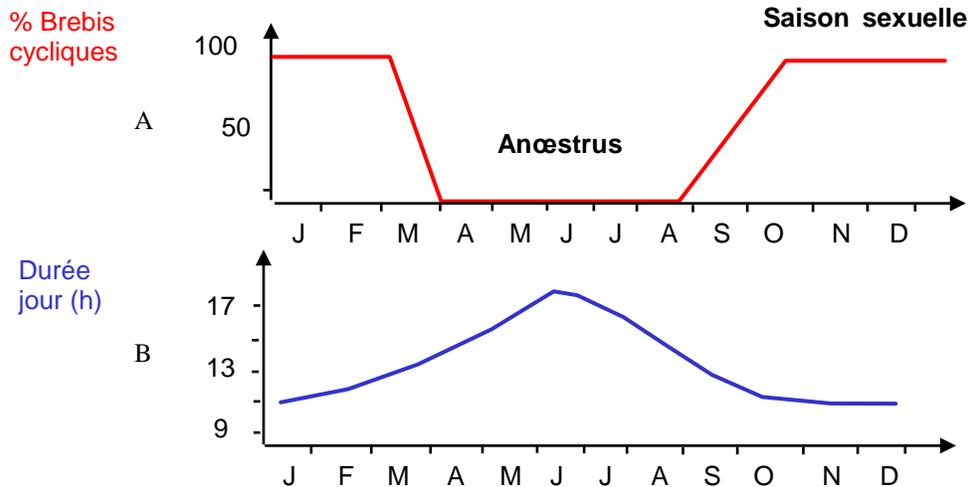


Figure 17 : Schéma de l'évolution au cours de l'année du pourcentage de brebis qui présentent une activité ovulatoire cyclique (A) et cycle naturel de la durée du jour (B)

Deux types d'expérience ont permis de démontrer que la photopériode est le paramètre environnemental qui contrôle le début et la durée de la saison sexuelle. En 1937, Marshall a montré que la saisonnalité chez la brebis est largement contrôlée par les facteurs de l'environnement. Ainsi, l'inversion des saisons par le transport des brebis de l'hémisphère Nord à l'hémisphère Sud entraîne une inversion du cycle reproductif des brebis. La saison sexuelle a lieu pendant l'automne de l'hémisphère Sud. Cette expérience n'avait pas démontré le rôle d'un facteur particulier de l'environnement car les variations annuelles des paramètres environnementaux sont associées (photopériode, température, régime des pluies).

Au cours des 30 années suivantes, des expériences utilisant des régimes lumineux artificiels ont permis de dissocier la photopériode des autres facteurs de l'environnement et d'établir le rôle déterminant de la durée du jour dans la régulation du cycle annuel de reproduction de la brebis. L'inversion du cycle annuel de la photopériode déplace la saison sexuelle de 6 mois. La cyclicité ovarienne débute pendant les jours décroissants et s'interrompt pendant les jours croissants (figure 18).

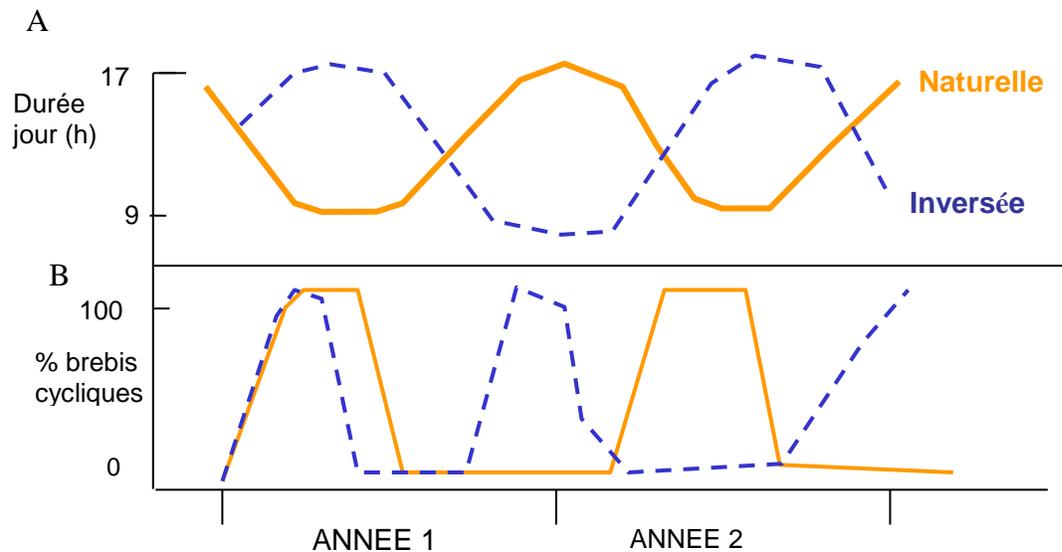


Figure 18 : Effet de l'inversion du cycle photopériodique annuel sur l'organisation temporelle du cycle annuel de reproduction de la brebis

A : Le trait plein correspond au cycle naturel de la durée du jour et, le trait en pointillé au cycle inversé de la durée du jour.

B : Pourcentage de brebis qui présentent une activité ovulatoire cyclique quand elles sont soumises aux variations naturelles de la photopériode (trait plein) et aux variations inverses de la photopériode cycle naturel de la durée du jour (trait pointillé).

L'utilisation de rythmes photopériodiques semestriels qui reproduisent en six mois les variations normalement annuelles de la photopériode se traduit par l'apparition de 2 périodes d'activité sexuelle par an. Par ailleurs, l'alternance tous les 90 jours ou 120 jours entre des jours courts constants (8h de lumière par jour) et des jours longs constants (16h de lumière par jour) montre que le passage en jours courts induit une reprise de l'activité sexuelle après un temps de latence de 50 jours (figure 19). Les jours courts peuvent donc stimuler l'activité de reproduction. Par contre, le passage en jours longs entraîne l'arrêt de l'activité sexuelle après 30 jours. Les jours longs sont donc inhibiteurs de l'activité de reproduction.

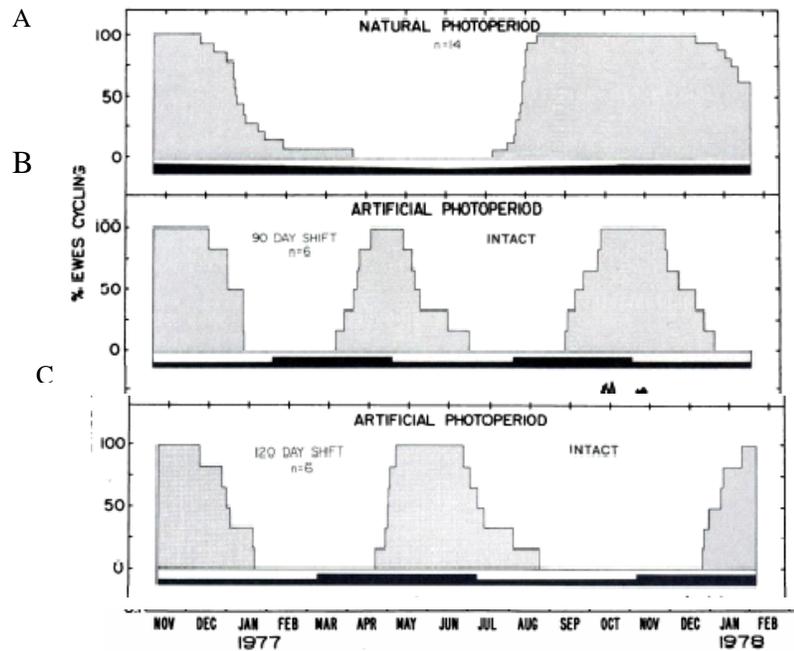


Figure 19 : Activité ovulatoire des brebis soumises (A) aux variations normales de la photopériode. (B) à l'alternance tous les 90 jours de jours courts constants (8 h de lumière par 24h) et de jours longs constants (16h de lumière par 24h). (C) à l'alternance tous les 120 jours de jours courts constants (8 h de lumière par 24h) et de jours longs constants (16h de lumière par 24h). Les aires grisées correspondent au pourcentage de femelles présentant une activité ovulatoire cyclique. Les barres en bas de chaque histogramme représentent les quantités relatives de lumière (surface blanche) et d'obscurité (surface noire, d'après Legan et Karsch, 1980, Biol Reprod 23 : 1061).

Les effets de la photopériode s'exercent via le contrôle de la sécrétion pulsatile de LH. Une pulsatilité insuffisante de LH est responsable de l'absence d'ovulation au cours de l'anoestrus saisonnier. Deux types d'effet de la photopériode sur les sécrétions de LH ont pu être mis en évidence : un effet direct ou indépendant des stéroïdes et un effet dépendant des stéroïdes (variations saisonnières de sensibilité à la rétroaction négative de l'oestradiol).

### 3.2.2. Etats photoréfractaires

Il a été longtemps pensé que le début de la saison sexuelle résultait de l'action de la photopériode décroissante après le solstice d'été et que la fin de la saison sexuelle était la conséquence des effets inhibiteurs de la photopériode croissante après le solstice

d'hiver. Selon cette hypothèse, le niveau d'activité de la fonction de reproduction serait imposé en permanence par la durée du jour. Or il a été démontré que la perception de la diminution de la durée du jour après le solstice d'été n'était pas nécessaire pour le déclenchement de l'activité sexuelle au moment normal. De même, l'activité sexuelle s'interrompt normalement après le solstice d'hiver en l'absence d'une augmentation de la durée du jour. Par conséquent, les transitions entre conditions physiologiques opposées ne sont pas activées directement par les changements de la durée du jour au moment où elles se produisent. En conditions naturelles, aux périodes de l'année où les brebis passent de l'activité au repos sexuel et inversement, l'information photopériodique ambiante n'est pas utilisée pour imposer une réponse reproductive.

Le début de la saison sexuelle semble résulter d'une perte de sensibilité ou développement d'un état réfractaire aux effets inhibiteurs des jours longs (**état photoréfractaire**). Alternativement, la fin de la saison sexuelle résulterait d'une perte de sensibilité ou développement d'un état réfractaire aux effets stimulants des jours courts.

L'installation d'une phase photoréfractaire qui est un phénomène d'échappement au contrôle photopériodique jouerait un rôle adaptatif. Chez les ovins, ces états photoréfractaires seraient l'expression d'un rythme endogène sous-jacent de reproduction. L'existence de ce rythme a été établie à la suite de l'observation de la persistance d'un rythme de reproduction avec une période proche de un an, en l'absence de changements de photopériode. Ainsi, des brebis maintenues sous une photopériode constante continuent à montrer des alternances entre des périodes d'activité et de repos sexuels mais les rythmes de reproduction ne sont plus synchronisés entre les animaux et avec le cycle naturel annuel de la photopériode.

L'observation d'un rythme endogène de reproduction suggère l'existence d'une horloge circannuelle. Le rôle de la photopériode serait de fournir à l'horloge une indication de la période de l'année, information qui serait utilisée pour synchroniser le cycle endogène en lui imposant des décalages de phase à certaines périodes de l'année. Par exemple, le moment de la perception des jours longs au début du printemps apparaît critique pour déterminer le début de la saison sexuelle (figure 20). L'information photopériodique serait donc utilisée par l'animal pour synchroniser le cycle endogène de reproduction avec le cycle naturel de la photopériode, et non pour dicter une réponse reproductive.

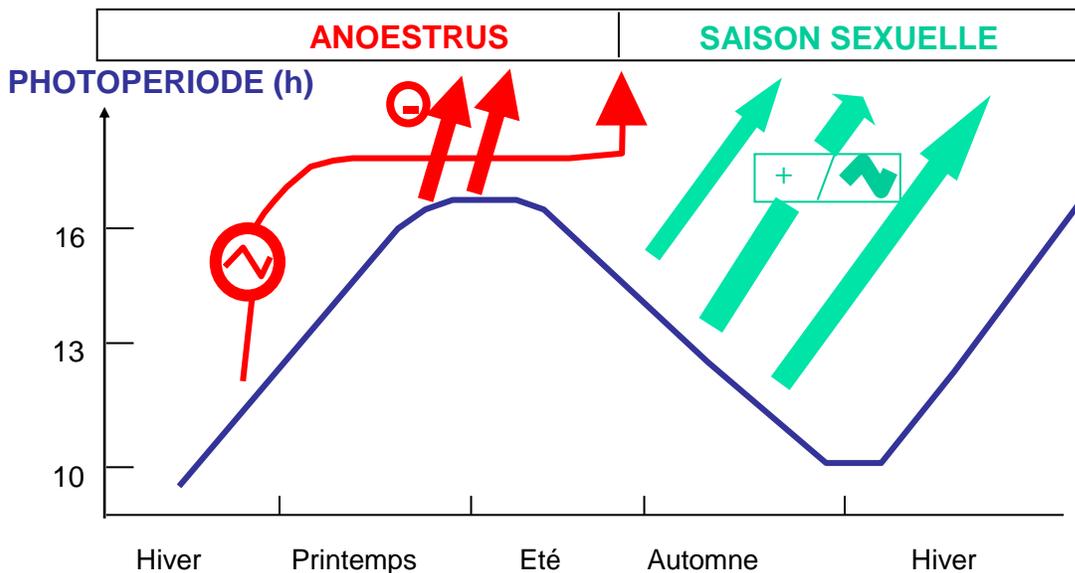


Figure 20: Modèle conceptuel de la régulation temporelle du cycle annuel de reproduction de la brebis. Ce modèle repose sur les observations expérimentales suivantes : (1) l'augmentation de la durée du jour entre les solstices d'hiver et d'été est nécessaire à l'occurrence de la saison sexuelle au cours de l'automne. (2) Le moment de l'exposition initiale aux jours croissants constitue une donnée importante pour la détermination du début de la saison sexuelle. (3) Le début de la saison sexuelle ne dépend pas de la photopériode décroissante après le solstice d'été et ne nécessite pas de l'arrêt de la croissance de la durée du jour à cette période. Un composant essentiel de ce modèle est le rôle critique du moment de la perception de l'augmentation de la durée du jour dans l'initiation au début du printemps d'un processus qui conduira à la reprise de l'activité sexuelle au cours de l'automne (d'après Malpoux et al., 1989. J Endocrinol, 122 : 269).

### **3.3. Rôle de la mélatonine chez les animaux photopériodiques**

#### **3.3.1. Contrôle de la sécrétion de mélatonine**

La mélatonine est une hormone libérée par la glande pinéale (ou épiphyse) uniquement pendant la phase nocturne du nyctémère. Diverses études, notamment de traçage, ont pu mettre en évidence la voie polysynaptique permettant le contrôle de cette glande endocrine par les SCN (figure 21).

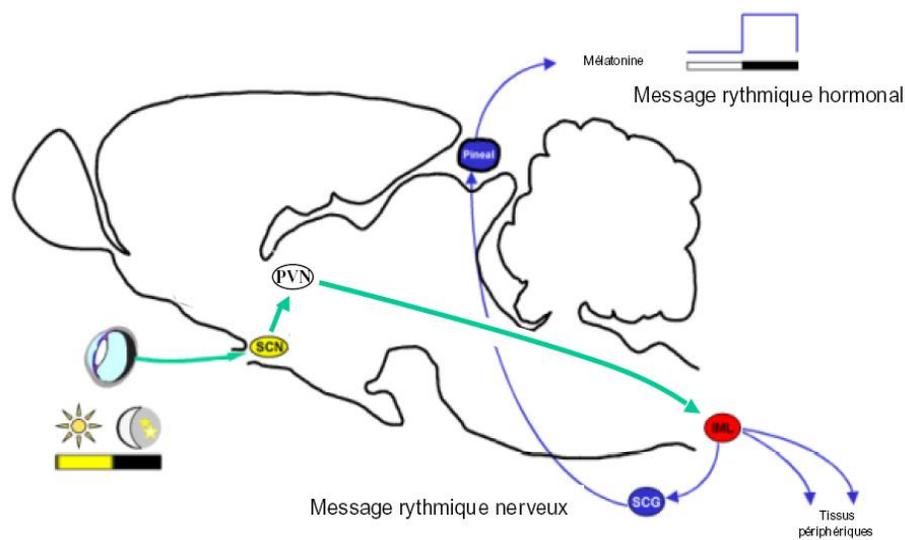


Figure 21: **Représentation schématique de la voie polysynaptique permettant aux NSC de contrôler la synthèse de mélatonine.** IML, colonne intermédiolatérale de la moelle épinière ; PVN, noyaux paraventriculaires hypothalamiques ; SCG, ganglions cervicaux supérieurs.

Brièvement, les PVN, la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière et les ganglions cervicaux supérieurs, servent de relais de l'information entre les SCN et la glande pinéale. La **mélatonine** est issue d'un acide-aminé : le **tryptophane**, précurseur de la sérotonine qui est stockée dans la glande pinéale pendant la journée. L'AA-NAT (Aryl-acrylamine N-acétyl transferase) est l'enzyme limitante de la synthèse de mélatonine car cette enzyme est photosensible. Le rythme de présence des ARNm de l'*Aa-nat* comme celui de la libération de mélatonine est aboli par lésion de l'une des structures de la voie de contrôle, confirmant ainsi leur implication dans cette voie polysynaptique. Chez les rongeurs, le contrôle de l'activité de l'AA-NAT s'effectue au niveau transcriptionnel et, une fois traduite en protéine, l'enzyme est directement active. Le contrôle de synthèse et de libération de mélatonine est donc dû au contrôle transcriptionnel du gène *Aa-nat* chez les rongeurs. Chez le mouton, la transcription de l'AA-NAT est constitutive, le contrôle est post-translationnel. En effet, bien que la synthèse de AA-NAT soit constante sur 24 heures, l'activité de l'enzyme est plus élevée de nuit ce qui aurait pour origine une inhibition nocturne de sa dégradation. Les SCN, via leurs projections vers les PVN, permettent de contrôler la libération de mélatonine par un jeu d'activation (glutamate) et d'inhibition (GABA) de leurs neurones cibles situés dans les PVN.

Nous avons vu que l'information lumineuse (photopériodique) perçue par les photorécepteurs rétiniens est transmise au noyau suprachiasmatique par la voie rétinohypothalamique monosynaptique. A partir des NSC, les informations sont transférées à la glande pinéale par une voie polyneuronal complexe encore mal connue se terminant par des fibres noradrénergiques originaires des ganglions cervicaux supérieurs. La glande pinéale intervient donc en transcrivant l'information lumineuse en un message endocrinien : la sécrétion de mélatonine. Ainsi, la mélatonine, dont l'enzyme limitante pour sa synthèse est l'AA-NAT permet de transmettre une information journalière à l'organisme. De plus, le pic de mélatonine présente des adaptations saisonnières en terme notamment de durée.

### **3.3.2. Synthèse de la mélatonine et variations circadiennes et saisonnières.**

La synthèse de mélatonine est initiée par la fixation de la noradrénaline aux récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques des pinéalocytes. La mélatonine est synthétisée pendant la phase sombre du nyctémère à partir du tryptophane plasmatique. Ce dernier est transformé en sérotonine après hydroxylation et décarboxylation. La N-acétyl transférase transforme la sérotonine en N-acétylsérotonine. La mélatonine ou 5-méthoxy-tryptamine résulte de la méthylation de la N-acétylsérotonine par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase. La N-acétyl transférase est l'enzyme clé de cette synthèse car son activité est inhibée en présence de lumière. Une fois synthétisée, la mélatonine est directement libérée dans la circulation où sa demi-vie est courte (environ 20 min). Ce rythme de synthèse est endogène et persiste donc en conditions constantes du moment que l'intégrité des SCN est préservée et, une exposition nocturne des animaux à la lumière entraîne une inhibition de sa synthèse/libération. La libération de mélatonine a lieu non seulement dans la circulation sanguine mais aussi dans le fluide céphalorachidien où, chez le mouton, les plus fortes concentrations de mélatonine sont trouvées. Au cours des saisons, la durée de la nuit varie, elle est associée à une variation similaire de la durée du pic de mélatonine. Le contrôle saisonnier de la synthèse de mélatonine s'effectue par un contrôle direct de la durée d'expression de l'*Aa-na*. chez la brebis, les taux circulants diurnes de mélatonine sont faibles (10-50 pg/ml, figure 22). Ces taux augmentent pour atteindre quelques centaines de pg/ml

au cours de la nuit. La durée de présence de niveaux élevés de mélatonine est égale à la durée de la nuit. Une autre propriété du rythme de sécrétion de mélatonine est le rapide ajustement de la sécrétion à un changement photopériodique. Ainsi, après une diminution abrupte de la durée du jour (de 16 à 8 heures de lumière) l'augmentation des taux plasmatiques de mélatonine débutent plus tôt dès la première nuit. Le rythme de sécrétion de mélatonine est entraîné par le cycle lumineux.

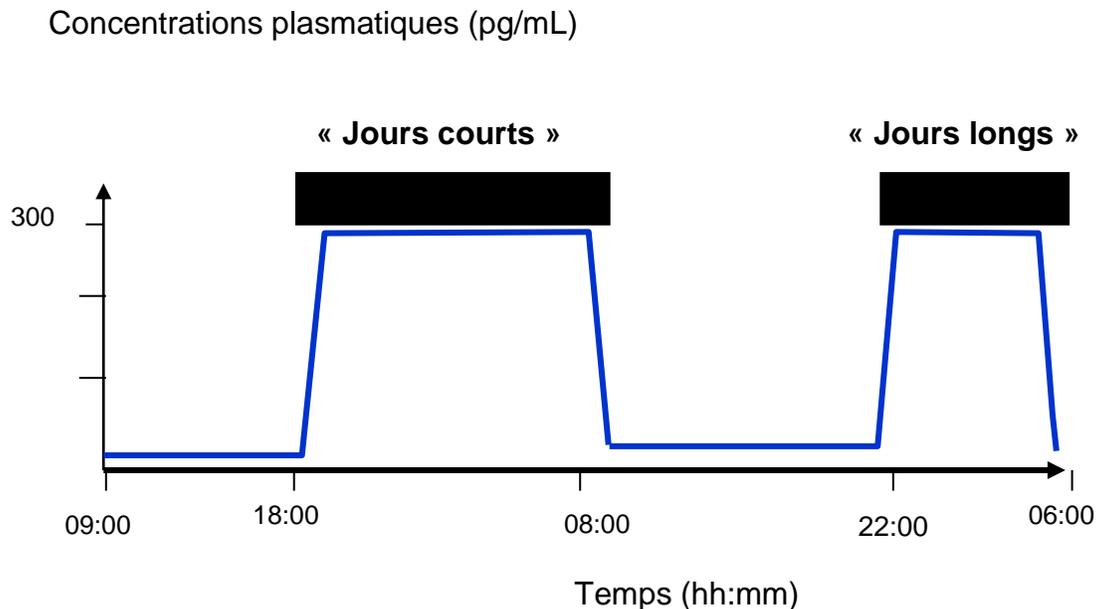


Figure 22 : Schéma des variations nyctémérales des concentrations plasmatiques en mélatonine chez la brebis. Les barres noires indiquent la durée de la nuit.

La durée de sécrétion nocturne de mélatonine proportionnelle à la durée de la nuit courte pendant les jours longs du printemps et de l'été et longue pendant les jours courts de l'automne et de l'hiver constitue un message photopériodique endocrinien qui permet de lire l'information photopériodique (longueur relative du jour ou de la nuit qui varie au cours de l'année).

### **3.3.3. Les effets de la mélatonine**

#### ***La mélatonine et ses récepteurs***

Avant même d'avoir réussi à caractériser la nature des récepteurs de la mélatonine, de nombreuses équipes ont cherché à mettre en évidence leur présence. Dans ces études, les auteurs ont réalisé des autoradiographies avec de la mélatonine marquée à l'iode

125 ou de la 2-iodo-mélatonine ce qui permettait ensuite, par autoradiographie de mettre en évidence les sites de fixation de la mélatonine. Par ces méthodes, plus d'une centaine de structures cérébrales a pu être détectée chez les mammifères mais avec une importante variabilité pour la localisation et le nombre de structures marquées entre espèces, pour la densité du marquage entre différentes structures chez une même espèce et entre différentes espèces pour une même structure. Au total, seuls les SCN et la *Pars tuberalis* apparaissent marqués de façon conservée entre les différentes espèces étudiées. Deux types de récepteurs membranaires de haute affinité à la mélatonine MT1 et MT2 ont été clonés. Une des cibles de la mélatonine est la pars tuberalis de l'hypophyse des rongeurs. Ce qui caractérise la *pars tuberalis* et le distingue des autres tissus est que la mélatonine via le récepteur MT1 y exerce un contrôle de l'expression de *Per1*, ce qui suggère que ces gènes pourraient participer aux mécanismes de lecture du signal endocrinien.

### ***Effets circadiens***

La réponse journalière de l'organisme à la mélatonine a été étudiée par le biais de la pinéalectomie permettant une privation de mélatonine ou à l'inverse, d'infusions à plus ou moins long terme de mélatonine. **A court terme, l'application de mélatonine** (ou d'un agoniste de la mélatonine) **provoque des avances de phases** du rythme d'activité électrique des neurones sur des tranches de SCN en culture, **ces avances de phase ne sont possibles que si la mélatonine est injectée en fin de jour.**

Au niveau des SCN, plusieurs travaux rapportent des voies possibles pour l'action de la mélatonine. D'une part, la PK<sub>C</sub> semble prendre part à la voie de signalisation moléculaire sous l'effet de la mélatonine. Des avances de phase de l'activité électrique en fin de jour sont provoquées par l'activation de la PK<sub>C</sub> mais par contre, l'inactivation de la PK<sub>C</sub> inhibe celles induites par la mélatonine (McArthur *et al.*, 1997).

L'effet chronobiotique de la mélatonine **à long terme** qui a été certainement le mieux démontré est sa capacité à entraîner le rythme d'activité locomotrice du rat et de *Arvicantis ansorgei*. Concernant les différents effets circadiens provoqués par la mélatonine, certaines limites aux conclusions doivent être mentionnées. (1), ces effets ne sont possibles qu'en utilisant des doses pharmacologiques de mélatonine. (2), ces effets ne sont observés qu'en conditions particulières (étude effectuée uniquement en

SP pour le rythme d'expression d'AA-NAT effets différents entre LD et DD pour celui de mélatonine endogène). Et, (3), les effets les plus marqués sont restreints à une fenêtre temporelle située en fin de jour, un horaire où normalement, la mélatonine endogène n'est pas produite.

### **Effets saisonniers**

L'effet le plus remarquable de la mélatonine est sa capacité à entraîner le rythme annuel d'activité sexuelle chez les animaux photopériodiques

Sur des brebis pinéalectomisées, les effets inhibiteurs des jours longs et stimulants des jours courts peuvent être mimés par la perfusion de mélatonine selon un protocole de type « jour court » (maintien de taux élevés de mélatonine pendant 16 heures par jour), ou selon un protocole de type « jour long » (maintien de taux élevés pendant 8 h par jour). L'effet de la mélatonine sur l'activité ovulatoire mime celui de la photopériode et s'exerce via des changements dans la pulsativité de LH.

En résumé, les bases neuroendocriniennes du contrôle photopériodique de l'activité de reproduction de la brebis reposent sur le schéma suivant. L'information lumineuse active les photorécepteurs rétiniens qui transmettent l'information via le noyau suprachiasmatique jusqu'à la glande pinéale qui traduit le message neuronal en un message endocrinien sous la forme d'un rythme circadien de sécrétion de mélatonine. Ce rythme de sécrétion détermine la capacité du système générateur de pulses de LH à répondre à la rétroaction négative de l'oestradiol. Un message de type « jour long » est interprété comme inhibiteur car il s'accompagne d'une sensibilité élevée du système nerveux à la rétroaction négative de l'oestradiol qui induit une inhibition de la fréquence des pulses de GnRH et de LH et est ainsi responsable de l'arrêt des cycles oestriens (figure 23).

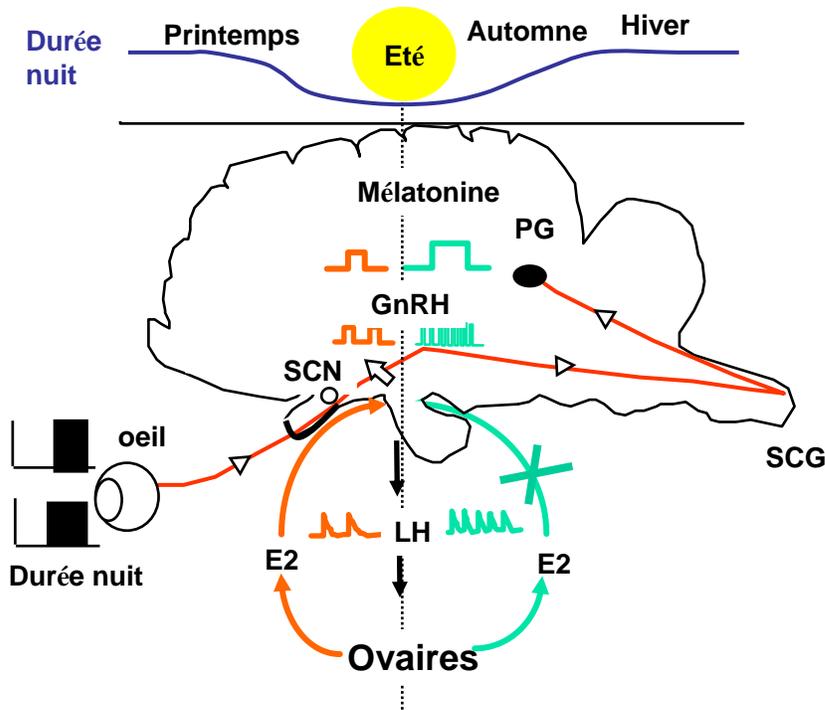


Figure 23 : Le contrôle neuroendocrinien de la reproduction saisonnière de la brebis. SCN, noyau suprachiasmatique. PG, glande pinéale. SCG, ganglions cervicaux supérieurs. E2, Oestradiol.

L'information lumineuse est reçue par les photorécepteurs rétiniens et transmise à la glande pinéale via les noyaux suprachiasmatiques et les ganglions cervicaux supérieurs. La glande pinéale traduit le message neuronal en un message endocrinien, le rythme nyctéméral de sécrétion de mélatonine. Pendant les jours courts, le profil de sécrétion de mélatonine (longue durée de présence de concentrations élevées de mélatonine) est associé à la stimulation de la sécrétion pulsatile de GnRH alors qu'au cours des jours longs, le profil de sécrétion de mélatonine (durée courte de présence de niveaux élevés de mélatonine) est responsable de l'inhibition des sécrétions de GnRH. L'hypophyse antérieure sécrète LH en réponse aux pulses de GnRH. La fréquence résultante des pulses de L détermine la cyclicité ovarienne. Une variation saisonnière de la sensibilité du système nerveux au rétrocontrôle de l'oestradiol constitue le principal mécanisme responsable de l'inhibition des sécrétions de LH au cours des jours longs.

Un message de type « jour court » est interprété comme stimulant car il s'accompagne d'une faible sensibilité du système nerveux à la rétroaction négative de l'oestradiol. Il en résulte une fréquence élevée des pulses de GnRH et de LH et le maintien des cycles oestriens.

La nature a choisi d'employer une organisation temporelle complexe pour s'assurer de la naissance des agneaux au moment de l'année le plus favorable à leur survie. C'est un système remarquable qui permet qu'un rythme circannuel soit entraîné par un rythme circadien de sécrétion de mélatonine qui agit via un rythme circulaire d'activité du système hypothalamohypophysaire pour réguler des cycles oestriens de 16 jours.

Ces résultats ont des applications directes en élevage ou dans les centres d'insémination artificielle qui utilisent les traitements photopériodiques et/ou la mélatonine sous la forme d'un implant sous cutané (Mélovine®) pour contrôler l'activité de reproduction des petits ruminants.

Ainsi, l'administration continue de mélatonine par un implant sous cutané permet de mettre artificiellement les animaux en jours courts alors que leurs yeux perçoivent les jours longs naturels du printemps et de l'été et reproduit l'effet de jours courts sur la sécrétion de LH. Pour que la mélatonine puisse exercer cet effet de type jours courts stimulateur des sécrétions de LH, il faut que les petits ruminants aient été exposés pendant suffisamment de temps aux jours longs du printemps pour annuler l'état photoréfractaire aux jours courts et sensibiliser les animaux à l'effet stimulateur de la mélatonine qui sera observé 50 jours après la mise en place de l'implant. Ces effets sont observés lorsque le traitement à la mélatonine débute le 18 juin et il a été montré que la mélatonine doit être administrée pendant une période supérieure à 36 jours (durée optimale de 70 jours) pour avancer la saison de reproduction de 50-52 jours. Ainsi, chez la brebis conduite en lutte naturelle, un implant sous-cutané de mélatonine (Mélovine®) est inséré de 30 à 40 jours avant l'introduction des béliers.

Les différents essais réalisés depuis plusieurs années chez 5 races françaises montrent que la fécondité des brebis traitées est très supérieure à celle des brebis témoins (16 agneaux nés en plus pour 100 brebis mises en lutte). Les dates moyennes de mise bas sont plus précoces et moins étalées chez les traitées que chez les témoins. Chez la brebis également, cette fois-ci en association avec un traitement hormonal de synchronisation de l'oestrus et une insémination artificielle, la fécondité des brebis traitées, pour l'ensemble oestrus induit plus retours, est aussi très significativement supérieure à celle des brebis témoins (30 agneaux nés en plus pour 100 brebis mises à la reproduction).

Chez la chèvre, du fait de la forte demande existante pour une lutte en pleine contre-saison (avril à juillet), il est recommandé de faire subir un traitement lumineux (éclairage supplémentaire avec aube fixe et "flash" nocturne) pendant une période d'au moins 2 mois avant la pose de l'implant de mélatonine. Les boucs reçoivent le même traitement ; les femelles sont séparées de tout contact avec les mâles à partir de

la pose de l'implant. La lutte naturelle se fait en introduisant les boucs traités parmi les femelles, de 35 à 70 jours après la pose de l'implant, de façon à bénéficier de "l'effet bouc". Dans ces conditions, la fertilité est voisine de celle observée en lutte naturelle pendant la saison sexuelle (supérieure à 80 %) et les fécondations ont lieu environ 10 jours après l'introduction des mâles. La prolificité est équivalente à celle observée en saison sexuelle.

Chez le mâle, la réponse gonadique (activité gamétogénétique) n'obéit pas à la loi du tout ou rien comme chez la femelle et des protocoles lumineux utilisant une alternance rapide (2 mois) entre des jours longs et des jours courts permet le maintien d'une activité spermatogénétique tout au long de l'année.

Chez le bélier, l'insertion d'implants permet une avance de la croissance testiculaire et une amélioration de la production spermatique. Si l'on souhaite obtenir une activité spermatogénétique intense en pleine contre-saison, comme chez les mâles des centres d'IA, il est nécessaire de faire précéder la pose de l'implant d'une période de jours longs réels ou mimés par une heure d'éclairement nocturne. Un tel traitement stimule la croissance testiculaire, améliore le comportement sexuel, la production spermatique et augmente la fertilité après IA, par rapport aux béliers non traités. Il est également possible de faire subir aux béliers reproducteurs une alternance d'un mois de jours longs et d'un mois de jours courts, ce qui induit le maintien d'une activité spermatogénétique élevée et constante pendant plusieurs années. En bâtiment ouvert, sur des mâles laissés en photopériode naturelle, l'alternance d'un mois où une heure d'éclairement nocturne est imposé avec un mois d'implant de mélatonine permet d'aboutir aux mêmes résultats (figure 24). Dans ces conditions, le poids testiculaire des béliers Ile-de-France traités reste élevé pendant presque 2 ans, alors que celui des béliers témoins conduits dans les mêmes conditions d'élevage subit les variations habituelles.

Chez le bouc, le même type d'alternance rapide entre jours longs et jours courts permet de maintenir une production spermatique élevée de bonne qualité pendant au moins trois années consécutives. Dans ces conditions, le nombre de doses de semence congelée produites est très supérieur chez les animaux traités par rapport aux animaux témoins (+41 à +69 %). La fertilité des chèvres inséminées artificiellement avec de telles

doses n'est pas différente de celle des chèvres inséminées avec la semence des boucs témoins.

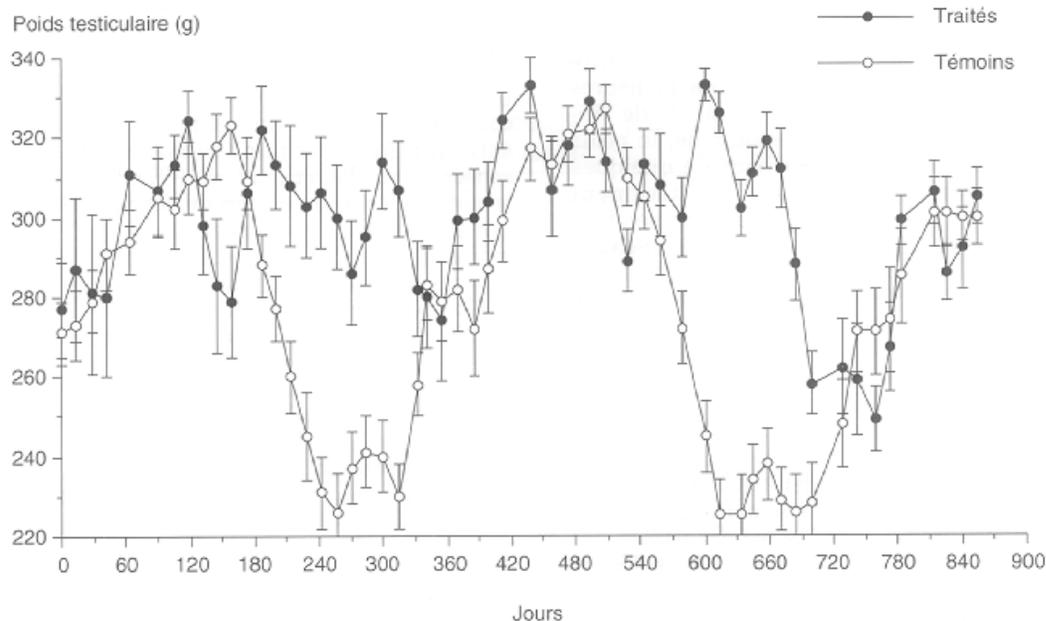


Figure 24 : Evolution du poids testiculaire moyen de béliers Ile-de-France, témoins ou traités avec une alternance d'un mois où une heure d'éclairage nocturne était imposée avec un mois d'implant sous cutané de mélatonine (Malpaux et al., 1993, In Melatonin Biosynthesis, physiological effects and clinical applications. HS Yu and RJ Reiter eds, 253.

## Conclusion

Les noyaux suprachiasmatiques (SCN) des mammifères sont le siège de l'horloge circadienne endogène entraînée à 24 heures par le cycle jour/nuit, leur rythmicité endogène est générée par des boucles de régulations auto-entretenues de l'expression de "gènes horloges". Ces derniers permettent la transmission à l'organisme des informations rythmiques journalières. Ainsi, la synthèse de certaines hormones dont la mélatonine, sont des exemples de fonctions physiologiques contrôlées par les NSC. La structure temporelle de l'organisme à l'origine de variations temporelles des paramètres biologiques doit être prise en compte lors de l'établissement d'un diagnostic et dans le

cadre d'une approche thérapeutique, en particulier pour certains médicaments comme les anti-cancéreux.

Parallèlement aux variations journalières des paramètres biologiques, les animaux présentent une physiologie adaptée aux variations saisonnières de l'environnement. Ce repérage dans le temps annuel nécessite que les animaux intègrent les variations de la photopériode (durée d'éclairement sur 24 heures). Le messager endocrinien qui permet à l'organisme de se situer dans le temps est la mélatonine. Sa capacité à entraîner le rythme annuel d'activité sexuelle des petits ruminants est à la base des applications de la mélatonine à la maîtrise de la reproduction chez les petits ruminants.