

Mécanismes de plasticité structurale associés à la synchronisation photique de l'horloge circadienne au sein du noyau suprachiasmatique

Olivier Bosler¹, Clémence Girardet¹, Dominique Sage-Ciocca², Hélène Jacomy³, Anne-Marie François-Bellan¹ et Denis Becquet¹

¹ Centre de Recherche en Neurobiologie-Neurophysiologie de Marseille, CNRS-UMR 6231, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, secteur nord, boulevard Pierre Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France

² IFR des Neurosciences de Strasbourg, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France

³ Laboratoire de Neuroimmunovirologie, Institut National de la Recherche Scientifique, 531 boulevard des Prairies, Laval, Quebec, Canada H7V 1B7

Auteur correspondant : Olivier Bosler, olivier.bosler@univmed.fr

Reçu le 25 février 2008

Résumé – L'horloge circadienne des mammifères, dont la composante centrale est localisée dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (NSC), préside à la rythmicité et à l'organisation temporelle des fonctions métaboliques, physiologiques et comportementales. L'adaptation de l'organisme à son environnement implique sa remise à l'heure constante sur le cycle solaire de 24 h, ce qui est assuré principalement par le mécanisme de la synchronisation photique. Celui-ci agit sur le mécanisme moléculaire à la base des oscillations circadiennes tout en ajustant les relations de phase mutuelles entre les multiples oscillateurs cellulaires qui composent le NSC et dont le fonctionnement cohérent détermine l'élaboration du message rythmique qui sera distribué à tout l'organisme. Ces ajustements s'accompagnent de la mise en jeu de mécanismes de plasticité structurale permettant des remaniements de l'architecture du réseau neuro-glial du NSC. Les deux populations neuronales à l'origine des principales efférences du NSC, les neurones à VIP (peptide intestinal vasoactif) qui constituent des cibles majeures d'intégration des messages photiques et les neurones à AVP (arginine-vasopressine) impliqués dans le transfert des informations rythmiques vers les structures effectrices, contribuent à ces mécanismes. Elles sont ainsi soumises, au cours du cycle jour/nuit, à des modifications de l'étendue de leurs surfaces d'apposition à des prolongements astrocytaires, des terminaisons axonales et/ou des éléments somato-dendritiques. Cette plasticité neuro-gliale de l'horloge centrale est dépendante de la lumière puisque l'expression rythmique de la protéine acide gliofibrillaire (GFAP), marqueur astrocytaire dont l'utilisation en tant qu'index dynamique de plasticité structurale au sein du NSC a été validée, disparaît en conditions d'obscurité constante. Les glucocorticoïdes circulants, que l'on sait être d'importantes sorties endocrines de l'horloge et des messages de synchronisation pour l'ensemble de l'organisme, régulent l'amplitude du pic d'expression de la GFAP et exerceraient ainsi une action modulatrice sur la plasticité astrocytaire du NSC, et donc sur les remaniements nyctéméraux de la configuration de son réseau neuro-glial. La conception selon laquelle cette plasticité est associée à la synchronisation photique de l'horloge est appuyée par d'autres données montrant que les fluctuations journalières des glucocorticoïdes circulants renforcent la résistance de l'horloge aux variations de la photopériode et sont donc effectivement impliquées dans la modulation des effets de la lumière. Il est ainsi proposé que l'intégration par l'horloge des fluctuations de l'environnement serait liée aux capacités singulières de plasticité structurale du NSC.

Mots clés : Horloge circadienne / noyau suprachiasmatique / plasticité / astrocytes / glucocorticoïdes

Abstract – Mechanisms of structural plasticity associated with photic synchronization of the circadian clock within the suprachiasmatic nucleus.

The mammalian circadian clock, whose central component is located in the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus (SCN), orchestrates rhythmic events in metabolism, physiology and behavior. Adaptation of the organism to its environment requires precise adjustment of the clock to the 24 h astronomical time, primarily by the light/dark cycle. Photic synchronization acts on both the molecular loops which trigger circadian oscillations and the phasing of the multiple SCN cellular oscillators whose coordination permits elaboration of the rhythmic message that will be distributed throughout the organism. It is concomitant with structural plastic events characterized by day/night rearrangements of the SCN neuronal-glia network. The two main sources of SCN efferents, namely the VIP (vasoactive intestinal peptide)-synthesizing neurons which are major integrators of photic signals and the AVP (arginine-vasopressin)-synthesizing neurons which are known to importantly contribute to conveying rhythmic messages to brain targets, are involved in these mechanisms. Over the light/dark cycle, they indeed undergo ultrastructural changes in the extent of their membrane coverage by glial, axon terminal and/or somato-dendritic elements. These structural rearrangements appear to be dependent on light entrainment, as the rhythmic expression in SCN of glial fibrillary acidic protein (GFAP), a marker for brain astrocytes whose changing expression has proved to be a reliable index of neuronal-glia plasticity, is disrupted under constant darkness. Glucocorticoid hormones, which are known as important endocrine outputs of the clock, are required to maintain amplitude of the SCN GFAP rhythm to normal values, indicating that they modulate astrocytic plasticity within the SCN and, therefore, nycthemeral changes of the configuration of its neuronal-glia network. The view that such plastic events may subservise synchronization of the clock to the light-dark cycle is reinforced by other data showing that the daily fluctuations of circulating glucocorticoids actually are involved in modulation of light effects, contributing to the resistance of the circadian timing system to variations of the photoperiod. It is thus proposed that the capacity of the clock to integrate cyclic variations of the environment rely on the inherent capacity of the SCN to undergo neuronal-glia plasticity.

Key words: Circadian clock / suprachiasmatic nucleus / plastic / astrocyte / glucocorticoids

Introduction

La rythmicité des fonctions biologiques, essentielle à l'organisation temporelle des activités physiologiques et comportementales, est d'autant plus fondamentale dans les processus adaptatifs qu'elle offre à l'organisme la possibilité non seulement de répondre aux exigences métaboliques, journalières et saisonnières, mais aussi d'anticiper les changements de l'environnement en intégrant le temps solaire (Albrecht, 2006). Cela suppose que le mécanisme endogène qui règle le fonctionnement de l'horloge circadienne sur une période proche de 24 heures soit ajusté en permanence sur le cycle jour/nuit (synchronisation photique), tout en intégrant d'autres variables de l'environnement (synchronisation non photique). La composante centrale de cette horloge est localisée dans le noyau suprachiasmatic (NSC), une petite structure paire de l'hypothalamus antérieur qui regroupe, à la base du cerveau et de part et d'autre du 3^e ventricule cérébral, quelque 20 000 neurones chez les mammifères. On sait aujourd'hui que ce noyau, dans lequel sont intégrées

les informations environnementales, préside en fait à un système hautement hiérarchisé, le système circadien, qui inclut de multiples oscillateurs secondaires, centraux et périphériques (Hastings *et al.*, 2003). Ceux-ci reçoivent en permanence des signaux de synchronisation de l'horloge centrale et sont responsables, au final, de l'expression des fonctions rythmiques (Fig. 1).

À la suite des avancées spectaculaires qui ont montré l'origine intracellulaire de l'oscillation circadienne en identifiant des gènes spécifiques, les gènes-horloge, impliqués dans des boucles d'autorégulation transcriptionnelle (Ko & Takahashi, 2006), une autre étape marquante a été la mise en évidence de l'importance de la signalisation intercellulaire au sein du NSC pour le fonctionnement cohérent de l'horloge. Il a en effet été montré que chaque oscillateur cellulaire du NSC rythme selon ses propres caractéristiques, génétiquement déterminées, et que c'est le maintien de relations de phase déterminées entre les différents oscillateurs qui le composent qui offre au

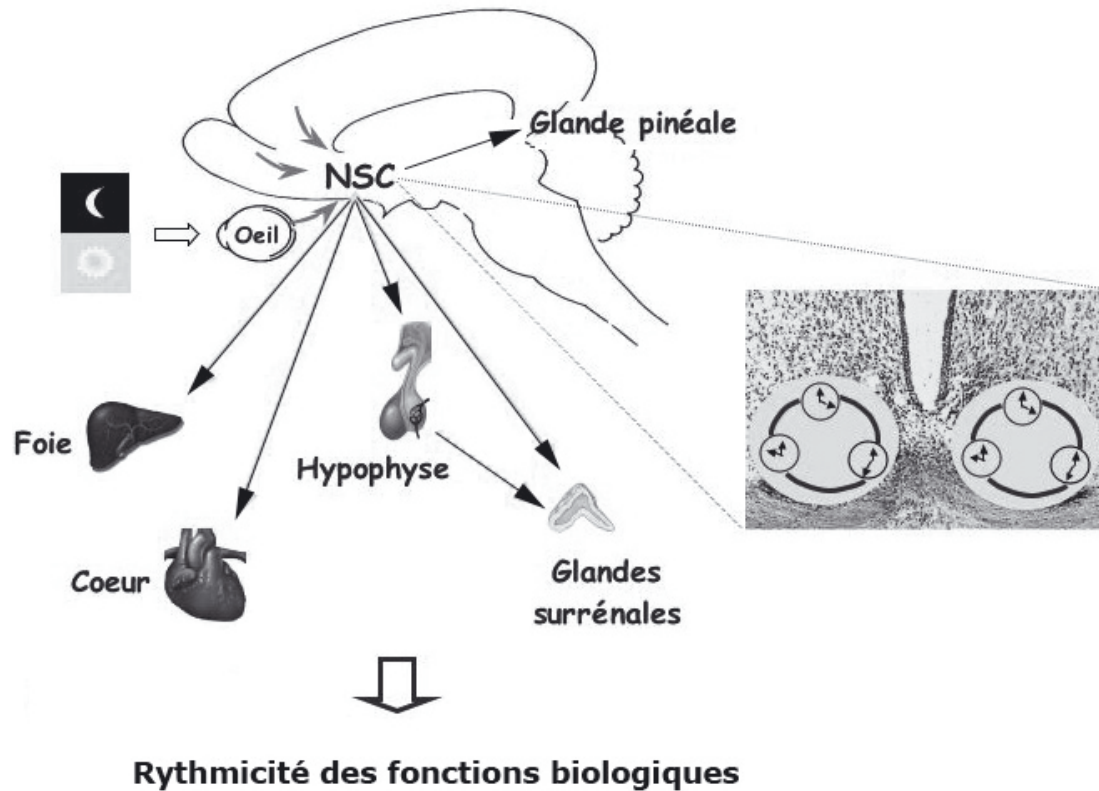


Fig. 1. Organisation hiérarchique du système circadien des mammifères. L'horloge centrale, localisée dans le noyau suprachiasmatique (NSC), intègre les informations environnementales, au premier rang desquelles le cycle solaire journalier, et assure le fonctionnement cohérent du réseau des oscillateurs périphériques de l'organisme *via* des messages de synchronisation nerveux et humoraux. L'élaboration d'un message rythmique résulte du fonctionnement coordonné des multiples oscillateurs cellulaires qui composent le NSC et qui maintiennent entre eux des relations de phase déterminées et constamment réajustées par les signaux photiques.

NSC sa capacité à générer un rythme global d'activité sur une échelle de 24 heures (Guilding & Piggins, 2007; Maywood *et al.*, 2007; Nakamura *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2003). La synchronisation photique, à l'origine du caractère strictement « nyctéméral » de la rythmicité, impliquerait alors l'intégration de signaux permettant de réajuster en permanence les périodes respectives des oscillateurs cellulaires du NSC, si bien que, sous conditions d'alternance jour/nuit, existerait un équilibre permanent entre la synchronisation endogène de ces oscillateurs et leurs déphasages en réponse à la lumière. Dans ce schéma, la spécificité fonctionnelle du NSC au regard des autres oscillateurs centraux et périphériques résiderait donc dans la singularité de ses mécanismes de communication intercellulaire, plutôt que dans une spécificité des mécanismes intracellulaires mis en jeu pour l'élaboration de la rythmicité.

Si les mécanismes ioniques et de couplage électrique jouent un rôle important dans la synchronisation intercellulaire du NSC (Long *et al.*, 2005; Michel & Colwell, 2001), le rôle fondamental joué par

la communication synaptique au sein d'un réseau associant neurones et glie a également été mis en exergue (Shirakawa *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2003). Dans cette conception, les capacités de l'horloge à intégrer les fluctuations de l'environnement pourraient être liées aux potentialités de plasticité structurale de ce réseau. C'est l'hypothèse que nous développons après avoir pu démontrer formellement que le NSC est effectivement soumis à des réorganisations journalières de son architecture neuro-gliale, dépendante de l'alternance jour/nuit (Becquet *et al.*, 2008). Avant de décrire ces données et d'en discuter les implications, nous ferons un point succinct de l'état actuel des connaissances concernant l'organisation anatomofonctionnelle du NSC.

Organisation et architecture synaptique du noyau suprachiasmatique

On admet classiquement que le NSC comprend deux régions distinctes au plan anatomique et fonctionnel, une subdivision dite « core » spécialisée dans la

réception et l'intégration des messages photiques et une subdivision dite « *shell* », plus spécialisée dans la transmission des messages circadiens aux structures effectrices (Antle & Silver, 2005). Ces deux régions sont reliées anatomiquement au travers d'un réseau synaptique complexe (Romijn *et al.*, 1997). La subdivision « *core* » correspond à la partie ventrolatérale du noyau qui constitue le principal territoire de projection des afférences rétiniennes véhiculant l'information photique. Ces afférences cheminent jusqu'au NSC de manière directe (voie photique primaire) mais aussi de manière indirecte, *via* un relais par les feuilletts intergénéculés latéraux du thalamus (IGL, voie photique secondaire). Les deux voies photiques utilisent respectivement comme neuromédiateurs le glutamate associé au PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*) et le neuropeptide Y associé au GABA (Fig. 2). Elles ont pour cibles synaptiques l'une des deux populations peptidiques majeures du NSC, composée de neurones synthétisant le VIP (*Vasoactive Intestinal Polypeptide*), ainsi que des neurones synthétisant le GRP (*Gastrin Releasing Peptide*). Les neurones à VIP co-expriment un autre peptide issu d'un gène commun, le PHI (*Peptide Histidine Isoleucine*). Pour certains d'entre eux, au moins chez le rat, le GRP y est également colocalisé et contribue ainsi à définir différentes entités fonctionnelles au sein de la population à VIP (Guillaumond *et al.*, 2007; Kawamoto *et al.*, 2003; Romijn *et al.*, 1996). Ces peptides et leurs ARN messagers ont pour caractéristique de n'être exprimés de manière rythmique que sous conditions d'alternance jour/nuit (rythmicité nyctémérale), et non en condition d'obscurité constante (absence de rythmicité circadienne), ce qui témoigne de leur régulation par la lumière (Inouye & Shibata, 1994). La subdivision « *shell* » du NSC, peu innervée par les afférences rétiniennes, correspond quant à elle à la partie dorsomédiane du noyau où elle est délimitée par une population compacte de neurones synthétisant de l'arginine-vasopressine (AVP). Ceux-ci constituent, avec les neurones à VIP, la deuxième source majeure d'afférences du NSC. Contrairement au VIP, l'AVP est exprimée dans le NSC de manière nyctémérale mais aussi circadienne.

Chez le rat, les phénotypes VIP et AVP représentent respectivement 37 % et 25 % de la population neuronale totale du NSC, riche par ailleurs en astrocytes qui forment un réseau dense et particulièrement bien développé dans la région des neurones à VIP (Fig. 2). Les territoires de projection du NSC sont essentiellement intra-hypothalamiques (aire préoptique, zone sous-paraventriculaire, aire rétrochiasmatique et noyau dorsomédian notamment). Parmi les principales structures cibles extra-hypothalamiques, on note en particulier le noyau paraventriculaire thalamique et l'IGL

par lequel transite la voie photique secondaire (voir ci-dessus). Les deux types de neurones sont également à l'origine d'un important plexus d'innervation intrinsèque. On sait ainsi que les neurones à AVP sont des cibles synaptiques majeures pour les neurones à VIP, les deux populations étant en fait mutuellement interconnectées comme nous avons pu le démontrer en microscopie électronique (Jacomy *et al.*, 1999).

Les autres phénotypes neuronaux qui ont été décrits dans le NSC ont une distribution qui ne permet pas toujours de les associer à l'une ou l'autre de ces entités fonctionnelles. Chez le hamster, il existe cependant un groupe de neurones exprimant la calbindine, dont la localisation est également restreinte à la région « *core* ». Il en est de même de neurones à substance P qui co-expriment majoritairement la calbindine et de neurones à corticolibérine (CRF). Les principaux autres peptides qui ont également été mis en évidence comprennent plus particulièrement, chez le rat, la somatostatine qui est produite par un groupe de neurones localisés dans une région à l'interface des neurones à VIP et à AVP, la calrétinine qui est exprimée dans les régions dorsale et latérale du NSC, ainsi que l'enképhaline et l'angiotensine II qui sont colocalisées partiellement ou entièrement avec l'AVP (Moore *et al.*, 2002). Notons par ailleurs que le GABA, qui est le médiateur le plus largement représenté au sein du NSC (van den Pol & Tsujimoto, 1985), serait également exprimé par la majorité sinon la totalité des neurones du noyau (Moore & Speh, 1993; Okamura *et al.*, 1989). La présence d'un groupe intrinsèque de neurones à glutamate susceptibles de donner lieu à une innervation intrinsèque distincte de l'innervation rétinienne a également été rapportée (Kiss *et al.*, 2007).

Il a été récemment souligné que la superposition de l'ensemble des données anatomo-fonctionnelles disponibles sur le NSC des rongeurs, compliquée par d'importantes variabilités inter-espèces (rat, souris, hamster), témoignerait en fait d'une organisation beaucoup plus complexe que celle basée sur la simple distinction entre une région ventrolatérale « *core* » et une région dorsomédiane « *shell* », voire même entre trois ou quatre subdivisions (Kalsbeek *et al.*, 2006; Morin, 2007; Morin *et al.*, 2006). Au plan anatomique, on note par exemple que quelques neurones à AVP sont détectables dans la région « *core* » et que les afférences rétiniennes ne se projettent pas exclusivement dans cette région. L'analyse des territoires de projection d'une autre voie afférente majeure au NSC, composée de fibres à sérotonine (5-HT) issues majoritairement du noyau raphé médian et dont on connaît le rôle dans la modulation de l'information photique (Morin & Allen, 2006), contribue également à cette complexité. De fait, les territoires d'innervation sérotoninergique du NSC ne se superposent que partiellement à ceux de la projection

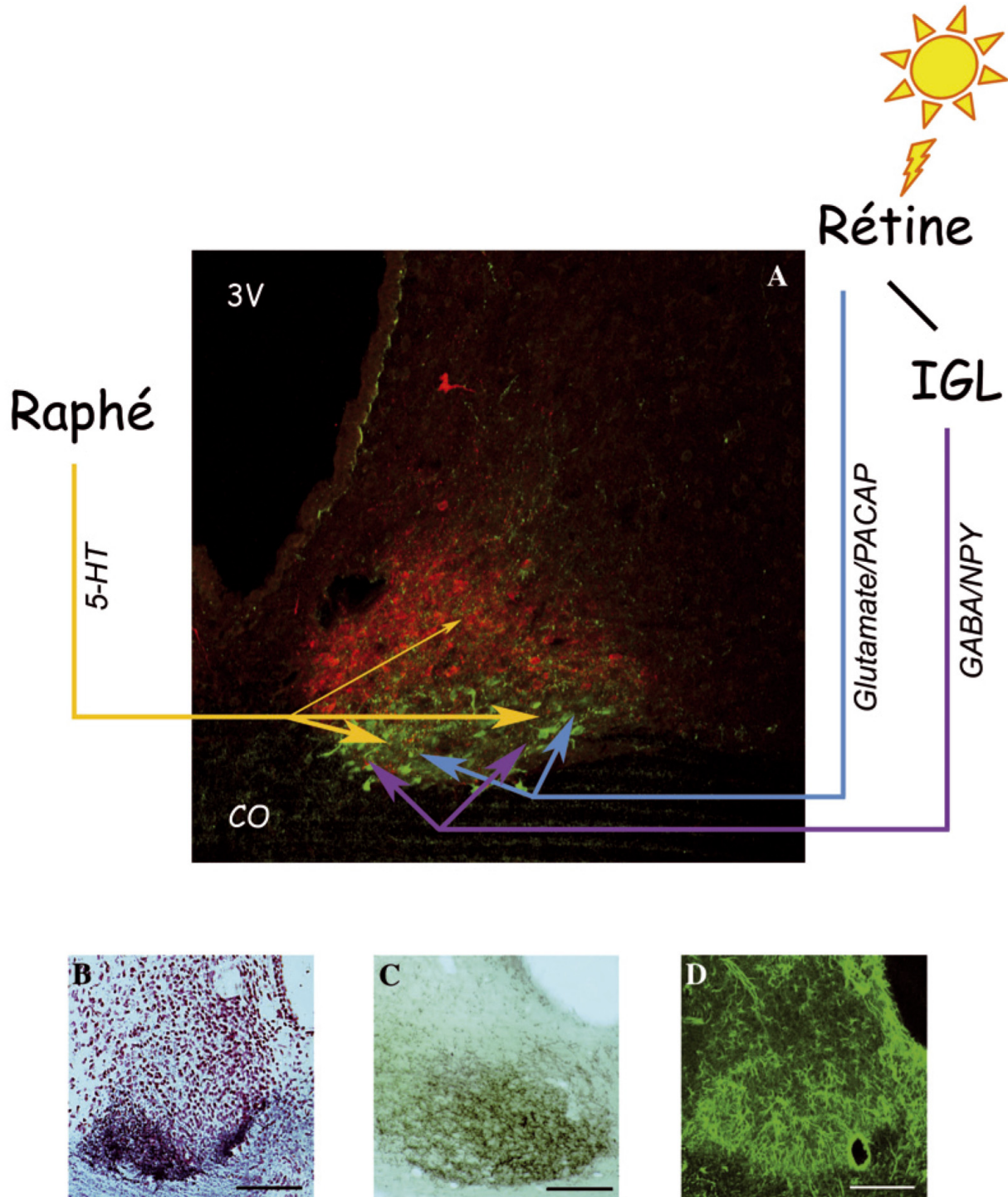


Fig. 2. Organisation anatomique et neurocytochimique du NSC. A – Les neurones à VIP (vert) et à AVP (rouge) délimitent deux régions fonctionnellement distinctes (marquages en immunofluorescence). Les trois principales voies d'entrée sur le noyau convergent vers la région ventrale où prédominent les neurones à VIP. Les afférences sérotoninergiques (5-HT) se projettent également de manière notable sur la région dorsale où prédominent les neurones à AVP. IGL : Feuilletts intergénéculés latéraux du thalamus. CO : chiasma optique; 3V : 3^e ventricule cérébral. B – Afférences rétiniennes marquées après transport antérograde de toxine cholérique et révélation immunohistochimique du traceur (peroxydase). C – Plexus sérotoninergique marqué à l'aide d'anticorps anti-5-HT (immunoperoxydase). D – Réseau astrocytaire révélé par immunofluorescence de la GFAP. Barres d'échelle : 100 μ m.

photique. Même si les terminaisons sérotoninergiques forment un plexus particulièrement dense ventralement, mais non sélectivement dans les parties ventrolatérales où les neurones à VIP constituent leurs cibles synaptiques privilégiées (Bosler & Beaudet, 1985), elles innervent également de manière très significative la partie dorsale, réalisant d'autres synapses avec les neurones à AVP (Jacomy & Bosler, non publié). Les données ultrastructurales obtenues au laboratoire, et dont quelques exemples sont présentés sur la figure 3, ont également apporté un support morphologique pour une libération non synaptique de la 5-HT dans le NSC. L'incidence synaptique des terminaisons sérotoninergiques du noyau a en effet été évaluée à 48 % (Boulaich *et al.*, 1994). Les afférences GABAergiques et glutamatergiques, à l'inverse, apparaissent largement sinon exclusivement synaptiques. De rares synapses catécholaminergiques, et notamment dopaminergiques, ont également été identifiées (Jacomy & Bosler, 1995).

Il reste néanmoins, au vu d'expériences spectaculaires réalisées sur tranches organotypiques de NSC issues de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle du promoteur d'un gène-horloge, le gène *per1*, qu'au moins deux entités fonctionnelles interagissent au sein du noyau pour assurer le fonctionnement cohérent de l'horloge. Ainsi, la synchronisation des cellules de la partie dorsale du NSC dont dépend l'élaboration d'un message circadien nécessite des signaux journaliers issus de la partie ventrale (Yamaguchi *et al.*, 2003). Le VIP et le GRP sont impliqués dans ces mécanismes de communication intra-NSC depuis la région ventrale (Antle & Silver, 2005) et, de fait, leur application *in vivo* ou *in vitro* sur tranches organotypiques de NSC induit des modifications d'activité rythmique similaires à celles produites sur l'activité locomotrice par un flash lumineux appliqué en période nocturne sur la rythmicité locomotrice (retard ou avance de phase selon le moment de l'application – *cf.* Piggins & Cutler, 2003) (Piggins *et al.*, 1995; McArthur *et al.*, 2000). Grâce à l'utilisation de souris déficientes en VIP ou chez lesquelles le récepteur VPAC2 a été inactivé, c'est le rôle prépondérant et plus global du VIP dans les mécanismes de synchronisation intercellulaire, et donc dans le fonctionnement cohérent du réseau des oscillateurs du NSC même en l'absence de toute information photique, qui a été mis en exergue (Aton *et al.*, 2005; Harmar *et al.*, 2002; Maywood *et al.*, 2006). Le GABA a également été identifié comme un acteur important de ces mécanismes, *via* ses récepteurs GABA_A (Albus *et al.*, 2005; Liu & Reppert, 2000). L'architecture du plexus GABAergique du NSC, très dense dans l'ensemble du noyau où il réalise de multiples synapses axo-somatiques et axo-dendritiques (Bosler, 1989; Buijs *et al.*, 1994), notamment sur les neurones à

VIP et à AVP (Castel & Morris, 2000; François-Bellan *et al.*, 1992; François-Bellan *et al.*, 1990), offre un support morphologique pour ce mécanisme.

De concert avec le GRP et le GABA, le VIP jouerait ainsi un double rôle dans la communication intra-NSC. Il agirait en effet à la fois dans la transmission vers la région dorsale des informations photiques intégrées dans la région ventrale et en tant qu'agent de couplage intercellulaire (Aida *et al.*, 2002; Piggins & Loudon, 2005). Les synchroniseurs externes, *via* les trois principales voies d'entrée sur le NSC (afférences rétinienne primaires et secondaires, afférences sérotoninergiques) mais aussi *via* la communication humorale et hormonale, réajusteraient ainsi en permanence les relations de phase mutuelles entre les différents oscillateurs cellulaires du NSC. Selon notre hypothèse, ces réajustements mettraient en jeu des mécanismes de plasticité par lesquels le NSC pourrait remanier la configuration de son réseau glial et de son architecture synaptique au cours du processus de synchronisation.

Plasticité structurale du noyau suprachiasmatique au cours du cycle jour/nuit. Contribution du réseau astrocytaire

Le concept selon lequel le NSC serait le siège de remaniements neuro-gliaux rythmiques nécessaires à la coordination fonctionnelle des oscillateurs cellulaires qui le composent est conforme à son statut de structure à fortes potentialités de plasticité. De fait, le NSC constitue l'une des quelques régions cérébrales, dont l'hippocampe, le bulbe olfactif, et les noyaux magnocellulaires de l'hypothalamus, où persistent chez l'adulte les formes embryonnaires polysialilées des protéines N-CAM (PSA-NCAM) que l'on sait atténuer l'adhérence cellulaire (Rutishauser, 2008). On sait par ailleurs très bien que les astrocytes, qui forment un réseau particulièrement dense dans le NSC (Morin *et al.*, 1989) et dont l'implication dans les mécanismes de l'horloge et sa synchronisation photique est établie (Prosser *et al.*, 1994; Servière & Laviaille, 1996), jouent un rôle important dans les mécanismes de plasticité structurale du système nerveux (Slezak *et al.*, 2006). Au sein de l'hypothalamus, l'implication de la plasticité astrocytaire dans la régulation de la densité des inputs synaptiques sur les neurones neurosécrétoires et/ou dans les mécanismes de couplage intercellulaire a notamment été mise en évidence chez la ratte, dans le système hypothalamo-neurohypophysaire au cours de la lactation, de la parturition ou en situation de déshydratation chronique (Hatton, 2004; Theodosis, 2002) et dans le noyau arqué au cours du cycle sexuel (Garcia-Segura *et al.*,

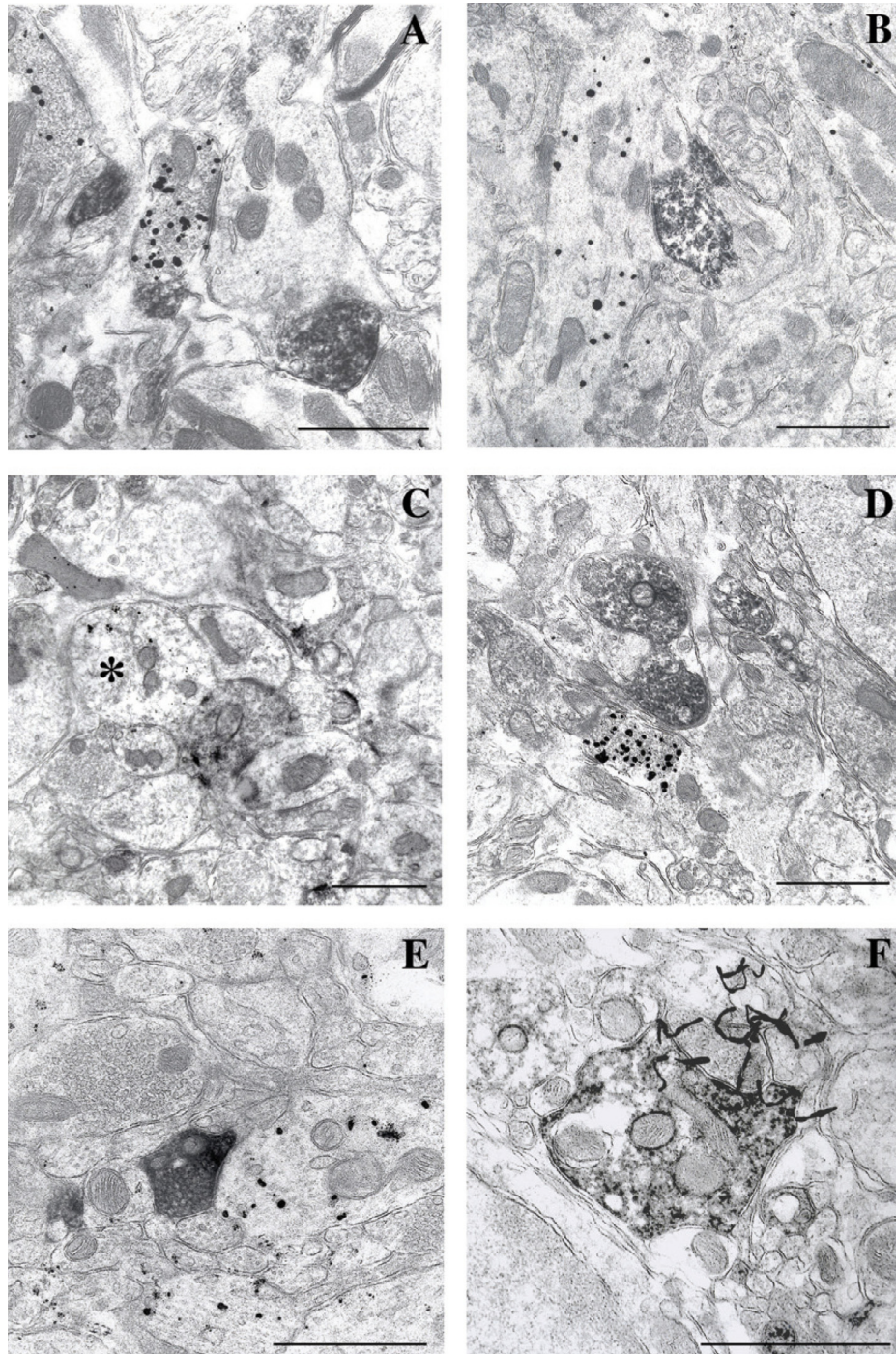


Fig. 3. Interactions cellulaires au sein du NSC révélées en microscopie électronique. A-E – Doubles marquages immunocytochimiques combinant la peroxydase (marquages gris-noir) et l'or colloïdal 1 nm intensifié par l'argent (marquages particuliers). A, B – Relations synaptiques des éléments à VIP (or-argent) et à AVP (peroxydase) : synapse VIP sur une dendrite non identifiée (A) et synapse AVP sur une dendrite à VIP (B). C – Terminaison rétinienne (traçage antérograde, peroxydase) faisant synapse sur trois profils dendritiques distincts, dont l'un est de nature VIPergique (or-argent) (*). D – Identification simultanée de plusieurs terminaisons GABAergiques (anti-GABA, peroxydase) et d'une terminaison sérotoninergique (anti-5-HT, or-argent). E – Synapse sérotoninergique (anti-5-HT, peroxydase) sur une dendrite à AVP (or-argent). F – Association de l'immunoperoxydase avec la radioautographie des sites de capture de ³H-5-HT. Synapse sérotoninergique (grains d'argent) sur une dendrite à VIP (peroxydase). Barres d'échelle : 1 μ m.

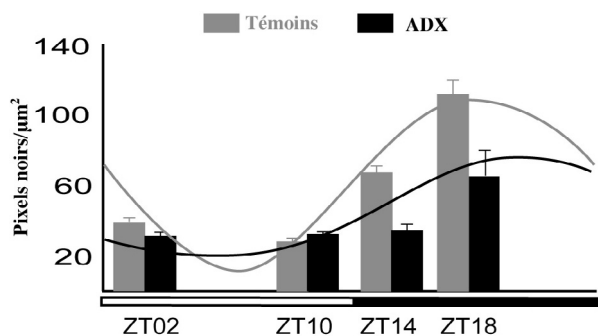


Fig. 4. Effet de la surrénalectomie sur la rythmicité nycthémerale de l'expression de GFAP dans le NSC. Données de l'analyse quantitative de l'immunoréactivité GFAP de la région ventrolatérale du NSC (surfaces de marquage) à quatre points du nycthémère (ZT12 = transition jour/nuit). Comparaison entre rats normaux (témoins) et rats soumis à une surrénalectomie bilatérale (ADX), maintenus sous photopériode 12L (lumière)/12D (obscurité). Les tracés, issus d'une modélisation par analyse cosinor (cf. Becquet *et al.*, 2008), montrent le caractère rythmique de l'expression de la GFAP avec présence d'un pic nocturne. La surrénalectomie n'altère pas la rythmicité mais diminue significativement l'amplitude du pic. Les barres horizontales indiquent les périodes de lumière et d'obscurité. ZT : *Zeitgeber Time*.

1999). Dans le NSC, il avait été initialement rapporté que la configuration du réseau astrocytaire chez le hamster dépendait de l'heure de la journée (Lavialle & Serviere, 1993), ce qui laissait présager l'existence de mécanismes de remodelage des interactions neurones/glie, semblables à ceux décrits dans l'hypothalamus neuroendocrine (Glass & Chen, 1999; Servière & Lavialle, 1996). Si des observations ultérieures chez d'autres espèces de rongeurs n'ont pas confirmé ces données, pour notre part nous avons pu conclure que, chez le rat, l'expression de la GFAP dans le NSC comporte bien une composante rythmique. De plus, nous avons pu apporter, par la microscopie électronique, la première démonstration directe que cette rythmicité s'accompagne effectivement d'une réorganisation structurale des interactions neurones/glie au cours du nycthémère (Becquet *et al.*, 2008).

L'analyse comparée de l'expression immunohisto-chimique de la GFAP dans le NSC à différents temps du nycthémère a tout d'abord révélé une densité astrocytaire significativement plus élevée durant la phase nocturne du cycle (Fig. 4). De plus, l'analyse quantitative des données a montré que cette augmentation nocturne concernait plus spécifiquement la partie ventrolatérale du noyau, là où se concentre la projection rétinienne. Sur la base de ces observations, nous avons analysé en microscopie électronique, chez des rats maintenus sous alternance de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité (12L/12D), l'environnement glial et

synaptique des neurones à VIP (région ventrale) et à AVP (région dorsale) marqués en immunoperoxydase. Deux temps nycthémeraux (« *Zeitgeber Time* » : ZT) correspondant respectivement au début de la phase diurne (2 h après l'éclairage : ZT02) et au milieu de la phase nocturne (6 h après l'extinction : ZT18) ont été comparés. Les résultats ont montré que les deux types de neurones sont soumis à des modifications jour/nuit de leurs couvertures gliale, synaptique et/ou somato-dendritique, évaluées après mesure de l'étendue du recouvrement de leur membrane, respectivement par des prolongements astrocytaires, des terminaisons nerveuses et d'autres éléments somatiques et dendritiques. Nous avons ainsi noté que la phase nocturne du cycle se caractérise (1) par une augmentation de la couverture astrocytaire des dendrites des neurones à VIP (+29 %), associée à une diminution de la couverture synaptique de ces neurones aux niveaux dendritique (-43 %) et somatique (-36 %), et (2) par une réduction de la couverture astrocytaire des dendrites des neurones à AVP (-19 %), concomitante d'une augmentation très significative de leur couverture somato-dendritique (somas : +96 % ; dendrites : +52 %). Les données relatives aux neurones à VIP sont illustrées sur la figure 5.

Ainsi, ces observations non seulement ont confirmé que le réseau astrocytaire du NSC est bien soumis à des remaniements structuraux au cours du cycle jour/nuit, mais ont également démontré que cette plasticité s'accompagne de réorganisations plus globales des interactions cellulaires, conformément à notre hypothèse. Le fait qu'elle affecte de manière différentielle les neurones à VIP et AVP n'est pas surprenant compte tenu des spécificités fonctionnelles très différentes de ces neurones. Concernant les neurones à AVP de la région dorsale où l'on sait que la densité cellulaire est la plus élevée (Van den Pol, 1980), l'élévation nocturne de l'étendue de leur surface de contact avec des éléments dendritiques et somatiques (y compris de même nature AVPergique) est frappante et permet d'envisager que, pendant la nuit, se produit une facilitation des processus de synchronisation intercellulaire impliquant cette catégorie neuronale. Le fait que la réduction de l'étendue de la couverture gliale des neurones à AVP ne s'accompagne pas, dans la partie dorsale du NSC, d'une modification de l'expression de la GFAP pourrait s'expliquer par une augmentation parallèle de la couverture gliale des autres phénotypes neuro-naux dans cette partie du noyau. Quoiqu'il en soit, cela montre que la plasticité astrocytaire d'une région donnée ne se traduit pas nécessairement par des modifications globales d'expression de la GFAP dans cette région.

Nos observations relatives aux neurones à VIP indiquent que l'intégration et la transmission des

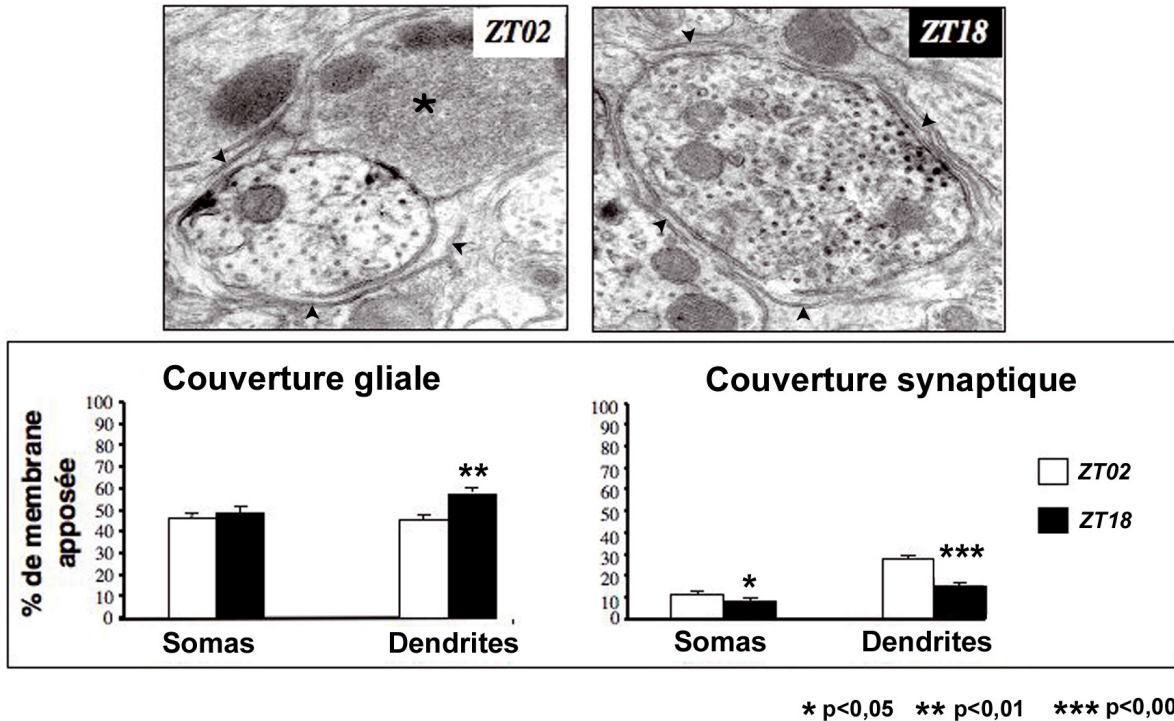


Fig. 5. Variabilité jour/nuit de la couverture gliale et synaptique des somas et dendrites des neurones à VIP. Données morphométriques de microscopie électronique obtenues après marquage des éléments à VIP en immunoperoxydase (cf. Becquet *et al.*, 2008). Les temps nycthémeraux ZT02 et ZT18 correspondent respectivement à des points diurne (2 h après le début de l'éclairage) et nocturne (6 h après l'extinction). Noter sur les micrographies que le profil dendritique marqué à ZT18 apparaît presque totalement entouré par la glie (flèches) tandis que celui marqué à ZT02 voit sa couverture gliale interrompue par une terminaison nerveuse (*) qui lui est largement apposée.

signaux relatifs à l'environnement lumineux pourraient impliquer les astrocytes non seulement dans la régulation de la libération de glutamate par les terminaisons rétinienne, comme l'ont suggéré Lavialle *et al.* (2001), mais aussi dans le remodelage rythmique de la connectivité synaptique de leurs neurones cibles. Par une étude quantitative complémentaire par imagerie confocale, nous avons posé la question de la contribution des synapses glutamatergiques aux modifications jour/nuit de la couverture synaptique des neurones à VIP. Cette étude a montré que la réduction nocturne de l'étendue de la couverture synaptique des neurones à VIP résulte bien d'une diminution de la densité de leur innervation synaptique (nombre moyen de synapses par neurone) mais qu'outre les terminaisons glutamatergiques, d'autres types de terminaisons contribuent à cette diminution, et notamment les terminaisons sérotoninergiques et GABAergiques (Girardet *et al.*, soumis). Les effets de la lumière sur la synchronisation du NSC semblent donc passer par une réorganisation globale de la connectivité synaptique des neurones à VIP. Il reste à caractériser de manière plus complète ces mécanismes de plas-

ticités en déterminant notamment si, dans la région d'intégration des messages photiques (partie ventrolatérale), seuls les neurones cibles des afférences rétinienne (neurones à VIP mais aussi à GRP) sont concernés par les réorganisations synaptiques mises en évidence. Au plan fonctionnel, au-delà de la caractérisation des acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu, une question fondamentale est celle de savoir si ces mécanismes de plasticité sont associés à la synchronisation de l'horloge sur le cycle jour/nuit.

Les remaniements nycthémeraux de l'architecture du réseau neuro-gliale du noyau suprachiasmatique sont-ils impliqués dans le mécanisme de synchronisation photique ?

L'alternance jour/nuit est nécessaire à l'expression de la plasticité astrocytaire

Même si les observations réalisées dans la région dorsale du NSC montrent que l'absence de variations

quantifiables de l'expression de la GFAP ne traduit pas nécessairement une absence de mouvements gliaux dans la structure concernée, celles réalisées dans la région ventrale, associées à d'autres données de la littérature notamment dans l'hypothalamus (Garcia-Segura *et al.*, 1994; Hawrylak *et al.*, 1998), indiquent que les modifications d'expression de la GFAP constituent un bon index dynamique pour apprécier les capacités de plasticité d'une structure donnée. C'est sur cette base que nous avons évalué l'importance de l'alternance lumière/obscurité, puis celle des variations journalières des glucocorticoïdes plasmatiques, pour l'expression de la plasticité gliale du NSC.

En conditions d'obscurité constante (D/D), l'immunoréactivité GFAP du NSC révèle, comme en conditions d'alternance jour/nuit (L/D), un réseau astrocytaire significativement plus développé dans la partie ventrolatérale que dans la partie dorsomédiane du noyau. On note cependant, après analyse quantitative séparée des deux régions sur un cycle de 24 h (un point toutes les 4 h), la disparition du rythme observé dans la région ventrolatérale sous conditions L/D. La rythmicité d'expression de la GFAP dans le NSC dépend donc de l'exposition à une alternance jour/nuit. La lumière, *via* la dynamique du réseau astrocytaire qui participerait à la régulation de la concentration de glutamate dans la fente synaptique (Lavialle *et al.*, 2001), pourrait ainsi constituer le signal de synchronisation requis pour l'induction des phénomènes de plasticité structurale du NSC. Cette proposition est cohérente avec le fait que la région ventrolatérale où se produisent les variations nyctémérales d'expression de la GFAP est précisément celle vers laquelle convergent les afférences photiques. En accord avec cette hypothèse, qui implique que la lumière serait responsable du maintien de l'expression de la protéine astrocytaire à ses niveaux les plus bas pendant le jour, il a par ailleurs été montré chez la souris que l'illumination constante se traduit par une diminution très significative de l'expression de GFAP dans le NSC (Moriya *et al.*, 2000).

Au travers de leurs fluctuations journalières qui se traduisent par des concentrations plasmatiques plus élevées en période d'activité (la nuit chez les rongeurs nocturnes), les glucocorticoïdes circulants pourraient constituer d'importants facteurs de régulation de ces mécanismes de plasticité photo-dépendants. De fait, on connaît leurs effets sur l'organisation architecturale du système nerveux, notamment en situation de stress (Fuchs *et al.*, 2006; McEwen, 2007). En accord avec cette hypothèse, si l'absence de glucocorticoïdes circulants induite par surrénalectomie bilatérale ne supprime pas l'expression rythmique de la GFAP dans la partie ventrolatérale du NSC, elle diminue cependant

de près de 50 % l'amplitude du pic observé en milieu de nuit (ZT18) (Becquet *et al.*, 2008) (Fig. 4). Cette observation est cohérente avec des données antérieures de notre groupe ayant effectivement montré l'influence stimulatrice des glucocorticoïdes sur l'expression de la GFAP au sein du NSC (Maurel *et al.*, 2000). Elle s'accorde par ailleurs avec le fait que la PSA-NCAM, dont on connaît l'importance dans les mécanismes de plasticité structurale du système nerveux (Rutishauser, 2008) et l'implication dans le fonctionnement de l'horloge (Glass *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 1997), est rythmique dans le NSC (Glass *et al.*, 2003) et que cette rythmicité est dépendante des glucocorticoïdes circulants (Becquet *et al.*, non publié). Nous avons noté en effet que la surrénalectomie fait disparaître cette rythmicité en conditions d'alternance jour/nuit en supprimant le pic d'expression diurne de la protéine (Fig. 6).

Le rythme journalier des glucocorticoïdes circulants module la synchronisation photique de l'horloge

La surrénalectomie n'a pas d'effet sur le profil rythmique d'activité motrice de rats maintenus en obscurité constante. Non synchronisé par la lumière, celui-ci reste « en libre cours », avec une période supérieure à 24 h. Le rétablissement d'une fluctuation artificielle de corticostérone plasmatique, obtenue par ajout de l'hormone à l'eau de boisson et en permettant sa disponibilité pendant un créneau de 12 h correspondant à la période d'activité des rongeurs (« nuit subjective »), ne permet pas de resynchroniser le rythme moteur sur le cycle de 24 h imposé par l'accessibilité restreinte à l'eau de boisson (Sage *et al.*, 2004). Les glucocorticoïdes circulants ne sont donc pas des synchroniseurs propres de l'horloge, ce qui est en accord avec les données de Balsalobre *et al.* (2000). Toutefois, grâce à un paradigme expérimental impliquant un déphasage photique induit par inversion du cycle lumineux chez des rats maintenus en conditions photopériodiques 12L/12D, nous avons pu montrer que leurs effets sur l'horloge s'exercent au travers d'une modulation des effets de la lumière (Sage *et al.*, 2004).

L'étude a porté sur l'incidence de la surrénalectomie, compensée ou non, dans des conditions permettant de restaurer soit des taux constants de corticostérone plasmatique (implants sous-cutanés à concentrations variables d'hormone) soit une rythmicité de l'hormone (ajout de corticostérone à l'eau de boisson), sur le délai nécessaire à la resynchronisation de l'activité motrice sur le nouveau cycle lumineux et sur les caractéristiques de cette resynchronisation. Nous avons ainsi montré que l'absence de glucocorticoïdes circulants se traduit par une accélération de la resynchronisation (moins de 3 jours *vs.* 7 jours chez l'animal normal) et que

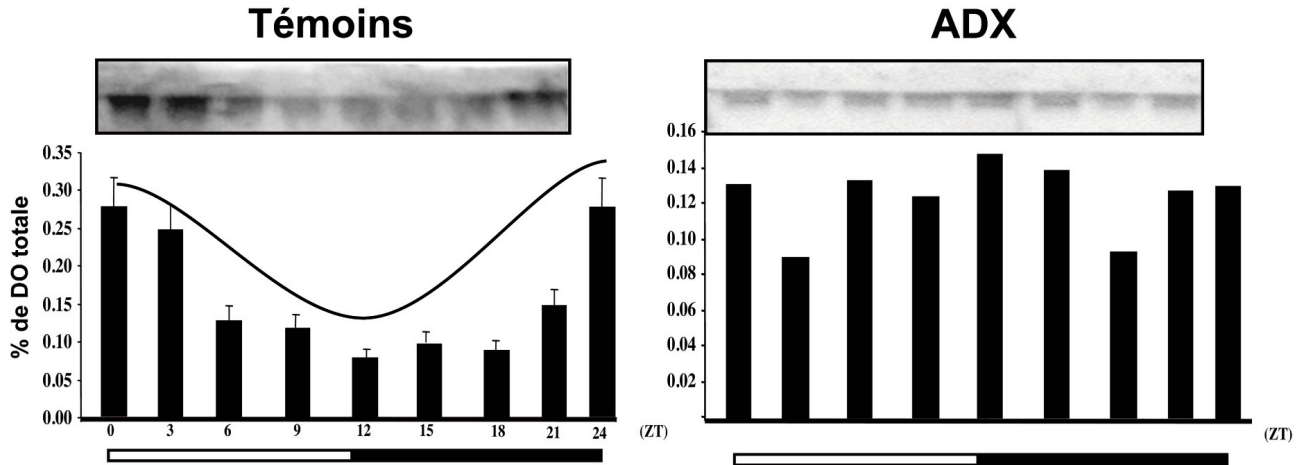


Fig. 6. Effet de la surrénalectomie sur l'expression rythmique de PSA-NCAM dans le NSC. Données d'une analyse en *western-blot* sur échantillons prélevés toutes les 3 h chez des rats maintenus sous photopériode 12L/12D. L'analyse cosinor montre que la surrénalectomie (ADX) induit une disparition de la rythmicité de la protéine. Les barres horizontales indiquent les périodes de lumière et d'obscurité.

la normalisation requiert une restauration de leurs fluctuations journalières (Fig. 7). Les glucocorticoïdes plasmatiques, par leurs fluctuations plasmatiques, exercent donc un rôle stabilisateur sur la rythmicité motrice en contribuant à rendre le système circadien résistant à un déphasage photique. Ainsi, s'ils apparaissent bien comme des signaux temporels de synchronisation, leur action est subordonnée à celle de la lumière dont ils renforcent les effets, et cela en accord avec la notion de hiérarchisation des systèmes de synchronisation.

Dans la mesure où le NSC est réputé pour être une structure n'exprimant que pas ou peu de récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) (Balsalobre *et al.*, 2000), l'implication d'un ou plusieurs relais à l'action modulatrice de ces hormones dans la synchronisation photique de l'horloge devait être envisagée. Sur une base anatomique et fonctionnelle, la 5-HT apparaissait d'autant plus comme un bon candidat pour relayer cette action au sein du NSC que les noyaux du raphé sont particulièrement riches en récepteurs GR. Conformément à cette hypothèse, nous avons observé que la destruction neurotoxique sélective des afférences sérotoninergiques au NSC par la 5,7-dihydroxytryptamine abolit les effets modulateurs des glucocorticoïdes.

Conclusion

Dans le schéma qui se dessine sur la base de ces données, la synchronisation photique de l'horloge circadienne mettrait en jeu les capacités singulières de plasticité du réseau neuro-glial tissé par les

oscillateurs cellulaires qui composent le NSC. Ces capacités, qui se traduisent au cours du nyctémère, et donc sur une échelle de temps relativement brève, par des remaniements de l'architecture synaptique et des relations intercellulaires des neurones du NSC auxquels participent les astrocytes, seraient cruciales pour l'ajustement de la synchronisation intercellulaire aux conditions de l'environnement, et donc pour le fonctionnement cohérent de l'horloge. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de cette plasticité restent à élucider. Parmi les acteurs susceptibles de jouer un rôle majeur, outre les molécules de la matrice extracellulaire (PSA-NCAM) et les facteurs neurotrophiques, notamment le BDNF qui est abondamment représenté dans le NSC où son profil d'expression est rythmique (Liang *et al.*, 1998), l'importance de la 5-HT dont on connaît le rôle dans la modulation des informations photiques et l'intégration des informations non photiques (Yannielli & Harrington, 2004) mérite d'être mise en exergue. En particulier, compte tenu de la sensibilité des neurones sérotoninergiques du raphé aux glucocorticoïdes circulants, la 5-HT apparaît aujourd'hui comme l'un des signaux majeurs par lesquels les messages endocrines rythmiques rétroagiraient sur l'horloge pour ajuster son fonctionnement (Malek *et al.*, 2007). Au vu de nos observations, l'une des composantes de son action serait, *via* sa libération rythmique dans le NSC (Barassin *et al.*, 2002; Dudley *et al.*, 1998), une modulation de la plasticité neuro-gliale du noyau. Cette conception est en accord avec des données antérieures montrant l'implication de la transmission sérotoninergique dans la régulation de l'activité astrocytaire du NSC (Glass & Chen, 1999).

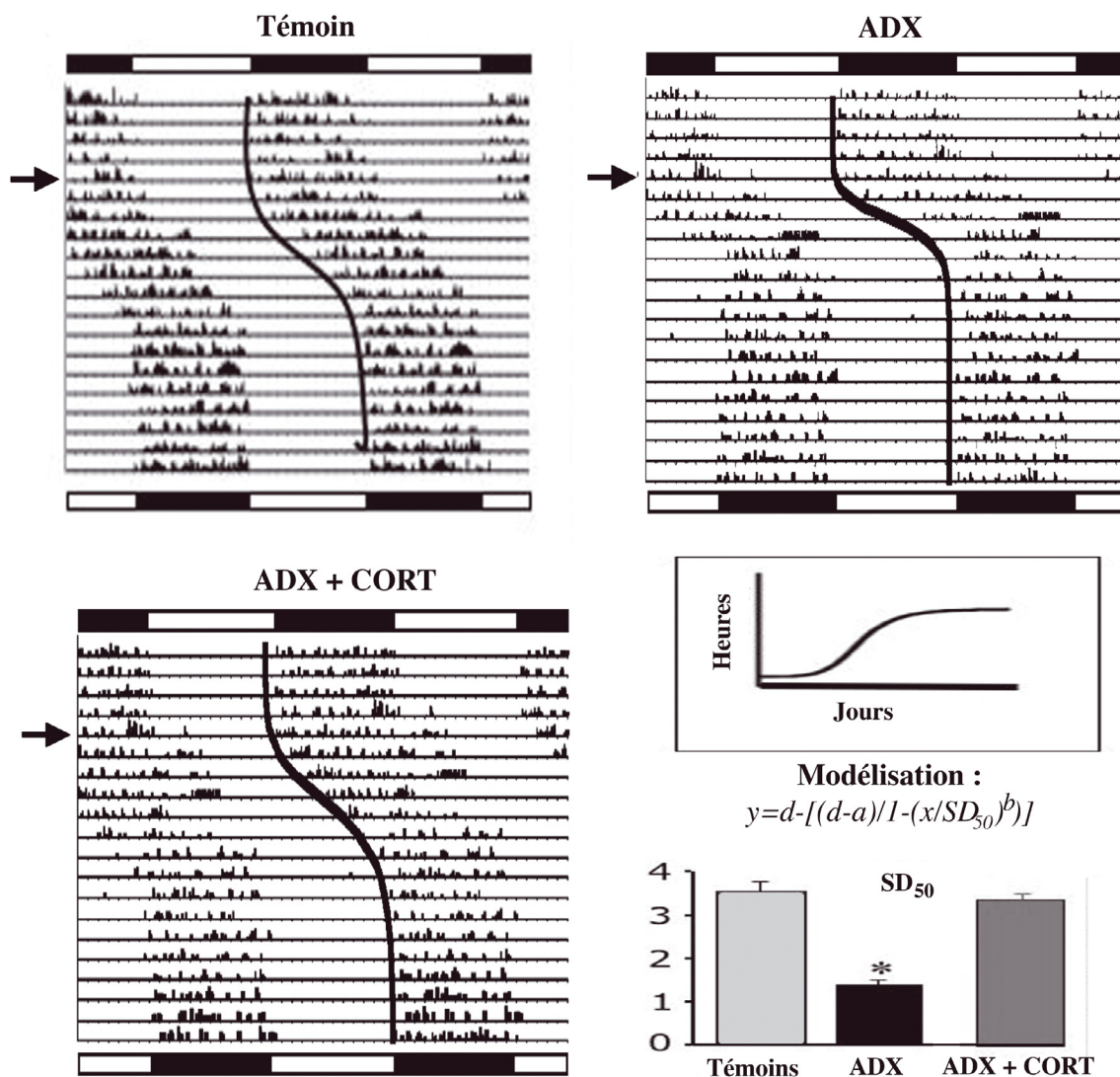


Fig. 7. Effet des glucocorticoïdes circulants sur les caractéristiques de resynchronisation photique de l'activité locomotrice après inversion du cycle jour/nuit. L'activité locomotrice est enregistrée par actographie et représentée en « double plots », chaque ligne correspondant à 48 h d'enregistrement (*cf.* Sage *et al.*, 2004). ADX : rat surrénalectomisé ; ADX + CORT : rat surrénalectomisé soumis à un traitement substitutif permettant de restaurer un rythme artificiel de corticostérone circulante (ajout de l'hormone à l'eau de boisson). Après inversion de la photopériode (flèches), l'heure journalière du démarrage de l'activité locomotrice a été déterminée à partir des données actographiques individuelles. Un graphe représentant l'heure de démarrage en fonction des jours d'enregistrement a alors été réalisé, puis les valeurs ajustées après modélisation par régression non linéaire à l'aide de l'équation représentée, dans laquelle y correspond à l'heure du début de l'activité locomotrice au jour x et a , b , d , et SD_{50} sont les quatre paramètres ajustés. a : heure de démarrage de l'activité avant l'inversion de phase, b : facteur de pente de la partie exponentielle de la courbe, d : heure de démarrage de l'activité quand x est « infini », SD_{50} : jour pour lequel l'heure de démarrage de l'activité est à mi-chemin entre a et b (point d'inflexion de la courbe). Après analyse de la SD_{50} pour chaque groupe expérimental, on note que la surrénalectomie accélère la vitesse de resynchronisation de l'activité locomotrice sur le nouveau cycle lumineux et que la corticothérapie permet le retour à la normale.

Références

- Aida R., Moriya T., Araki M., Akiyama M., Wada K., Wada E., Shibata S. Gastrin-releasing peptide mediates photic entrainable signals to dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of Period gene in mice. *Mol Pharmacol*, 2002, 61, 26–34.
- Albrecht U. Orchestration of gene expression and physiology by the circadian clock. *J Physiol Paris*, 2006, 100, 243–251.
- Albus H., Vansteensel M.J., Michel S., Block G.D., Meijer J.H. A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol*, 2005, 15, 886–893.
- Antle M.C., Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci*, 2005, 28, 145–151.
- Aton S.J., Colwell C.S., Harmar A.J., Waschek J., Herzog E.D. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, 2005, 8, 476–483.
- Balsalobre A., Brown S.A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H.M., Schütz G., Schibler U. Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol*, 2000, 10, 1291–1294.
- Barassin S., Raison S., Saboureau M., Bienvenu C., Maitre M., Malan A., Pevet P. Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur J Neurosci*, 2002, 15, 833–840.
- Becquet D., Girardet C., Guillaumond F., François-Bellan A.M., Bosler O. Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia*, 2008, 56, 294–305.
- Bosler O. Ultrastructural relationships of serotonin and GABA terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. Evidence for a close interconnection between the two afferent systems. *J Neurocytol*, 1989, 18, 105–113.
- Bosler O., Beaudet A. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus : a combined radioautographic and immunocytochemical study. *J Neurocytol*, 1985, 14, 749–763.
- Boulaich S., Daszuta A., Geffard M., Bosler O. Synaptic connectivity of serotonin graft efferents in the suprachiasmatic and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *Exp Brain Res*, 1994, 101, 353–364.
- Buijs R.M., Hou Y.X., Shinn S., Renaud L.P. Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Neurol*, 1994, 340, 381–391.
- Castel M., Morris J.F. Morphological heterogeneity of the GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus, the brain's circadian pacemaker. *J Anat*, 2000, 196, 1–13.
- Dudley T.E., DiNardo L.A., Glass J.D. Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci*, 1998, 18, 5045–5052.
- François-Bellan A.-M., Bosler O. Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat, 1992, 10, 282–290.
- François-Bellan A.-M., Kachidian P., Dasticier G., Tonon M. C., Vaudry H., Bosler O. GABA neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: involvement in chemospecific synaptic circuitry and evidence for GAD-peptide colocalization. *J Neurocytol*, 1990, 595, 149–153.
- Fuchs E., Flugge G., Czeh B. Remodeling of neuronal networks by stress. *Front Biosci*, 2006, 11, 2746–2758.
- Garcia-Segura L.M., Luquin S., Parducz A., Naftolin F. Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity and glial ultrastructure in the rat neuroendocrine hypothalamus. *Glia*, 1994, 10, 59–69.
- Garcia-Segura L.M., Naftolin F., Hutchison J.B., Azcoitia I., Chowen J.A. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol*, 1999, 40, 574–584.
- Glass J.D., Chen L. Serotonergic modulation of astrocytic activity in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 1999, 94, 1253–1259.
- Glass J.D., Shen H., Fedorkova L., Chen L., Tomasiewicz H., Watanabe M. Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 2000, 280, 207–210.
- Glass J.D., Watanabe M., Fedorkova L., Shen H., Ungers G., Rutishauser U. Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 2003, 117, 203–211.
- Guilding C., Piggins H.D. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci*, 2007, 25, 3195–3216.
- Guillaumond F., Becquet D., Blanchard M.P., Attia J., Moreno M., Bosler O., François-Bellan A.M. Nocturnal expression of phosphorylated-ERK1/2 in gastrin-releasing peptide neurons of the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurochem*, 2007, 101, 1224–1235.
- Harmar A.J., Marston H.M., Shen S., Spratt C., West K.M., Sheward W.J., Morrison C.F., Dorin J.R., Piggins H.D., Reubi J.C., Kelly J.S., Maywood E.S., Hastings M.H. The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 2002, 109, 497–508.
- Hastings M.H., Reddy A.B., Maywood E.S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4, 649–661.
- Hatton G.I. Dynamic neuronal-glial interactions : an overview 20 years later. *Peptides*, 2004, 25, 403–411.
- Hawrylak N., Fleming J.C., Salm A.K. Dehydration and rehydration selectively and reversibly alter glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the rat supraoptic nucleus and subjacent glial limitans. *Glia*, 1998, 22, 260–271.
- Inouye S.T., Shibata S. Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Res*, 1994, 20, 109–130.

- Jacomy H., Bosler O. Catecholaminergic innervation of the suprachiasmatic nucleus in the adult rat: ultrastructural relationships with neurons containing vasoactive intestinal peptide or vasopressin. *Cell Tissue Res*, 1995, 280, 87–96.
- Jacomy H., Burlet A., Bosler O. Vasoactive intestinal peptide neurons as synaptic targets for vasopressin neurons in the suprachiasmatic nucleus. Double-label immunocytochemical demonstration in the rat. *Neuroscience*, 1999, 88, 859–870.
- Kalsbeek A., Perreau-Lenz S., Buijs R.M. A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiol Int*, 2006, 23, 521–535.
- Kawamoto K., Nagano M., Kanda F., Chihara K., Shigeyoshi Y., Okamura H. Two types of VIP neuronal components in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res*, 2003, 74, 852–857.
- Kiss J., Halasz B., Csaki A., Liposits Z., Hrabovszky E. Vesicular glutamate transporter 2 protein and mRNA containing neurons in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat. *Brain Res Bull*, 2007, 74, 397–405.
- Ko C.H., Takahashi J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 Spec No 2, R271–277.
- Lavialle M., Begue A., Papillon C., Vilaplana J. Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia*, 2001, 34, 88–100.
- Lavialle M., Serviere J. Circadian fluctuations in GFAP distribution in the Syrian hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport*, 1993, 4, 1243–1246.
- Liang F.Q., Walline R., Earnest D.J. Circadian rhythm of brain-derived neurotrophic factor in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, 1998, 242, 89–92.
- Liu C., Reppert S.M. GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 2000, 25, 123–128.
- Long M.A., Jutras M.J., Connors B.W., Burwell R.D. Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci*, 2005, 8, 61–66.
- Malek Z.S., Sage D., Pevet P., Raison S. Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology*, 2007, 148, 5165–5172.
- Maurel D., Sage D., Mekaouche M., Bosler O. Glucocorticoids up-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein in the rat suprachiasmatic nucleus. *Glia*, 2000, 29, 212–221.
- Maywood E.S., O'Neill J.S., Chesham J.E., Hastings M.H. Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei-analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology*, 2007, 148, 5624–5634.
- Maywood E.S., Reddy A.B., Wong G.K., O'Neill J.S., O'Brien J.A., McMahon D.G., Harmar A.J., Okamura H., Hastings M.H. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol*, 2006, 16, 599–605.
- McArthur A.J., Coogan A.N., Ajpru S., Sugden D., Biello S.M., Piggins H.D. Gastrin-releasing peptide phase-shifts suprachiasmatic nuclei neuronal rhythms *in vitro*. *J Neurosci*, 2000, 20, 5496–5502.
- McEwen B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, 2007, 87, 873–904.
- Michel S., Colwell C.S. Cellular communication and coupling within the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*, 2001, 18, 579–600.
- Moore R.Y., Speh J.C. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett*, 1993, 150, 112–116.
- Moore R.Y., Speh J.C., Leak R.K. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, 2002, 309, 89–98.
- Morin L.P., Johnson R.F., Moore N.Y. Two brain nuclei controlling circadian rhythms are identified by GFAP immunoreactivity in hamsters and rats, 1999. *Neurosci Lett*, 1989, 99, 55–60.
- Morin L.P. SCN organization reconsidered. *J Biol Rhythms*, 2007, 22, 3–13.
- Morin L.P., Allen C.N. The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev*, 2006, 51, 1–60.
- Morin L.P., Shivers K.Y., Blanchard J.H., Muscat L. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 2006, 137, 1285–1297.
- Moriya T., Yoshinobu Y., Kouzu Y., Katoh A., Gomi H., Ikeda M., Yoshioka T., Itohara S., Shibata S. Involvement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed in astroglial cells in circadian rhythm under constant lighting conditions in mice. *J Neurosci Res*, 2000, 60, 212–218.
- Nakamura W., Honma S., Shirakawa T., Honma K. Regional pacemakers composed of multiple oscillator neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 2001, 14, 666–674.
- Okamura H., Berod A., Julien J.F., Geffard M., Kitahama K., Mallet J., Bobillier P. Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: *in situ* hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci Lett*, 1989, 102, 131–136.
- Piggins H.D., Antle M.C., Rusak B. Neuropeptides phase shift the mammalian circadian pacemaker. *J Neurosci*, 1995, 15, 5612–5622.
- Piggins H.D., Cutler D.J. The roles of vasoactive intestinal polypeptide in the mammalian circadian clock. *J Endocrinol*, 2003, 177, 7–15.
- Piggins H.D., Loudon A. Circadian biology: clocks within clocks. *Curr Biol*, 2005, 15, R455–457.
- Prosser R.A., Edgar D.M., Heller H.C., Miller J.D. A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res*, 1994, 643, 296–301.
- Romijn H.J., Sluiter A.A., Pool C.W., Wortel J., Buijs R.M. Differences in colocalization between Fos and

- PHI, GRP, VIP and VP in neurons of the rat supra-chiasmatic nucleus after a light stimulus during the phase delay versus the phase advance period of the night. *J Comp Neurol*, 1996, 372, 1–8.
- Romijn H.J., Sluiter A.A., Pool C.W., Wortel J., Buijs R.M. Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat supra-chiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, 1997, 9, 2613–2623.
- Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9, 26–35.
- Sage D., Ganem J., Guillaumond F., Laforge-Anglade G., François-Bellan A.M., Bosler O., Becquet D. Influence of the corticosterone rhythm on photic entrainment of locomotor activity in rats. *J Biol Rhythms*, 2004, 19, 144–156.
- Serviere J., Lavialle M. Astrocytes in the mammalian circadian clock: putative roles. *Prog Brain Res*, 1996, 111, 57–73.
- Shen H., Watanabe M., Tomasiewicz H., Rutishauser U., Magnuson T., Glass J.D. Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J Neurosci*, 1997, 17, 5221–5229.
- Shirakawa T., Honma S., Honma K. Multiple oscillators in the supra-chiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*, 2001, 18, 371–387.
- Slezak M., Pfrieder F.W., Soltys Z. Synaptic plasticity, astrocytes and morphological homeostasis. *J Physiol Paris*, 2006, 99, 84–91.
- Theodosios D.T., Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, 2002, 23, 101–135.
- Van den Pol A.N. The hypothalamic supra-chiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J Comp Neurol*, 1980, 191, 661–702.
- Van den Pol A.N., Tsujimoto K.L. Neurotransmitters of the hypothalamic supra-chiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*, 1985, 15, 1049–1086.
- Yamaguchi S., Isejima H., Matsuo T., Okura R., Yagita K., Kobayashi M., Okamura H. Synchronization of cellular clocks in the supra-chiasmatic nucleus. *Science*, 2003, 302, 1408–1412.
- Yannielli P., Harrington M.E. Let there be “more” light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photoc pathways. *Prog Neurobiol*, 2004, 74, 59–76.