

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE BLIDA -1-
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE
D'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER**

Option : génétique

Filière : biologie

**EXPRESSION DES GENES HORLOGES AU NIVEAU DE LA GLANDE
CORTICOSURRENALIENNE ET LEUR IMPLICATION DANS LA
REGULATION DE LA SECRETION DES CORTICOIDES.**

Présenter par :
Lundi 12/07/2021
FRIOUA Besma

Date de la soutenance :

Devant le jury :

Nom	Grade /lieu	Qualité
Mme CHAKHMA A	MCB/Blida-1-	Présidente
Mme ZEROUTI K	MAA/Blida-1-	examinatrice
Mme AMOKRAN A	MAA/Blida-1-	promotrice

Promotion : 2020 /2021

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A ma très chère et tendre mère, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices

A mon cher père, pour son soutien, pour le gout à l'effort qu'il a suscité en moi.

A mes sœurs (Serine et Hibat - Allah Nidaa) et mon frère (Racim) que j'aime beaucoup.

Remerciement

A l'issue du cycle de ma formation je tiens à remercier Allah le tout puissant.

Mes sincères remerciements vont à ma promotrice madame Amokrane pour ses précieux conseils et son suivie qu'elle m'a prodigué durant mon travail.

Mes vifs remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté de juger mon présent travail. En fin toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire soit sincèrement remercier.

Résumé

Résumé :

De nombreuses expériences ont été réalisées sur des animaux (souris) afin d'étudier l'action des gènes impliqués dans l'horloge biologique et responsable du rythme circadien (environ vingt-quatre heures) qui synchroniserait les autres horloges de l'organisme (horloge périphérique).

Cette étude porte sur l'expression des gènes horloge ainsi que la sécrétion de la corticostérone au niveau de la glande corticosurrénale en fonction de :

1-facteurs environnementaux Zeitgeber (lumière, disponibilité de l'alimentation, régime diversifié) ;

2-différence de génotype en utilisant des souris de différent fond génétique (mutant et sauvage),

Pour cela, nous avons utilisé essentiellement la méthode : RTqPCR pour la mesure de l'expression génique au niveau surrénal et la technique RIA pour le dosage hormonal (corticostérone et ACTH).

De cette étude, il paraît que la lumière (à intensité élevée) présente un impact sur la stéroïdogénèse indépendante de l'horloge périphérique (la sécrétion de corticostérone par activation du mécanisme splanchnique), le régime restreint (stress) sépare l'horloge central (noyau suprachiasmatique) de l'horloge périphérique et inverse la rythmicité des gènes horloges périphériques, un régime gras et salé présente un effet négatif sur l'expression des gènes horloges périphériques. Il ressort aussi que le rythme circadien des souris C57BL/6j est plus faible que celui des souris 129S2.

De cette étude, il paraît que la plupart des fonctions physiologiques et comportementales chez les mammifères présentent des oscillations quotidiennes générées par un système interne de chronométrage composé de gènes horloge avec des boucles de rétroaction positives et négatives en interaction.

Mots clé : Corticosurrénale, fond génétique, horloge, rythme circadien, RTqPCR, Zeitgeber.

أجريت العديد من التجارب على الحيوانات (الفئران) من أجل دراسة عمل الجينات المشاركة في الساعة (حوالي أربع وعشرين ساعة) من شأنها أن مزمنة circadian البيولوجية والمسؤولة عن إيقاع الساعات الأخرى من الجسم (ساعة الطرفية).
تركز هذه الدراسة على التعبير عن جينات الساعة وكذلك إفراز الكورتيكوسترون في الغدة الدرقية وفقا لما يلي

:

1- العوامل البيئية Zeitgeber (الضوء ، وتوافر الطعام ، والنظام الغذائي المتنوع)

2- استخدام الفئران من خلفية وراثية مختلفة (متحولة والبرية)،

لهذا استخدمنا RTqPCR لقياس التعبير الجيني على مستوى الكظرية وتقنية المقاييس الهرمونية

. استنتج من هذه الدراسة أن الضوء (بمعدل مرتفع)، يؤثر على تكوين الستيرويد بشكل مستقل عن الساعة المحيطية (إفراز الجلوكوكورتيكويد عن طريق تنشيط آلية الحشوية)، والنظام الغذائي المقيد (الإجهاد) يفصل الساعة المركزية عن الطرفية ويعكس إيقاع جينات الساعة المحيطية ، فإن النظام الغذائي الدهني والمالح للغاية سيؤثر سلباً على التعبير عن جينات الساعة المحيطية ، وقد لوحظ أن الفئران C57L / 6j لديها إيقاع يومي أقل من الفئران S2129.

تظهر معظم الأحداث الفسيولوجية والسلوكية في الثدييات تذبذبات يومية ناتجة عن نظام توقيت داخلي يتكون من جينات الساعة مع تفاعل حلقات التغذية الراجعة الإيجابية والسلبية.

الكلمات الرئيسية: القشرية الكظرية، الخلفية الوراثية، على مدار الساعة، إيقاع

circadian, RTqPCR, zietgeber

ABSTRACT:

Many experiments have been carried out on animals (mice) in order to study the action of genes involved in the biological clock and responsible for the circadian rhythm (about twenty-four hours) that will synchronize the other clocks of the body (peripheral clock).

This study focuses on the expression of clock genes as well as the secretion of corticosterone in the adrenocortical gland according to:

1-Environmental factors Zeitgeber (light, availability of food, diversified diet);

2-genotype difference using mice of different genetic background (mutant and wild),

For this, we mainly used the method: RTqPCR for the measurement of gene expression at the adrenal level and the RIA technique for hormonal assay (corticosterone and ACTH).

From this study, it appears that light (at high intensity) has an impact on peripheral clock-independent steroidogenesis (corticosterone secretion by activation of the splanchnic mechanism), the restricted regime (stress) separates the central clock from the peripheral clock and reverses the rhythmicity of peripheral clock genes, a fatty and salty diet has a negative effect on the expression of peripheral clock genes. It also appears that the circadian rhythm of C57L/6j mice is lower than that of 129S2 mice.

From this study, it appears that most physiological and behavioral functions in mammals exhibit daily oscillations generated by an internal timing system composed of clock genes with interacting positive and negative feedback loops.

Keywords: Adrenal cortical, genetic background, clock, circadian rhythm, RTqPCR ,zeitgeber.

Table de matières :

Page

Liste des Tableau	
Liste des Figures	
Abréviation	
Glossaires	
Préambule	1
Revue de littérature.....	4
I. Histoire	5
II. Noyau suprachiasmatique	5
III. Surréal.....	5
IV. Biosynthèse de la cortisol.....	6
V. Axe corticotrope	7
VI. horloge moléculaire	8
VII .Effet d'environnement sur l'expression circadienne et les taux glucocorticoïdes circulant	9
Matériel et méthodes :.....	
Matériel :.....	11
VIII. Matériel non biologique.....	.11
IX. Matériel biologique	11
IX.1 Animaux11
méthodes :.....	11
X. Expérimentation animal11
X.1 Effet de la lumière.....	11
X.1.2 Effet de l'alimentation11
X.2 Prélèvement :.....	12
X.2.3 Dosage d'hormone	12
X.2.4. Hybridation In Situ (ISH):.....	12

X.2.5	Expérimentation RTqPCR :	13
X.2.6	Analyse statistique :	14
	Résultats et discussion	
XI	. Effet de la lumière sur l'expression des gènes horloges :	16
XI.1	Chez les souris WT et TG	16
XI.2.2.	L'effet de la lumière sur l'expression des gènes horloges dans la surrénale et le noyaux suprachiasmatique tout au long de la journée subjective.	18
XI.2.3	La lumière induit la sécrétion de la corticostérone et l'expression de gènes surrénaux par gène Per 1 et Per 2 pendant la journée subjective d'une manière dépendante de l'intensité lumineuse	20
XI.2.4.	L'activation lumineuse de la surrénale n'est pas médiée via l'axe HPA.	22
XII.	Régime alimentaire.	26
XII.1.1.	Régime riche en graisse et en sel :	26
XII.1.1.1.	Le rythme d'expression des gènes liés à la synthèse des glucocorticoïdes dans la glande surrénale de souris a été perturbé par un régime riche en graisses et en sel	26
XII.1.1.2	Le rythme d'expression des gènes d'horloge dans la surrénale de souris a été modifié chez le groupe HFS.	29.
XII.1.2	Régime restreint :	32
XII.1.2.1	Modification du comportement locomoteur et de l'expression des gènes de l'horloge surrénalienne avec alimentation restreinte pendant la journée :	32
XII.1.2.2	Effet de l'alimentation restreinte diurne sur l'expression surrénalienne de StAR et le rythme GC :	35
XIII.	Autres résultats par rapport au génotype :	38
XIII.1	Expression des gènes circadiens glandes surrénales des lignées de souris C57BL / 6 et 129SV	38
	Conclusion.	44

Références	46
Annexe	52

Liste des tableaux et des Figures :

	Page
Liste des tableaux :	
Tableau 1 : séquences d'amorces des souris RF et FF (ANNEXE)	
Tableau 2 : tableau des primers utilisé des souris HFS , HF,C (ANNEXE)	
Tableau 3 : évaluation de la rythmicité circadienne dans l'expression des gènes dans la surrénal.....	39
Tableau supplémentaire 1 : les primersutilisé pour la RTq-PCR. (ANNEXE)	
Tableau supplémentaire 2 : Détermination de l'expression circadienne des gènes dans les conditions LD etDD dans les glandes surrénales des deux souches (ANNEXE)	
Liste des Figures :	
Figure 1 :schéma de la structure de la glande surrénal	6
Figure 2 :la stéroïdogènèse.....	6
Figure 3 :les principales étapes de la synthèse des corticostéroïdes.....	6
Figure 4 schéma d'interaction du noyau suprachiasmatique avec la glande surrénale sous l'effet de la lumière	7
Figure 5 : (a) Représentation schématique du régime alimentaire restreint. Après un jour de famine, les souris ont été nourries exclusivement pendant la journée (ZT05 à 09) pendant 7 jours consécutifs. Au cours de la dernière journée, les souris ont été sacrifiées à des intervalles de 4 heures. (b) Activités locomotrices de souris nourries librement (FF) et nourries restreintes(RF).(ANNEXE)	
Figure 6 : Organigramme de cette étude(ANNEXE).....	
Figure 7 : Une représentation schématique des voies de synthèse des glucocorticoïdes (ANNEXE).....	
Figure 8 Augmentation des taux plasmatiques de la corticostérone sans induction marquée de la stéroïdogènèse surrénalienne par une impulsion lumineuse	16
Figure 9 : mécanisme de l'axe sympathique de la glande surrénal	18
Figure 10 : Effet de la lumière sur l'expression des gènes dans le NSC et la surrénale et les taux d'ACTH et de corticostérone plasmatique	19
Figure 11 : Effet dépendant de l'intensité lumineuse sur la corticostérone plasmatique et l'expression surrénalienne de Per1 et Per2.....	21
Figure 12 : Effet de la lumière sur l'ACTH plasmatique, la StAR surrénalienne et la MC2R pendant la journée subjective	23

Figure 13 : système nerveux humain	24
Figure 14 : Niveaux d'expression d'ARNm relatifs de StAR, Cyp11a, Cyp11b1 dans la glande surrénale dans différents groupes	27
Figure 15 : Un régime riche en sel et en graisses a modifié les niveaux d'expression des gènes horloges périphériques. Les niveaux d'expression d'ARNm relatifs (à gauche) et cumulatifs (à droite) dans la glande surrénale des différents gènes : (A) Bmal1 ; (B) Clock ; (C) Per1 ; (D) Per2 ; (E) Cry2.....	30
Figure 16 : Effet d'une alimentation restreinte sur l'expression des gènes horloge dans la glande surrénale	32
Figure 17: Effet de l'alimentation restreinte sur l'expression surrénalienne de StAR et sur les niveaux de la corticostérone	35
Figure 18 : Modèles d'expression des gènes circadiens	41
Figure 19 : Effet génotypique de la phase d'expression génique	42
Figure 20 : Effet du génotype sur l'expression génique	42
Figure 21: Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre descycles (ANNEXE)	

Abréviation

Abréviation	Signification
AC	Anti corp
ACTH	Adreno-CorticoTropin Hormone
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AG	Anti gène

AHR	aryl hydrocarboné
ARNm	acide ribonucléique message
ARNTL	arylhydrocarbonreceptornucleartranslocator like
Axe HHS	axehypothalamo-hypophyso-surrénalien
BALB	Bagg et albinos
<i>Bmal1</i>	Brain and muscle ARNT-Like
C	Souris témoin
C57BL16	Black- 6
<i>c-fos</i>	Proto oncogene , AP1 trascription factor subunit
ChIP-Seq	l'immunoprécipitation de la chromatine
Clock	Chlockcircadianregulator
<i>Crb1</i>	Crumb homologue 1
CRH	corticotropin-releasing hormone
Cry	Régulateur Circadien Cryptochrome
<i>Cry1</i>	Régulateur Circadien Cryptochrome 1
<i>Cry2</i>	Régulateur Circadien Cryptochrome2
CT	Temp circadien
Cyb	cytochrome b.
Cyp11a1	Cytochrome P450 Famille 11 Sous-famille A Membre 1
Cyp11b2	Cytochrome P450 Famille 11 Sous-famille B Membre 2
Cyp17a1	Cytochrome P450 Famille 17 Sous-famille A Membre 1
Cyp21a1	Cytochrome P450 Famille 21 Sous-famille A Membre 2
Cyp51	Cytochrome P450 Famille 51 Sous-famille A Membre 1
DA	Dopamine
DC	Souris témoin du sombre
DD	Sombre /sombre (dark /dark)
DEPC	Pyrocarbonate d'éthyle
E-box	Boîte d'amélioration
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
FF	Nourrie librement (free feeding)
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GC	Glucocorticoïde circulant
HF	High fat (riche en graisse)
HFS	High fat salt (riche en graisse et en sel)
HHS	hypothalamo-hypophyso-surrénalien
Hi	Hippocampe
Hy	Hypophyse

INSR	Récepteur d'insuline
l'AMPK	AMP-activatedprotein kinase
LD	Light /dark(lumière /sombre)
LP	Impulsion lumineuse
MC2R	récepteur de la mélanocortine 2
mTOR	Mammalianeor mechanistictarget of rapamycin
NAMPT	Nicotinamide Phosphoribosyltransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPV	noyau paraventriculaire
Nr1d1	NuclearreceptorSubfamily 1Group D Member 1
NSC	Noyau suprachiasmatique
OP	oscillateurs périphériques
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
Per1	Période 1
Per2	Période 2
Rev-ErbA	Symboles d'alias de Nr1D1
RF	Restrictedfeeding
RIA	Radioimmunoassay
RORA	ROR alpha
RORE	ROR responseelement.
RTqPCR	Reverse Transcriptase - quantitativePolymerase Chain Reaction
SIRT1	sirtuine1
SNP	singlenucleotidepolymorphism
SNV	singlenucleotide variant
StAR	Stéroïde aigue
TAMRA	tétraméthylrhodamine
Taqman	Taq polymérase ,Pac man
TG	Transgénique
TGR	TumorGrowth Rate - Abbreviations.com
Tm	Température de demi-dénaturation
VP	Vasopressine
WT	Souris sauvage
ZT	Temp zietiberg

Glossaires

ACTH : L'ACTH (hormone adrénocorticotrope) est une hormone fabriquée dans l'hypophyse (petite glande située à la base du cerveau) dont le rôle est de stimuler les glandes surrénales (glandes situées sur chaque rein) à sécréter du cortisol (Biron).

Corticostérone : secrété uniquement chez le model murin est une hormone corticostéroïde sécrétée par le cortex (plus précisément dans la zone fasciculée) de la glande surrénale à partir du

cholestérol et sous la dépendance de l'ACTH hypophysaire. Elle interfère notamment avec la sensation de peur mémorisée et avec la mémoire.

Exome : ensemble d'exonique chez les eucaryote qui exprime les parties codantes est fonctionnelle.

Horloge centrale : l'horloge qui se situ au noyau suprachiasmatique

Horloge périphérique : l'horloge des organes hors le cerveau (noyau suprachiasmatique) comme les reins les poumons, cœur

In Silico : recherche faite en utilisant les outils et logiciel bio-informatique

Nadir : Minimum de la variation au cours d'une période.

Souris TG :l'expression de l'*ARNTL* (réduite) dans la glande surrénale par rapport aux type sauvage (WT). (Chung et al., 2017)

Souris BALB /cA :



-souris de ligné (Bagg et d'Albinos) albinos non consanguines a été sélectionnée par Mac DOWELL puis transmit a Dr .SNELL car il a ajouté au nom de souche le <C> indiquant le génotype du locus de la couleur du pelage est c/c, c'est une souche qui est sensible à l'hydrocéphalie (héréditaire) et à la malocclusion .

Souris C57BL/6JRj : Black-6



- La lignée C57BL/6 a été introduite au Jackson Laboratory en 1948 (C57BL/6J).

- caractéristique : La première à avoir eu son génome séquencé, peu sensible aux tumeurs spontanées, expression d'un grand nombre de mutations, d'où son utilisation fréquente comme fond génétique des modèles transgéniques, perte d'audition tardive liée à l'âge, une résistance aux crises audio gènes, sensible aux régimes alimentaires d'induction au diabète de type II et à l'athérosclérose. Alopécie dont l'origine reste incertaine. Hydrocéphalie héréditaire (incidence de 1 à 4 %), la présence de cloison vaginale à 24-28 jours, une faible densité osseuse, une incidence plus élevée de malocclusion, un taux élevé de microphthalmie et d'anomalies oculaires ainsi qu'une addiction à la morphine et à l'alcool. Porteuse de la délétion du gène *Nnt* (apparu sur la C57BL/6J avant 1984),active et assez agressive mais facile à manipuler et ayant une longue espérance de vie (2 ans).(janvier-labs.com)

Souris 129SV :129 Mice



-Cette souche a été développée par Dunn à l'université de Columbia en 1928 à partir d'un croisement d'un stock de couleur et d'un stock chinchilla (Tyrch) de Castle. En 1948, la souche est introduite au Jackson Laboratory (129/ReJ). En 1953, Stevens s'empare du sujet et commence par étudier les bases génétiques des tératomes testiculaires chez les souris de la souche parentale 129. Afin de déterminer l'origine cellulaire des tératomes, il travaille sur différents croisements du fond génétique 129. Ses travaux ont abouti à la création des sous-souches "Steel" 129S2/SvPasOrlet "Ter". Utile pour établir des lignées cellulaires souches embryonnaires (ES) (par exemple, W4) pour la production de souris à mutation ciblée (knockout) (TACONIC), Transgénèse, Transplantation d'ovaires, Production de mutations ciblées. (janier-labs.com)

Temp circadien : (circa = autour, diem = jour, soit d'environ 24 heures) Rythme biologique endogène comme la température et la plupart des fonctions homéostatiques dont la courbe sinusoïdale se reproduit selon une période fixe de 24 heures, mais peut également, dès lors qu'a été supprimé tout repère horaire, prendre une avance ou un retard systématique : jusqu'à 33 heures, tout en gardant ses variations périodiques pour le rythme veille-sommeil (F. Halberg, 1954). (livre de Dictionnaire de la Psychiatrie des éditions du CILF)

Temp Zeitgeber : indices temporels environnementaux tels que la lumière du soleil, les réveils ou l'interaction sociale qui aident à déclencher l'entraînement d'un organisme vers un cycle de 24 heures. (Review of Sleep Medicine (Second Edition), 2007) Philippe et al., (2013)

Préambule

Les cycles de l'environnement font varier considérablement les caractéristiques du milieu, qu'il s'agisse de la luminosité, de la température, de l'hygrométrie ou encore de la disponibilité alimentaire (Trischer, 2006). Pour leur survie, les espèces ont donc dû s'adapter à ces variations environnementales. Cette adaptation s'est faite grâce à la mise en place d'une horloge capable de se synchroniser et de distribuer à tout l'organisme un message temporel permettant l'anticipation des changements du milieu. Ainsi, cette horloge contribue largement au fonctionnement harmonieux des organismes dans leur environnement (Malek, 2007). Les variations temporelles, sont un élément constitutif de l'environnement, donc il faut en tenir compte. Dans l'étude des variations physiologiques issues de l'horloge biologique permettant aux animaux d'être en phase avec leur environnement.

On parle d'horloge circadienne, *circa* signifiant autour et *dies* signifiant jour, qui présente donc une période d'environ 24 heures. D'où l'idée que ce n'est pas la lumière qui est à l'origine des rythmes observés, mais elle joue le rôle de synchroniseur. L'horloge oscillant de façon autonome, les facteurs d'information temporelle, photiques ou non, sont considérés comme des synchroniseurs ou *Zeitgeber*, les donneurs de temps, (*Zeit* signifiant temps et *Geber* signifiant donneur). Chez les Mammifères, il a fallu attendre l'année 1972 pour localiser l'horloge circadienne dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus (NSC) grâce à des expériences de lésions (Stephan & Zucker, 1972 ; Moore & Eichler, 1972). Après lésion de ces noyaux, la greffe de ces mêmes noyaux réinstalle une rythmicité, notamment celle de l'activité locomotrice ; la rythmicité observée présente la période endogène de l'animal qui est donneur du greffon. De même, la greffe d'hypothalamus embryonnaire de souris sauvages, à des souris mutantes arythmiques, en raison de l'inactivation de deux gènes horloge (KO *Cry1-Cry2*), rétablit une rythmicité de l'activité locomotrice chez les mutantes (Sujino et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus en greffant des NSC embryonnaires de hamster mutant tau, présentant une période endogène très courte d'environ 20 heures (Ralph & Menaker, 1988), à des hamsters sauvages ayant subi une lésion de l'horloge circadienne (Ralph et al., 1990). Par ailleurs, la greffe de cellules isolées de NSC est suffisante pour rétablir une rythmicité de l'activité locomotrice à des animaux préalablement lésés (Silver et al., 1990).

Les souris sauvages et mutants constituent de bons modèles expérimentaux pour l'étude de la rythmicité de la fonction corticosurrénalienne en fonction des facteurs externes.

Ce travail est basé essentiellement, sur l'étude de l'influence premièrement des facteurs externes à savoir : la lumière du jour, l'intensité lumineuse et le régime

alimentaire déséquilibré (hyper gras et hyper salé) ou régime restreint, deuxièmes des facteurs internes ou fond génétique sur l'expression des gènes de contrôle de la sécrétion et de l'rythmicité des glucocorticoïdes au niveau surrénalien, pour cela nous avons réalisé :

- L'étude de l'activité glucocorticoïde de la surrénale par le dosage de la corticostérone et de l'ACTH plasmatiques (radio-immunologie)
- L'étude de l'expression génique (Bmal1, Clock, Per1, Per2, Revrb, et Star...) par la PCRq et Sybr Green.
- L'étude statistique permettant l'interprétation des résultats obtenus.

Les résultats obtenus seront discutés à la lumière de la littérature et enfin une conclusion générale clôturera ce mémoire.

Synthèse

Bibliographique

1. Historique :

L'existence d'une horloge biologique a été mise en évidence pour la première fois en 1729 chez une plante : la sensitive, par d'Ortous de Mairan, qui a montré que l'ouverture et la fermeture des feuilles de cette plante perdurent en l'absence d'alternance jour/nuit. En 1832, de Candolle a montré que les mouvements de cette plante présentaient une période proche mais différente de 24 heures dans des conditions constantes, mettant ainsi en évidence l'existence d'une horloge capable de fonctionner de façon autonome (Canguilhem et Boissin, 1998) ; Plusieurs travaux menés sur des gènes porteurs de mutations ont été réalisés et plus particulièrement chez la Drosophile, de nombreux mutants ayant une période endogène altérée, ont été décrits (Konopka et Benzer, 1971) et les gènes porteurs de ces mutations identifiés (Bargello et al., 1984 ; Dunlap, 1999) et étudiés. Ainsi, la découverte de la mutation spontanée du gène Tau qui induit la diminution de la période endogène de l'activité locomotrice chez le hamster (Ralph et Menaker, 1988).

Ces travaux ont alors suscité un grand intérêt pour la recherche des gènes, qualifiés de gènes horloge, responsables du fonctionnement circadien des organismes. Plusieurs expériences de mutagenèse et de clonage ont ainsi fait émerger un ensemble de gènes contrôlant des rythmicités circadiennes, responsables du fonctionnement circadien des organismes, le premier gène horloge découvert est le gène Clock pour «Circadian Locomotor Output Kaput» (Vitaterna et al., 1994), le second gène horloge chez la drosophile fut découvert en 1994. Il s'agit du gène timeless dont la mutation rendait les mouches arythmiques (Sehgal et al., 1994).

II. Noyau suprachiasmatique :

Le noyau suprachiasmatique (NSC) est la principale horloge circadienne cervicale, comptant environ 10000 neurones de chaque côté du troisième ventricule. Il synchronise les rythmes quotidiens du comportement et de la physiologie dans l'organisme. Lorsque ce noyau est isolé en culture, son mécanisme de synchronisation autonome peut persister indéfiniment, avec précision et robustesse. La découverte de boucles de rétroaction transcriptionnelles et post-traductionnelles autonome dans la cellule du NSC, qui entraînent l'activité circadienne dans le NSC fournit un exemple puissant de la spécificité génétique des comportements complexes des mammifères (Hastings et al., 2018).

III. La surrénale :

Cette glande endocrine sécrète des hormones stéroïdiennes, située au-dessus des reins et constituée de deux parties :

1- le cortex (corticosurrénale) lui composé trois zones ; zone réticulée produit les androgènes (DHEA), zone fasciculée produit les glucocorticoïdes (cortisol), zone glomérulée produit les minéralocorticoïdes (aldostérone),

2- la médullaire (médullosurrénale) produit les catécholamines (adrénaline et noradrénaline).

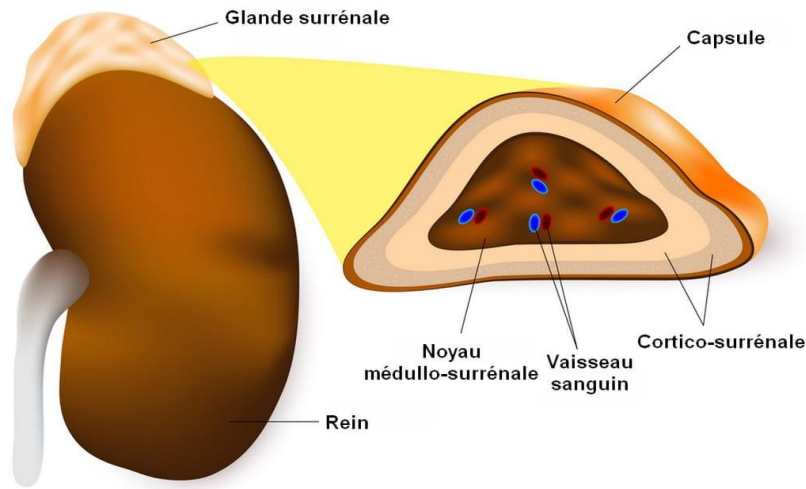


Figure 1 : Schéma représentant de la structure de la glande surrénale

IV. Biosynthèse du cortisol :

Le cortisol est le principal glucocorticoïde chez l'Homme. Il est synthétisé dans la zone fasciculée du cortex surrénal. Il existe une étape limitante dans cette biosynthèse : la conversion mitochondriale du cholestérol en prégnénolone sous l'action du cytochrome P450_{scc} (side-chaine clivage). Le gène responsable de cette protéine (CYP11A) est exprimé dans les tissus stéroïdogènes (cortex surrénal, testicules, ovaires et placenta) (Martin et al., 2017). Le cholestérol rentre dans la mitochondrie, est transformé par le cytochrome P450, sous l'action de l'ACTH, en prégnénolone. La prégnénolone sort de la mitochondrie pour rejoindre le réticulum endoplasmique (Guyton, 1991).

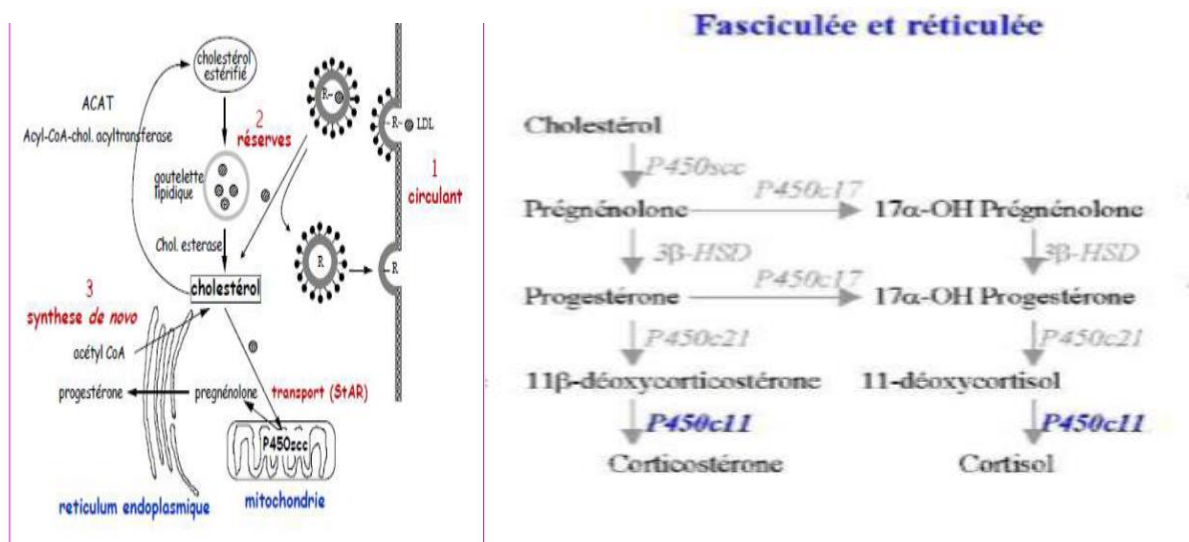


Figure 2 : La stéroïdogénèse (Thibault and Levasseur, 2001).(GAUCHE)

Figure 3: Les principales étapes de la synthèse des corticostéroïdes (Durand and Beaudoux, 2011).(DROITE)

RHT : tractus rétinohypophysaire, NS : nerf splanchnique, NSC : noyau supra-chiasmatique, VP : vasopressine, NPV : noyau paraventriculaire, CRH : corticolibérine, Hy : hypophyse, ACTH : hormone corticotrope, Hi : hippocampe, Am : amygdale, RN : noyaux du raphé, CPF: cortex préfrontal, DA : dopamine, Axe HHS : axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien, GC: glucocorticoïde, OP : oscillateurs périphériques, régulation circadienne de l'axe HHS = bleu

Le transfert du cholestérol libre du cytosol à la membrane interne mitochondriale représente une étape limitante de la biosynthèse de GC est médié par la protéine régulatrice aiguë stéroïdogène (*StAR*) dont l'expression et l'activité sont corrélées à la biosynthèse des stéroïdes (Manna et al., 2009). Plusieurs études ont démontré une expression rythmique de *StAR* chez les rongeurs (Son et al., 2008 ; Girotti et al., 2009 ; Kil et al., 2012 ; Park et al., 2013 ; Son et al., 2018).

L'ACTH sécrétée dans la réponse au stress induit la production de GC surrénaliennes en favorisant l'expression des gènes stéroïdogènes par l'activation des cascades de signalisation ACTHR/cAMP/PKA/CREB (Chung et al., 2011)

VI. Horloge moléculaire :

L'horloge moléculaire des mammifères est actuellement comprise comme une boucle de rétroaction moléculaire formée par un groupe de protéines horloge (Dibner et al., 2010). Les protéines horloge forment deux boucles de rétroaction de transcription/traduction positives et négatives imbriquées qui favorisent l'expression périodique des gènes (Herzog, 2007).

Cet écart peut provenir de la rythmicité relativement modeste de l'expression de *StAR* surrénalienne par rapport à celle des gènes de l'horloge canonique (Oster et al., 2006 ; Doi et al., 2010 ; Zhang et al., 2014). Certaines études ont montré que l'expression du gène *StAR* est régulée transcriptionnellement par la liaison de l'hétérodimère CLOCK/BMAL1 aux éléments E-box sur son promoteur distal et l'expression du gène *StAR* médie la production de stéroïdes stimulée par l'horloge moléculaire dans les cellules corticosurrénales en culture (Son et al., 2008).

Le rôle de *StAR* en tant que lien moléculaire clé entre l'horloge circadienne et la voie stéroïdogène.

L'hétérodimère CLOCK/BMAL1 (gène central) active la transcription de *PER*, *CRY*, *RORA* et *REV-ERBA* (gènes métaboliques) en se liant à E-box dans leurs promoteurs.

Lors de l'accumulation, *PER* et *CRY* se dimérisent et se transloquent dans le noyau pour réprimer l'activité de CLOCK-BMAL1 et donc leur propre transcription.

RORA s'active et *REV-ERB* réprime la transcription médiée par *RORA*.

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) interagit avec les glucocorticoïdes et *CRY* peuvent réprimer directement *REV-ERBA*.

L'ACTH stimule la stéroïdogénèse (*StAR*) et *PER* qui à son tour réprime la stimulation de *StAR* par l'ACTH, également inhibée par la mélatonine. (Minnetti et al., 2019)

La metformine active la Sirtuine 1 hépatique (*SIRT1*) par induction de *NAMPT* médiée par l'*AMPK*. *SIRT1* lie CLOCK-BMAL1 de manière circadienne et favorise la désacétylation et la dégradation de *PER*. Les ligands *PPARA*, tels que les fibrates, et les ligands *PPARG*, tels que la pioglitazone, altèrent *SIRT1* ; in vitro *PPARA* et *PPARG* régulent l'expression de

BMAL1 et REV-ERBA. L'activation du récepteur de l'insuline (INSR) augmente PI3K, conduisant à l'activation du complexe mTOR (MTORC), essentiel pour l'induction du PER. L'atorvastatine est un agoniste du récepteur aryl hydrocarboné (AHR), qui régule l'horloge circadienne en réprimant l'hétérodimère CLOCK-BMAL1 et inhibant ainsi l'expression de PER1. (Minnetti et al., 2019)

VII. Effet de l'environnement sur l'expression génique circadienne et sur les taux des glucocorticoïdes circulant :

Les souris portant un allèle *Per1* ou *Per2* muté présentent une activité locomotrice normale dans les conditions du cycle lumière/obscurité, mais les rythmes des GC quotidiens sont significativement modifiés (Dallmann et al., 2006 ; Yang et al., 2009). Les études de Son en 2018 pour disséquer les niveaux surrénaliens et circulants de GC ont révélé des rôles importants de l'horloge locale surrénale dans le rythme circadien de GC. La suppression sélective de l'expression de BMAL1 dans les cellules corticosurrénales exprimant le récepteur ACTH chez les souris transgéniques et diminue l'oscillation quotidienne des GC surrénaliennes, alors que le rythme circadien atténué mais significatif des GC en circulation persiste (Son et al., 2008). Plus important encore, les pics spécifiques diurnes des GC surrénaliens et plasmatiques dues à l'alimentation, peuvent être produits même chez des souris ayant subi une ablation du NSC. Ce résultat soutient la régulation stéroïdogénique dépendante de l'horloge locale surrénalienne (Chung et al., 2017). Néanmoins, l'oscillation robuste de l'horloge périphérique de la surrénale est principalement maintenue par les actions de synchronisation du système autonome du NSC (Ishida et al., 2005). De plus, il a fallu plusieurs jours dans l'obscurité constante pour que des souris avec horloge surrénalienne supprimée présentent des rythmes atténués de GC, ce qui indique que les cycles environnementaux peuvent être capables de compenser les défauts de l'horloge périphérique de la surrénale (Son et al., 2008). Il est donc raisonnable que dans des conditions normales de cycle lumière-obscurité de 24 heures, la production rythmique de GC par l'oscillateur local surrénalien joue un rôle de soutien, ce qui contribue au rythme quotidien robuste des niveaux de GC circulants en maintenant une libération circadienne de l'hormone.

Matériel

et

méthodes

Matériel :

Le matériel utilisé dans cette étude comporte le :

VIII . Matériel non biologique : (ANNEXE).

IX. Matériel biologique :

Le matériel biologique utilisé repose sur la souris mutée et la souris sauvage de différent fond génétique.

IX.1.. Animaux :

Plusieurs travaux de recherches ont porté sur des souris mâles adultes C57BL (Chung et al., 2017 (sauvages et transgéniques) ; Kiessling et al., 2014 (sauvages) ; Košir et al., 2016 (sauvages et croisés (129S2 x C57BL) ; Yokoyama et al., 2020 (BALB/cA C57BL16)).

Méthodes :

X. Expérimentation animale :

X.1. Effet de la lumière :

Les souris ont été gardé dans des cages entre 10 jours à 4 semaines (Košir et al., 2016 ; Chung et al., 2017 ; Yokoyama et al., 2020) dans des conditions de lumière/obscurité (12h/12h)subjectif , le groupe de souris témoin (DC) on subit un cycle d'obscurité totale (DD) (Kiessling et al., 2014).

X.2. Effet de l'alimentation :

Les souris ont reçu dans leur régime alimentaire l'aliment du commerce pour les souris et l'eau *ad libitum* (Košir et al., 2016 ; Kiessling et al., 2014).

Dans l'expérimentation animale, on a constitué plusieurs groupes de souris :

Le 1^{er} groupe FF avait reçu une alimentation *ad libitum* (Chung et al., 2017)

Le 2^{eme} groupe FR avait reçu une alimentation restreinte (figure5) et étaient nourries exclusivement pendant la journée de (CT05 à 09 : de 05h à 09h (claire)), pendant 6 jours consécutifs et ont été sacrifiées à des intervalles de 4 heures (Chung et al., 2017).

Le 3^{eme} groupe C avait reçu un régime témoin comprenait 20 % de kcal de protéines, 70 % de kcal de glucides et 10 % de kcal de lipides, et un traitement en sel de 0,3 % de NaCl.

Le 4^{eme} groupe HF avait reçu un régime riche en graisses comprenait 20% kcal de protéines, 20% kcal de glucides et 60% kcal de matières grasses pendant quatre semaines (Yokoyama et al., 2020) et un traitement en sel contenant 8% de NaCl.

Le 5^{eme} groupe HFS avait reçu un régime riche en graisse et en sel (Yokoyama et al., 2020).

X.2. Prélèvements :

Deux types de prélèvements : **organes et sang**

a-Organes :

Noyau suprachiasmatique pour l'étude de l'expression génique.

Glandes surrénales pour l'étude de l'expression génique et dosage hormonal.

b-Sang :

Plasma pour le dosage hormonal.

X.2.1 Prélèvements d'organes :

-Le noyau suprachiasmatique est prélevé par lésion thermique stéréotaxique bilatérale (Chung et al., 2017) expliqué dans Annexe. Les tissus ont été isolés sur de la glace et rapidement congelés dans de l'azote, les tissus congelés ont été conservés à -70 °C jusqu'aux analyses.

-Les souris témoins CD ont été décapité 60 min après le début de pulsions lumineuses (Kiessling et al., 2014). Les échantillons de tissus ont été congelés dans une solution tampon phosphate (PBS). Les échantillons d'ARN total des surrénales ont été isolés en utilisant Trizol (Invitrogen) selon le protocole du fabricant. L'ARN isolé a été dissous dans l'eau et conservé à -80 °C pour l'analyse à la PCR.

- le prélèvement des tissus des glandes surrénales était effectué par protocole standard (ANNEXE) (Kosir et al., 2016).

- Les souris ont été soumises à une anesthésie sous masque d'isoflurane (Yokoyama et al., 2020) la glande surrénale a été extraite au temps Zeitgeber (figure 7) la préparation des échantillons de tissus surrénales par les protocoles (<https://www.arborassays.com/assets/steroid-solid-extraction-protocol.pdf>) **ANNEXE**.

X.2.2. Prélèvements sanguins :

Le sang est recueilli dans des tubes à lithium-héparine pour le dosage de la corticostérone et sur des tubes EDTA pour le dosage d'ACTH, le sang est centrifugé pendant 5 min à 3000 tours/min, le plasma est conservé à -70 °C (Chung et al., 2017).

X.2.3. Dosage d'hormones :

plasmas ont été dilués de 1 à 100 et mesurés en double (Kiessling et al., 2014).

X.2.4. Hybridation In Situ (ISH):

Les sections ont été hybridées avec S³⁵ sondes d'ARN anti-sens marquées S-UTP pour les transcrits du gène horloge ; les films exposés ont été développés et numérisés avec un scanner à plat HP Laserjet. La quantification relative des niveaux d'expression a été réalisée par analyse densitométrique de films d'autoradiographie en utilisant le logiciel Scion Image 4.0 (Kiessling et al., 2014)

X.2.5 Expérimentations RTqPCR :

Isolement d'ARN et réaction en chaîne par transcription inverse-polymérase (RT-PCR) :

L'ARN total a été isolé au thiocyanate acide de guanidinium-phénol-chloroforme, et 500 ng de chaque échantillon d'ARNm cycliques des gènes (Per1, Per2, Arntl, Nr1d1, StAR)(tableau 1)annexe surrénalien ont été transcrits en sens inverse avec la transcriptase inverse du MMLV (Promega, Madison, WI). Des aliquotes d'ADNc ont été soumises à une RT-PCR quantitative en présence de SYBR Green I. Les niveaux d'expression génique ont été normalisés à ceux de la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) (Chung et al., 2017)

- le Séquençage de l'exome des gènes central et métaboliques de l'horloge périphérique surrénalienne entier a été réalisé sur la plate-forme Illumina Hiseq2000. Le Burrows-Wheeler Aligner a été utilisé pour l'alignement des séquences des souches de souris C57BL/6 et 129S2 sur la séquence de référence NCBI (NCBI37 / mm9). Les fichiers finaux ont été utilisés comme entrée pour SOAPSnp. Afin d'identifier les variations de nucléotides uniques (données supplémentaires S1 et données supplémentaires S2). Afin de prédire lequel des variants pourrait avoir l'effet le plus délétère sur l'activité protéique, le score Grantham Matrix (GMS) a été déterminé pour chaque SNV (Single Nucleotide Variant). Non synonyme (Figure20) 67 et DAVID appliqué pour annoter les gènes appartenant au groupe radical. D'autres procédures ont été effectuées en R et Bioconductor. L'ensemble des données de séquençage de l'exome est disponible à l'European Nucleotide Archive sous le code d'étude : PRJEB11861 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB11861>). (Košir et al., 2016).

L'ADNc a été synthétisé en utilisant un kit de transcription inverse MultiScript comprenant un inhibiteur de RNase (Applied Biosystems) selon le protocole du fabricant, à l'exception que la moitié de la quantité recommandée de tous les réactifs par réaction a été utilisée et exactement 0,5 µg d'ARN a été appliqué (Per1, Per2, Cfos) des noyaux suprachiasmatiques et (StAR, MC2R2, Per1, Per2) de la glande surrénal. La qPCR a été réalisée avec le système de détection par PCR en temps réel CFX Connect (Bio-Rad) avec GoTaq qPCR Mastermix (Promega) selon le protocole du fabricant. *Efla* a été utilisé comme standard et des estimations d'efficacité d'amplification à un seul puits et une quantification relative des niveaux d'expression ont été faits. Toutes les données ont été normalisées par rapport à la valeur CT de *Efla* respectivement. Les données pour les analyses d'induction ont été normalisées par rapport au point temporel minimal moyen des animaux témoins non traités (CT22). (Kiessling et al., 2014)

les analyses qualitatives par RT-PCR ont été effectuées indépendamment des enregistrements de course à pied (locomotion) des trois groupes HFS, HF, C. Pour la PCR en temps réel, des amorces spécifiques au gène (tableau 2) annexe et un Master Mix PCR en temps réel SYBR Green (Takara, Shiga, Japon) ont été utilisés, et les produits ont été détectés à l'aide de PIKO Real (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). Les niveaux d'expression d'ARNm relatifs ont été normalisés. (yokoyama et al., 2020)

Analyse in silico :

Localisation génomique des gènes dont l'expression circadienne ou diurne a été mesurée par La RT-qPCR a été extraite des données CHIP-seq obtenues de (Koike et al., 2012 ; Kosir et al., 2016) L'ADNc a été synthétisé à partir de l'ARN total avec le kit de réactifs Prime Script RT. Pour la PCR en temps réel, des amorces spécifiques au gène (tableau 2) ANNEXE. Les niveaux d'expression d'ARNm relatifs ont été normalisés.

X.2.6 Analyses statistiques :

Les données sont représentées sous la forme de moyennes \pm SEM. Les différences dans l'activité locomotrice, le degré d'expression génique, les niveaux de corticostérone et ajustée ont été évalués à l'aide de l'ANOVA et du test post hoc de Tukey. Les rythmes circadiens ont été analysés statistiquement en utilisant une procédure d'onde cosinus ajustée (programme Acro de R.Refinetti: <http://www.circadian.org/software.html>) . Une valeur $p < 0,05$ indique une différence statistiquement significative. L'analyse des données a été réalisée à l'aide d'IBM SPSS Statistics Version 25.0 (IBM Corp. Armonk, NY, USA) D'après Yokoyama et al., (2020). Chung et al., (2017) en calculé L'expression de la protéine StAR, les taux plasmatiques de corticostérone et les teneurs en corticostérone surrénalienne ont été évalués statistiquement avec les tests t de Student. La signification a été fixée à $p < 0,05$. en comparais Les maxima induits par la lumière de l'expression génique ou de la corticostérone plasmatique à des moments circadiens spécifiques ont été aux valeurs de contrôle par le test de somme des rangs de Mann-Whitney, même si les tests de normalité et les tests de variance égale étaient positifs, reflétant la petite taille des échantillons (4 à 12). Une méthode ANOVA a été réalisée pour détecter les différences statistiques sur plus de 2 points dans le temps, suivie du test posthoc de comparaison multiple de Bonferroni. Une différence statistiquement significative a été supposée avec des valeurs p inférieures à 0,05. Des astérisques, des marques plus ou des cercles indiquent la signification des différences entre les valeurs (ns, non significatif ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p < 0,001$) Kosir et al., (2016) en pris ($p < 0,01$) ; Kiessling et al., (2014). . Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPadPrism (GraphPad Software, San Diego, USA).

Résultats

Et

Discussion

XI . Effet de la lumière sur l'expression des gènes horloges :

XI.1 Chez les souris WT et TG :

Dans cette partie, on a étudié la possibilité d'une régulation directe du NSC sur la sécrétion de la corticostérone (figure 10), suite à une stimulation lumineuse chez la souris transgénique (TG), (horloge périphérique de la surrénale perturbée ; dans laquelle l'expression ARNTL est sélectivement atténuée dans la glande surrénale par rapport à la souris sauvage (WT)).

Impulsion lumineuse d'une durée de 1 heure :

-n'a pas induit le taux d'ARNm (figure 8) et celui de la protéine StAR au niveau surrénalien (figure 11), mais a considérablement augmenté les taux de la corticostérone plasmatique d'environ 2 fois chez les souris WT et TG (figure 8).

-en revanche, les teneurs en corticostérone surrénalienne sont réduites chez les deux souris WT et TG (figure 8).

Il est donc probable que l'activation du NSC par une impulsion lumineuse puisse stimuler une sécrétion de la corticostérone par la glande surrénale sans stéroïdogénèse via un mécanisme indépendant de l'horloge surrénale (Chung et al., 2017).

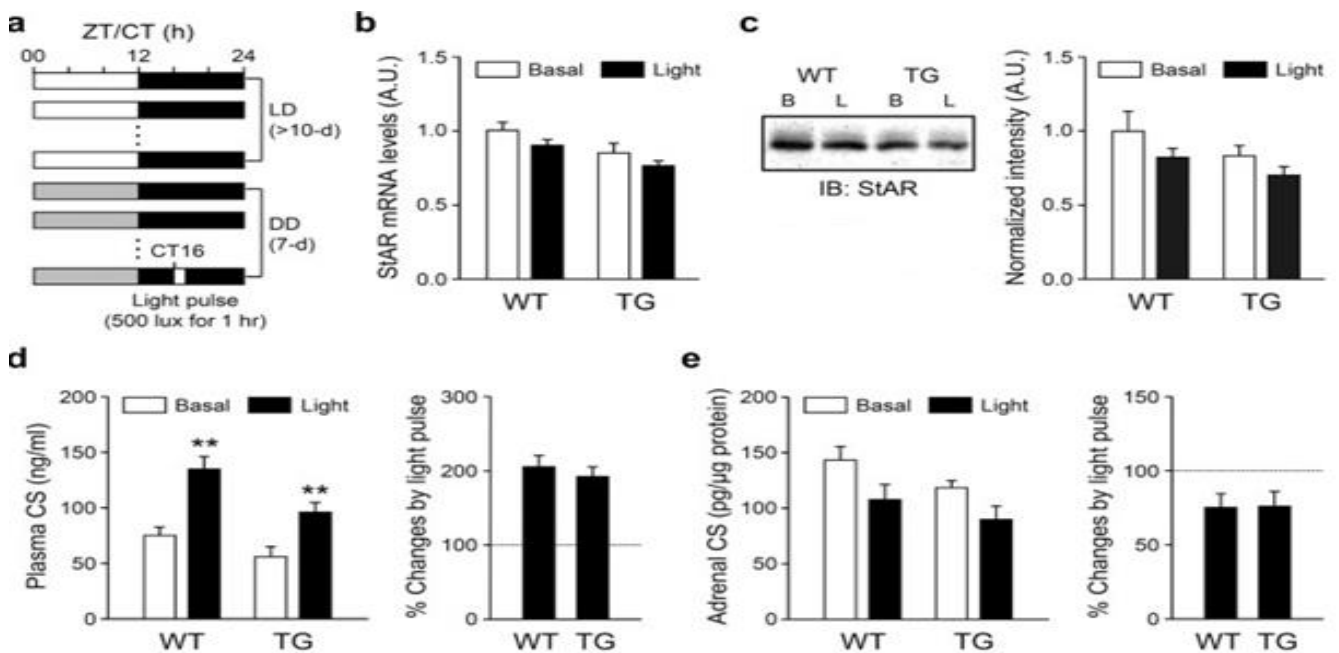


Figure 8 : Augmentation des taux plasmatiques de la corticostérone sans induction marquée de la stéroïdogénèse surrénalienne par une impulsion lumineuse.(Chung et al ., 2017)

Interprétation :**Diagramme b et c :**

Les niveaux d'expressions d'ARNm et de la protéine StAR chez les souris sauvages sont plus faibles en présence de stimulation lumineuse. Et se trouvent plus bas chez les souris transgéniques.

Diagramme d :

Au contraire de la protéine StAR, le taux plasmatique de la corticostérone est significativement plus élevé en présence de stimulation lumineuse chez les deux souris (WT et TG) et sont significativement plus faibles chez les souris transgéniques par rapport aux souris sauvages.

Diagramme e :

Par contre, la teneur surrénalienne en corticostérone est plus faible en présence de stimulation lumineuse chez les deux souris (WT et TG) avec des niveaux plus bas chez les souris TG par rapport aux souris WT.

Discussion :

L'activation photique du NSC a révélé la présence d'un mécanisme indépendant de la stéroïdogénèse gouverné par le NSC stimulant la libération aigue des glucocorticoïdes (GC) par la glande surrénale. En effet, une impulsion lumineuse au début de la nuit active le NSC et conduit à l'augmentation des GC plasmatiques indépendante de l'axe HPA (Ishida et al.,2005), mais plutôt, par un mécanisme neural impliquant le système nerveux sympathique. En effet, une médullosurrénale innervée par des fibres sympathiques préganglionnaires, est indispensable pour la genèse des pics circadiens des GC plasmatiques. De plus, la diminution de la teneur cellulaire en corticostérone était associée à la sécrétion de corticostérone stockée, stimulée par un signal photique (Engeland et al., 2005).

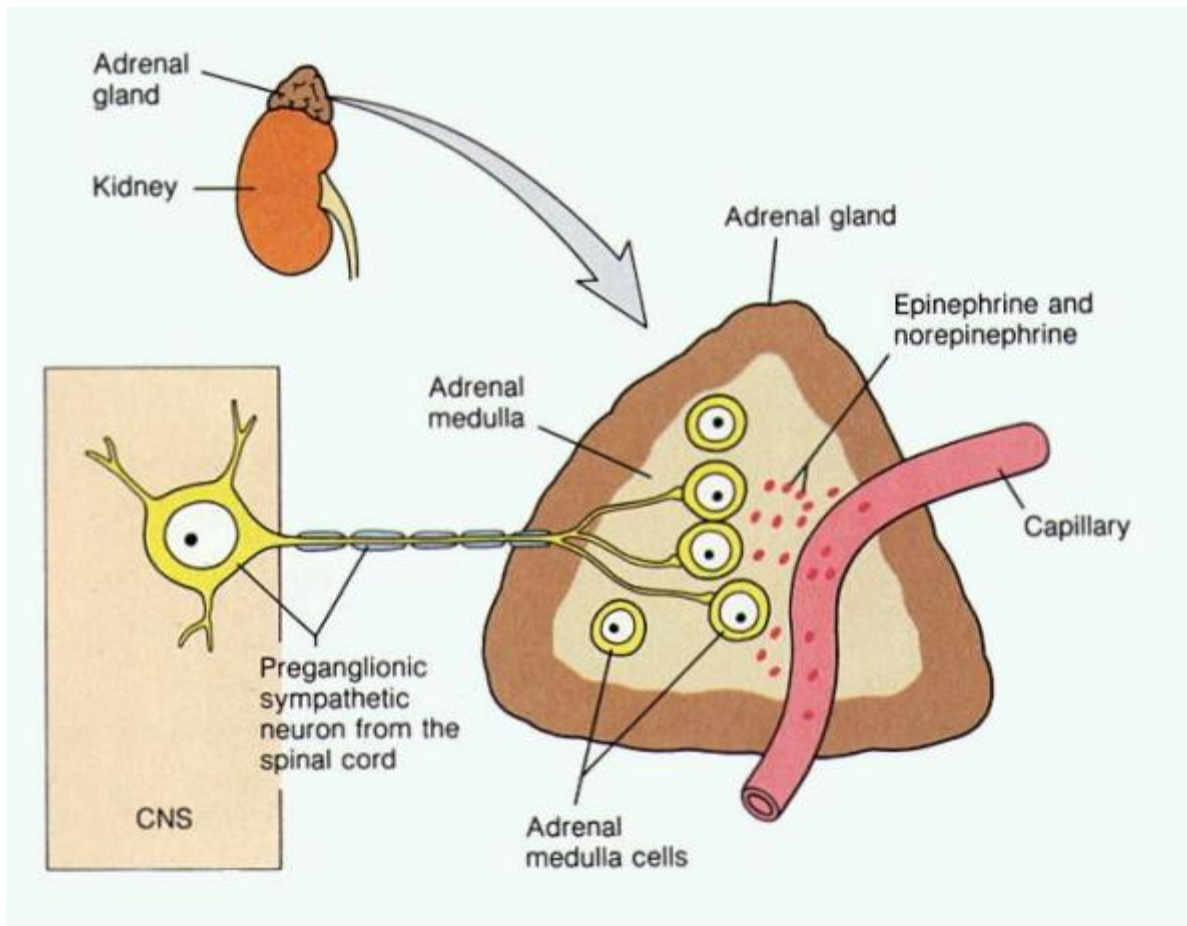


Figure 9 :mécanisme de l'axe sympathique de la glande surrénal

(anonyme <http://efisio.online.fr/enseignament07/p-sys/polyL3VLM.pdf>).

XI.2.2. L'effet de la lumière sur l'expression des gènes horloges dans la surrénale et le noyau supra-chiasmatique tout au long de la journée subjective (keissling et al., 2014) :

Il est déduit que si les signaux photiques sont relayés de la rétine à la surrénale via le NSC, l'induction lumineuse de la transcription génique dans le NSC et la surrénale serait probablement limitée aux mêmes phases circadiennes. Par conséquent, on a étudié les effets de l'intensité impulsion lumineuse (350 lux) pendant 30 min sur l'induction du gène dans le NSC et la surrénale à plusieurs phases circadiennes.

Le diagramme (a) : montre une augmentation significative des taux d'expression génique dans le NSC lors d'impulsion lumineuse en CT23 (23h : phase sombre -nuit subjective).

Le diagramme (b) : montre une expression significative du gène Per1 pendant la nuit subjective en CT12 (midi : phase sombre nuit subjective), CT16 (16h du soir : phase sombre nuit subjective)), CT18 (18h de l'après-midi : phase sombre nuit subjective) et un pic en CT10 (10h du matin : phase claire matin subjective).

-Au contraire, l'expression significative (*, **, ***) de Per2, se trouve en jour subjective de CT0 (minuit début d'expérience : phase claire matin subjective) jusqu'à CT10 (10h du matin : phase claire matin subjectif), et à CT15 (15h du soir : phase sombre nuit subjective), CT16 (16h du soir : phase sombre nuit subjective) et CT24 (minuit de la fin d'expérience : phase sombre nuit subjective).

C) Les diagrammes indiquent les niveaux plasmatiques de la corticostérone (à gauche) et d'ACTH (à droite) après une impulsion lumineuse aux points CT :

-Les taux plasmatiques de corticostérone sont significatifs en nuit subjectives CT15, CT16, CT23 et une fois en période de jour CT4 (4h du matin : phase claire matin subjective), CT23 indiquant une réponse fonctionnelle des surrénales à la stimulation lumineuse pendant le jour et la nuit subjectifs. Les stimulations lumineuses n'ont aucun impact sur les taux plasmatiques d'ACTH, les résultats sont en accord avec l'observation d'Ishida et al. (2005), l'activation de synthèse de corticostérone pendant les deux périodes subjectives est due aux signaux photiques transmis à la surrénale des stimulations lumineuses et non pas par le stress car les LP n'affecte pas les taux d'ACTH plasmatique (Mutoh et al., 2003).

XIII.2.3. La lumière induit la sécrétion de la corticostérone et l'expression de gènes surrénaux par le gène Per 1 et Per 2 pendant la journée subjective d'une manière dépendante de l'intensité lumineuse :

Dont le but de déterminer si l'augmentation de la sécrétion de corticostérone et de l'expression surrénale du gène Per, provoquée par la lumière, seraient due à l'intensité lumineuse. On a réétudié l'effet de la stimulation lumineuse à CT4 et CT6 en utilisant une intensité lumineuse de 35 lux et de 3500 lux.

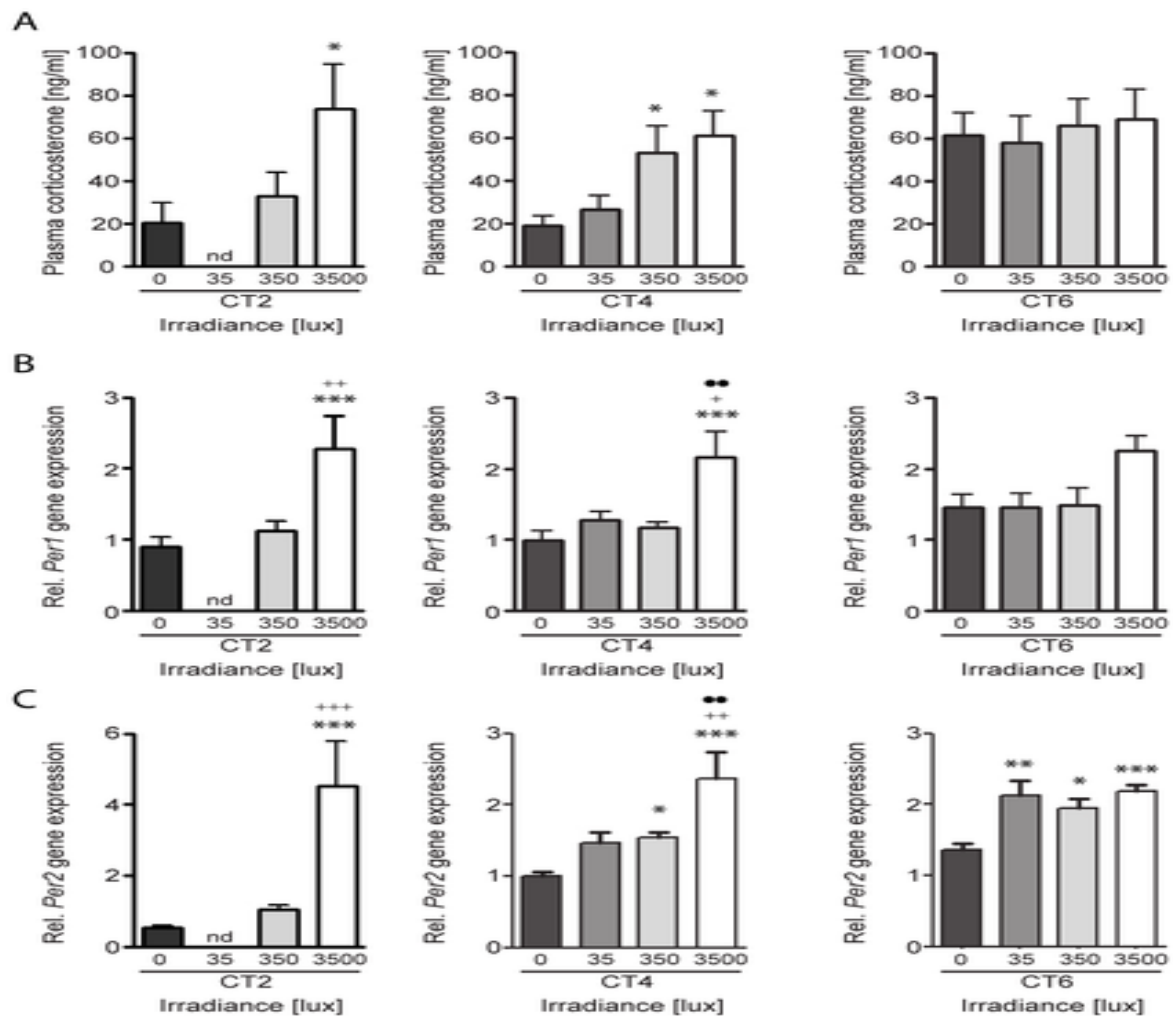


Figure 11 :Effet dépendant de l'intensité lumineuse sur la corticostérone plasmatique et l'expression surrénalienne de Per1 et Per2.(Keissling et al .,2014)

Les effets d'une expression 30 (A, rangée du haut), de l'ARNm surrénalien Per1 (B, rangée du milieu) et de l'expression de l'ARNm surrénalien Per2 (C, rangée du bas). Les échantillons ont été collectés 60 min après le début de l'impulsion lumineuse pendant la journée subjective à l'heure circadienne : CT2, CT4 et CT6. Les différences entre les témoins sombres (0 lux) et les animaux pulsés par la lumière sont indiqués par des astérisques (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$), à 35 lux d'animaux pulsés par des signes plus (+ $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$) et jusqu'à 350 lux d'animaux pulsés par des points (** $p < 0,01$) ; ANOVA à un facteur, $n = 4$ à 9 animaux/ groupe. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092959.g002>

Interprétation :

A) Digrammes indiquent les taux de corticostérone plasmatique en CT2, CT6, CT12 pour différentes intensités lumineuses (35,350,3500 Lux) :

-l'intensité lumineuse 35 lux n'a aucun impact sur les taux de corticostérone pour toutes les périodes circadiennes ;

-l'intensité lumineuse 350 lux induit un résultat significatif, ainsi, il apparaît que l'effet de la lumière sur la sécrétion plasmatique de corticostérone au cours de la journée subjective dépend à la fois de la phase circadienne et de l'intensité lumineuse ;

-l'intensité lumineuse 3500 lux a induit une augmentation des taux à CT2 et CT4.

Diagrammes B et C indiquent l'expression des gènes Per1, Per2 en CT2, CT6, CT12 pour différentes intensités lumineuses (35, 350, 3500 Lux) :

-La stimulation lumineuse à 35 lux n'a eu aucun effet sur Per1 en CT4 et CT6, par contre elle induit une augmentation significative (**) de l'expression de Per2 à CT6.

-La stimulation lumineuse à 350 lux n'a eu aucun effet sur l'expression de Per1, alors qu'elle stimule significativement l'expression de Per2 à CT4 et CT6.

-L'intensité lumineuse la plus élevée à 3500 lux a induit l'expression significative de Per1 à CT2 et CT4 et Per2 à CT2, CT4 et CT6.

Les résultats indiquent que l'expression des gènes horloge surrénaliens dépendent du cycle circadien et de l'intensité lumineuse ; l'expression de Per1 induit par la lumière était inférieur à celui de Per2.

Le taux plasmatique de la corticostérone à CT2 et CT4, induit par la lumière était fortement liée à l'expression des gènes horloges.

XI.2.4. L'activation lumineuse de la surrénale n'est pas médiée via l'axe HPA

La corticostérone plasmatique observée après la stimulation lumineuse d'intensité de 3500 lux dans l'étude actuelle ne serait pas médiée par une augmentation de l'ACTH. En effet, les niveaux d'ACTH ne différaient pas significativement entre les animaux témoins maintenus dans l'obscurité (0 lux) et les animaux stimulés avec une lumière de 3500 lux pendant 30 minutes à CT2 et CT4 (figure 12 A).

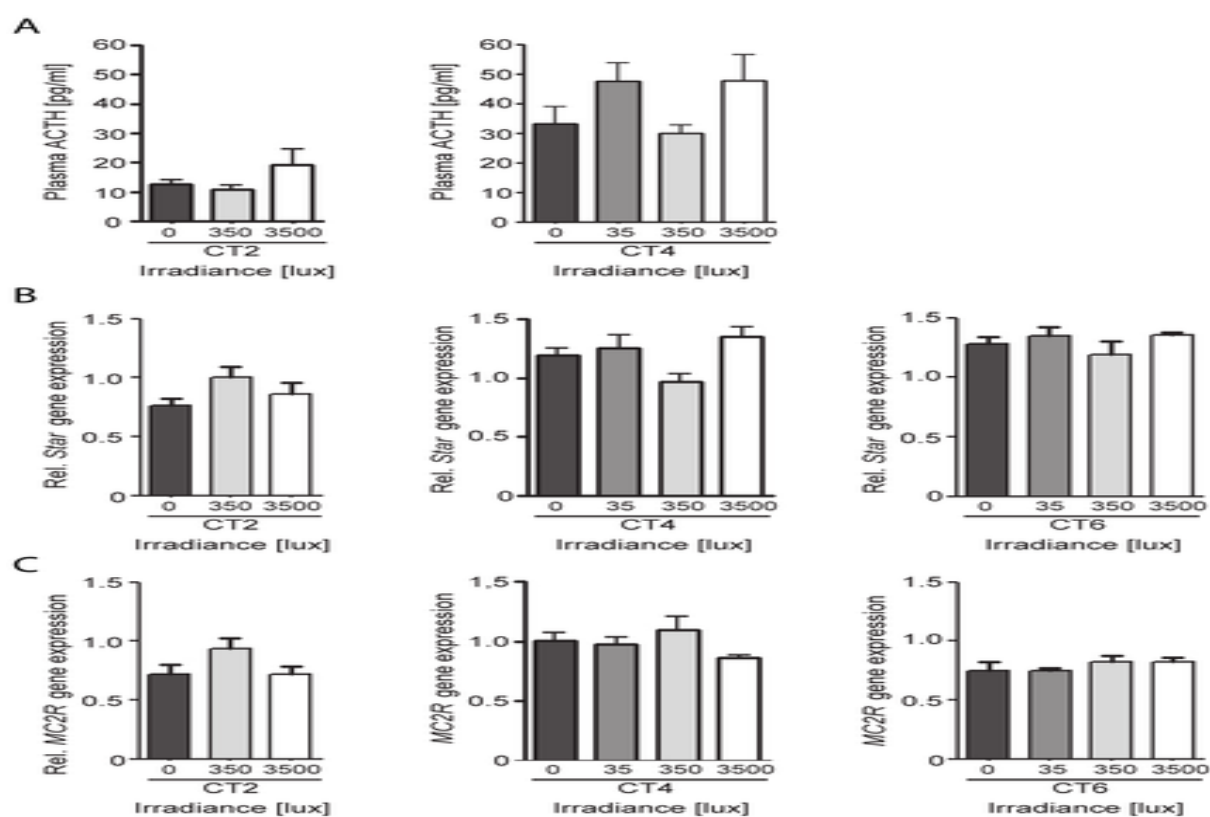


Figure 12: Effet de la lumière sur l'ACTH plasmatique, la StAR surrénalienne et la MC2R pendant la journée subjective. (Keissling et al., 2014)

A : L'effet d'une impulsion lumineuse de 30 minutes pendant la journée subjective sur l'ACTH plasmatique. B : Expression relative de l'ARNm de StAR dans la surrénale après une impulsion lumineuse de 30 min. C : Expression relative de l'ARNm de MC2R dans la surrénale après une impulsion lumineuse de 30 min.

Les échantillons ont été collectés 60 min après le début de l'impulsion lumineuse de 35, 350 ou 3500 lux pendant la journée subjective à l'heure circadienne CT2, CT4 et CT6. Aucune différence n'a été observée dans la concentration plasmatique d'ACTH, d'ARNm de StAR surrénalien ou d'ARNm de MC2R surrénalien entre les animaux témoins pulsés et obscurs (0 lux) à l'un des points CT examinés.

L'ACTH stimule la sécrétion de la corticostérone surrénalienne en interagissant avec son récepteur (récepteur de la mélanocortine 2, MC2R) (Abdel-Malek, 2001 ; Miller, 2007) qui stimule la transcription de l'ARNm de MC2R et de StAR dans la surrénale, qui est cruciale pour le transport de cholestérol aux mitochondries.

Aussi, les niveaux de transcription surrénalienne de StAR ont été déterminés après stimulation lumineuse. Aucune différence n'a été observée entre les animaux maintenus dans l'obscurité et stimulés par la lumière (CT2, CT4 ou CT6) pour les trois intensités lumineuses étudiées (figures 12 B et 12 C). Ces résultats montrent que l'activation de l'axe HPA et la libération d'ACTH n'est pas à l'origine de l'augmentation de la sécrétion de corticostérone induite par la lumière observée au cours de la journée subjective.

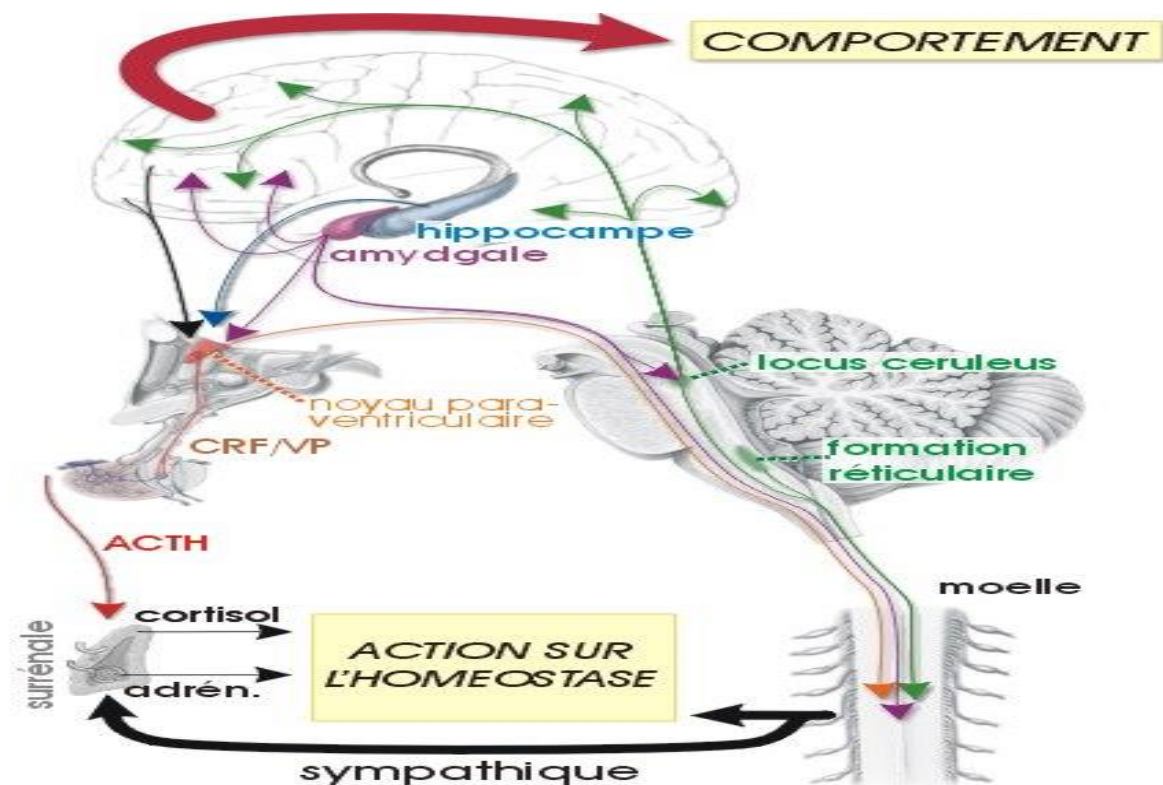


Figure 13 : système nerveux humain .

Les niveaux d'ARNm et de protéines StAR augmentent en fin de journée (Ikeda et al., 1997 ; Oishi et al., 2005 ; Son et al., 2008 ; Sulli et al., 2019), ces résultats sont en accord avec le profil de la corticostérone surrénalienne et plasmatique, qui culminent juste avant le début de la nuit subjective (Konopka et al., 1971 ; Ikeda et al., 1997 ; Chung et al., 2011)

Dans la présente étude, des animaux logés dans l'obscurité totale ont été exposés à la lumière à différentes phases tout au long du cycle circadien et les réponses de la glande surrénale à la

lumière ont été mesurées. La nouvelle observation clé est que la lumière présentée au milieu de la journée subjective de l'animal a stimulé l'expression surrénalienne de Per1 et Per2 et la sécrétion de la corticostérone. Ce résultat était inattendu car on a pensé que l'effet de la lumière sur les glandes surrénales est médié par l'horloge du NSC et que le milieu de la journée subjective est une phase du cycle circadien où l'horloge NSC est largement signalée comme ne répondant pas à la stimulation lumineuse (King et Takahashi, 2000).

Dans cette étude, nous n'avons trouvé aucune induction de gène stimulé par la lumière dans le NSC au cours de la journée subjective à CT2 et CT4. Ces résultats suggèrent donc fortement que la stimulation photique de la surrénale pendant la journée subjective n'est pas médiée par l'oscillateur circadien dans le NSC.

Il existe au moins trois voies ou mécanismes cellulaires possibles par lesquels les signaux lumineux transmis via le tractus rétino-hypothalamique (RHT) peuvent activer les circuits autonomes descendants :

- 1) en stimulant les neurones horloge du NSC qui transmettent ensuite des informations photiques aux circuits autonomes descendants ;
- 2) en stimulant d'autres neurones non horloge du NSC qui transmettent ensuite des informations photiques aux circuits autonomes descendants ;
- 3) en stimulant directement les neurones pré-autonomes situés dans l'hypothalamus mais en dehors du NSC.

L'augmentation du déclenchement des cellules de l'horloge du NSC après une stimulation lumineuse au cours de la journée subjective ne réinitialise pas la phase de l'horloge bien qu'elle puisse être suffisante pour modifier l'activité des circuits autonomes descendants si la stimulation lumineuse est de durée et d'intensité suffisantes.

L'augmentation de l'activité du nerf splanchnique observée après la stimulation lumineuse est progressive et l'activité accrue persiste après la fin du stimulus, atteignant un pic dans certains cas 60 à 70 min après l'arrêt de l'exposition à la lumière en fonction de l'intensité et de la durée du stimulus, l'augmentation des niveaux de corticostérone plasmatique après une stimulation lumineuse est parallèle à l'activité du nerf splanchnique, augmentant progressivement et atteignant un pic 30 à 60 min après l'arrêt de la lumière (Mutoh et al., 2003 ; Mohawk et al., 2007).

Une autre interprétation des résultats de cette étude est que la stimulation lumineuse de la surrénale pendant la journée subjective est traitée par l'entrée rétinienne vers le NSC, mais les neurones rétino-récepteurs du NSC qui transmettent les signaux photiques à la surrénale sont des neurones non horloges et n'ont donc pas de dépendance de phase (Oster et al., 2008).

Les efférences rétiniennes entraînent le NSC (Morin, 2013) qui à son tour régulerai la sécrétion rythmique de l'hormone de libération de la (CRH), cette dernière régulera le rythme de faible amplitude de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse antérieure. Le NSC détermine également le rythme circadien de l'activité du nerf splanchnique entraînant ainsi l'horloge circadienne de la surrénale (Mutoh et al., 2003). Les projections rétiniennes directes vers les neurones pré-autonomiques hypothalamiques extra-NSC qui peuvent être liés à la surrénale par un circuit sympathique multi-synaptique via le nerf splanchnique (Buijs et al., 1999 ; Engeland et al., 2005) peuvent fournir des signaux d'entraînements directs à l'horloge circadienne surrénale qui sont indépendants mais parallèles à celui de l'entrée RHT du NSC (Schrader et al., 2010).

XII. Régime alimentaire :

XII.1.1. Régime riche en graisse et en sel : (Yokoyama et al., 2020)

XII.1.1.1. Le rythme d'expression des gènes liés à la synthèse des glucocorticoïdes dans la glande surrénale de souris a été perturbé par un régime riche en graisses et en sel :

Les niveaux d'expression des gènes *Cyb11a* *Cyb11b1* liés à la synthèse de la corticostérone (figure 7) ANNEXE et du gène de la protéine de *StAR* étaient plus faibles dans le groupe HFS (régime riche en graisses et en sel), que dans les autres groupes .

Les niveaux d'expression de *StAR* ($p = 0,048$) et de *Cyp11a* ($p = 0,002$) se trouvent plus faibles à ZT1 (début de la période de lumière) chez le groupe HFS (figure 19, Tableau 2).

Alors que les niveaux d'expression des gènes *Cyb11a* *Cyb11b1* et *StAR* étaient significativement élevé chez le groupe HF (figure 19). Les niveaux d'expression de *StAR* ont culminé à ZT9 chez groupe témoin et HF et à ZT5 chez le groupe HFS (figure 14).

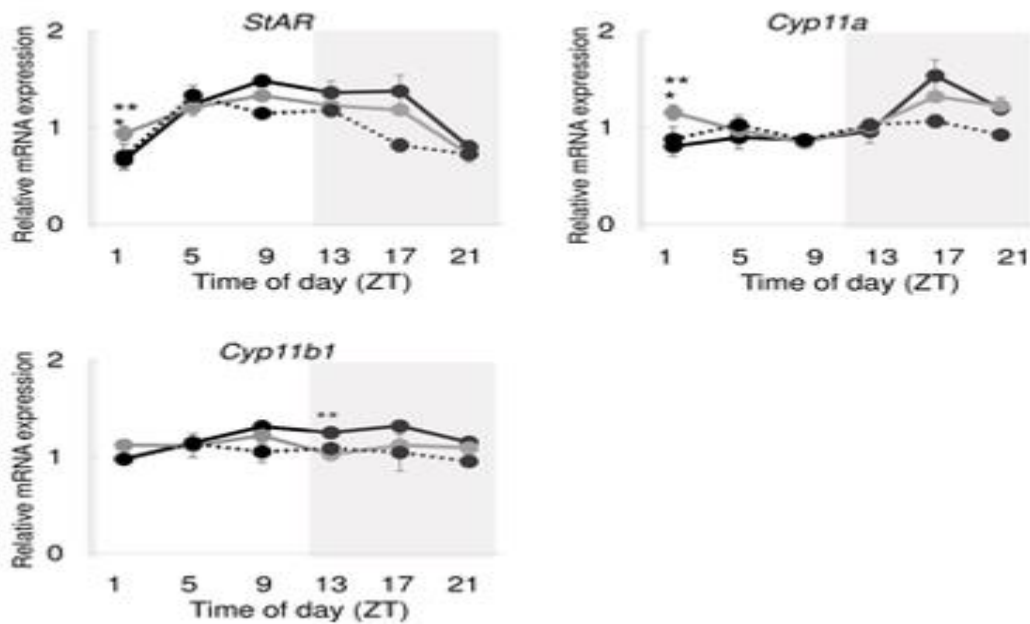


Figure 14: Niveaux d'expression d'ARNm relatifs de StAR, Cyp11a, Cyp11b1 dans la glande surrénale dans différents groupes. (yokoyama et al., 2020)

Ligne continue noire : C (sel normal et régime témoin) ; ligne continue grise : HF (régime normal en sel et riche en graisses) ; ligne pointillée : HFS (régime riche en graisses et en sel). Les données représentent les moyennes \pm erreur standard de la moyenne. * $p < 0,05$ HF par rapport à HFS, ** $p < 0,05$ HF par rapport à C. référence

Interprétation :

Ces graphes représentent le taux d'expression d'ARNm relatif des gènes Cyp11b1, Cyp11a et StAR en fonction du Temp Zeitgeber (ZT).

StAR :

-Chez le groupe témoin, le taux d'expression de StAR augmente graduellement en phase lumineuse et diminue durant en phase sombre.

Chez le groupe HF, les taux sont plus faible que chez le groupe témoin C, à part au début de la lumière les taux sont hautement significatifs et légèrement supérieurs aux taux retrouvés chez les autres groupes à ZT 1 (1h du matin début d'expérience, phase claire)

Chez le groupe HFS les taux sont les plus faibles parmi tous les groupes, augmentent de ZT1 à ZT2 (2h du matin) (phase claire) puis diminuent en ZT9 (9h du matin) (phase claire) et réaugmentent en début de période sombre puis rediminuent tous au long de la période sombre.

Cyp11a :

-Chez le groupe témoin, le taux de l'enzyme diminue légèrement à la fin de la phase lumineuse puis réaugmente durant la période sombre pour atteindre un pic à ZT17 (17h du soir phase sombre).

-Chez le groupe HF, les taux sont similaires au groupe témoin sauf à ZT1, les taux sont significativement plus élevés. À ZT17, le taux est légèrement plus bas par rapport au groupe HFS toujours similaires au groupe témoin, alors qu'en fin de phase sombre les taux sont plus faibles par rapport aux deux autres groupes.

Cyp11b1 :

-Chez le groupe témoin C, le taux de l'enzyme augmente en phase claire et diminue en phase sombre. En ZT13 l'augmentation est très significative.

-Chez le groupe HF, les taux sont légèrement plus faibles par rapport aux groupes témoin C et HFS.

Discussion des résultats :

Ces résultats suggèrent que les régimes déséquilibrés ; HF et HFS peuvent avoir un effet sur le rythme d'expression circadienne.

L'expression génique ne diffèrent pas vraiment entre le groupe témoin C et le groupe HF.

Dans cette étude, il semble que le régime HFS réduit l'activité locomotrice dans les conditions LD et DD (Yokoyama et al., 2020).

Rosol et al. (2001) montrent que le taux de la Cyp11a est significativement plus faible chez le groupe HFS que chez le groupe HF et suggèrent que la rétroaction négative des glucocorticoïdes réduirait le niveau d'expression du gène Cyp11a dans le groupe HFS par rapport au groupe HF. La glande surrénale relie et régule les horloges centraux et périphériques autonomes par la production rythmique des stéroïdes (Son et al., 2008)

XII.1.1.2 Le rythme d'expression des gènes d'horloge dans la surrénale de souris a été modifié chez le groupe HFS :

Cette étude est réalisée sur l'expression des gènes horloge (*Bmal1*, *Clock*, *Per1*, *Per2* et *Cry2*) sur une période de 24h au niveau de la glande surrénale.

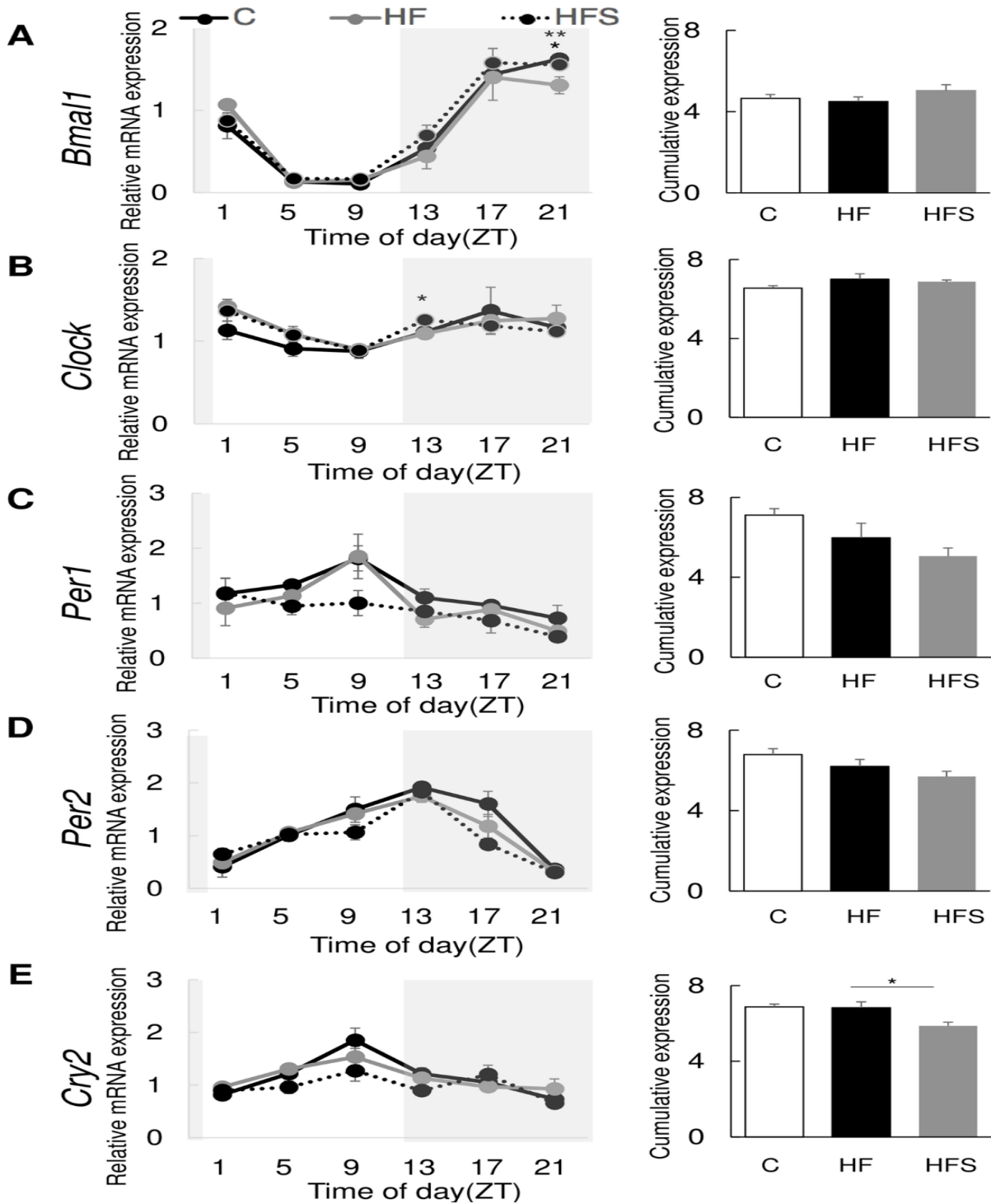


Figure 15 : Un régime riche en sel et en graisses a modifié les niveaux d'expression des gènes horloges périphériques. Les niveaux d'expression d'ARNm relatifs (à gauche) et cumulatifs (à droite) dans la glande surrénale des différents gènes : (A) Bmal1 ; (B) Clock ; (C) Per1 ; (D) Per2 ; (E) Cry2.(Yokoyama et al., 2020)

Chez les différents groupes ; Ligne continue noire : C (sel normal et régime témoin) ; ligne continue grise : HF (régime sel normal et riche en graisses) ; ligne pointillée : HFS (régime riche en graisses et en sel). Les données représentent la moyenne \pm l'erreur standard des valeurs moyennes

Interprétations :

Les niveaux d'expression d'ARNm relatifs et cumulatifs des gènes horloge dans la surrénale : (A) Bmal1 ; (B) Clock ; (C) Per1 ; (D) Per2 ; (E) Cry2 en fonction du temps ZT Zeitgeber.

Gène Bmal1 :

Le taux d'expression de Bmal1 chez le groupe témoin diminue en phase lumineuse et augmente en phase sombre, avec une augmentation hautement significative à ZT21 (21h du soir, phase sombre). Les taux d'expression chez les autres groupes sont similaires à ceux du groupe témoin. Juste le groupe HF présente des niveaux d'expression plus faibles que les autres groupes à ZT21.

Gène Clock :

Les taux d'expression chez le groupe témoin diminue en phase claire et augmente en phase sombre. Les taux d'expression chez les autres groupes sont similaires.

Gène Per1 :

Chez les groupes témoin et HF, le taux d'expression en phase lumineuse est augmenté jusqu'à atteindre un pic à ZT9 (9h du matin (phase claire)) et il diminue en phase sombre.

Contrairement au groupe HFS le taux d'expression est diminué dans les deux phases et la plus faible par rapport aux autres groupes (HF et témoin C).

Gène Per2 :

En phase lumineuse, le taux d'expression est augmenté chez tous les groupes et atteint le maximum à ZT13 et rediminue jusqu'à ZT2 en phase sombre. Les taux les plus faibles sont retrouvés chez le groupe HFS par rapport aux autres groupes durant les deux phases claire et

sombre. Et sont légèrement inférieures chez le groupe HF par rapport au groupe témoin C de ZT9 à ZT21.

Gène Cry2 :

En phase lumineuse, les taux d'expression génique chez tous les groupes augmentent jusqu'au pic à ZT9 puis redescendent durant la période sombre. Le groupe HFS présente toujours des taux d'expression génique les plus faibles en phase sombre et en début de phase sombre. Ces taux d'expression se trouvent plus faibles chez le groupe HF par rapport au groupe témoin à ZT9.

Niveaux d'expression cumulatifs d'ARNm :

D'après le diagramme d'expression cumulatifs (à droite), le niveau d'expression d'ARNm des différents gènes et comme suit :

Chez le groupe témoin :

Bmal1 \approx 4,1 ;

Clock \approx 4,6 ;

Per1 \approx 4,8 ;

Per2 \approx 4,7 ;

Cyr2 \approx 4,8.

Chez le groupe HF :

L'expression génique se trouve inférieure par rapport au groupe témoin

Bmal1 \approx 4 ;

Clock \approx 4,8 ;

Per1 \approx 4,5 ;

Per2 \approx 4,6 ;

Cry2 \approx 4,7(**).

Souris nourries HFS :

L'expression génique se trouve supérieure par rapport au groupe témoin pour les gènes suivants :

Bmal1 \approx 4,2 ;

Clock \approx 4,7 ;

Et se trouve inférieure par rapport au groupe témoin pour les gènes suivants :

Per1 \approx 4,3 ;

Per2 \approx 4,5 ;

Cry2 \approx 4,6 (**).

Discussion des résultats :

Le gène StAR est régulé par CLOCK-BMAL1, Bien que les niveaux d'expression de Bmal1 et de Clock soient différents entre les groupes HFS et HF pendant la période sombre, aucune association claire entre l'expression des gènes de l'horloge circadienne et l'expression de StAR dans la glande surrénale n'a été observée (Chung et al., 2011 ; Stocco, 2001).

les niveaux d'expression de Cry2 au niveau de la surrénale sont faible chez le groupe HFS par rapport au groupe HF. Chez la souris, la perte de Cry1 et Cry2 a entraîné une intolérance au glucose et des niveaux constitutivement élevés de corticostérone circulante, suggérant une suppression réduite de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA).

Les niveaux d'expression de Cry2 ont culminé dans le groupe HFS à ZT9 et à ZT17. Ces résultats suggèrent que la variation de l'expression de Cry2 surrénalienne conduit potentiellement à des différences dans les niveaux circulants de corticostérone.

XII.1.2 Régime restreint : (Chung et al., 2017)

XII.1.2.1 Modification du comportement locomoteur et de l'expression des gènes de l'horloge surrénalienne avec alimentation restreinte pendant la journée :

On a étudié l'effet de l'alimentation restreinte pendant la journée sur l'expression des gènes dans la glande surrénale.

L'expression d'ARNm (Per1, Per2, Arntl et Nr1d1) durant les phases claire et sombre, a été décalées de 4 à 8 heures dans la glande surrénale (figure 16) par rapport à celle des souris

nourries Ad libitum. Ces résultats montrent que la nourriture est un Zeitgeber fort pour la synchronisation de l'horloge surrénalienne périphérique et peut détacher les oscillateurs surrénaux du rythme central produit par le NSC.

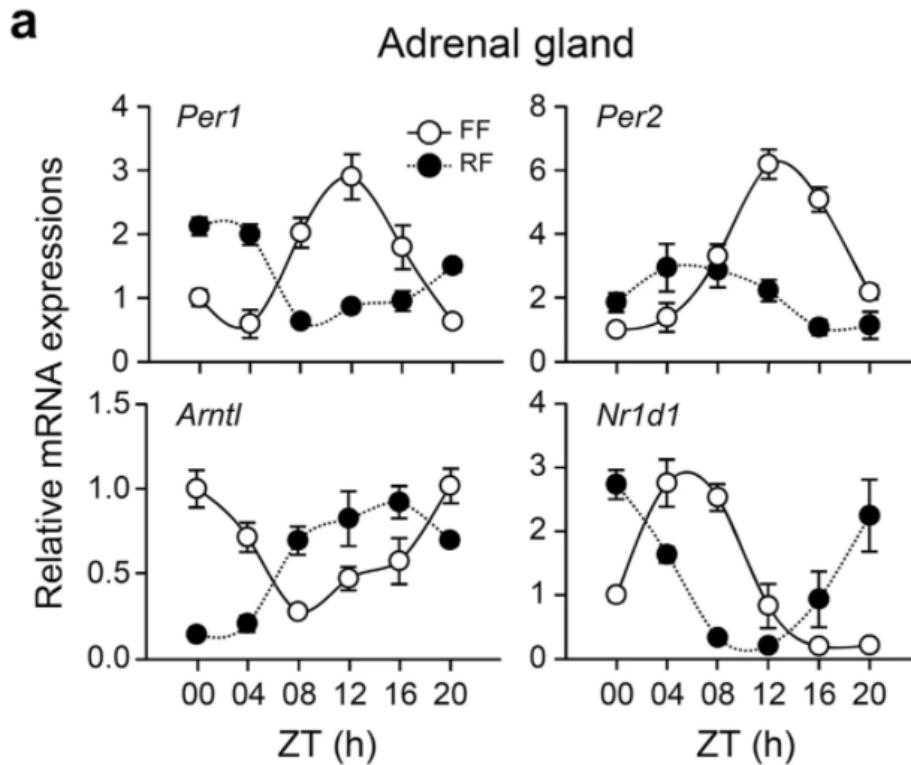


Figure 16: Effet d'une alimentation restreinte sur l'expression des gènes horloge dans la glande surrénale.(chung et al .,2017)

Les profils quotidiens de l'expression de l'ARNm *Per1*, *Per2*, *Arntl* et *Nr1d1* dans la glande surrénale (a) de souris nourries librement (FF) et nourries restreintes (RF) ont été déterminés par RT-PCR quantitative. Les données ont été normalisées.

Analyse :

Ces graphes représentent les taux d'expression de l'ARNm relative des gènes *Per1*, *Per2*, *Arntl* et *Nr1d1* dans la surrénale des souris nourries librement (FF) et des souris nourries restreintes (RF) en fonction du Temps Zeitgeber (ZT).

Gène *Per1* :

Le taux d'expression chez le groupe FF diminue de ZT00 (début d'expérience, phase claire) jusqu'à ZT08 (à 8h, phase claire) puis augmente jusqu'au pic à ZT12 (12h, phase claire) et rediminue à ZT 20 (20h, phase sombre).

Contrairement chez le groupe RF, les taux d'expression sont opposés par rapport à ceux du groupe FF à partir de ZT00 jusqu'à ZT4 (4h, phase claire) puis augmentent graduellement jusqu'à ZT20.

Gène Per2 :

Les taux d'expression chez le groupe FF augmentent de ZT00 jusqu'à atteindre le summum à ZT12, cette augmentation est suivie d'une phase descendante jusqu'à ZT20. Un profil opposé est observé chez le groupe RF.

Gène Arntl :

Les taux d'expression chez le groupe FF diminuent entre ZT00 et ZT8 et réaugmentent jusqu'à ZT20. Toujours un profil opposé est observé chez le groupe RF.

Gène Nr1d1 :

Les taux d'expression chez le groupe FF augmentaient de ZT00 à ZT4 et rediminuent jusqu'à ZT20. Toujours un profil opposé est observé chez le groupe RF.

Discussion des résultats :

Plusieurs études ont démontré cette écart de phase peut-être dû à la rythmicité relativement modeste de l'expression surrénalienne de StAR par rapport à celle des gènes horloge en temps normal (Nékaou et al., 2007 ; Son et al., 2008 ; Leliavski et al., 2014). Néanmoins, d'autres études ont suggéré le contrôle transcriptionnel de l'expression de StAR par l'hétérodimère CLOCK : ARNTL.

La stéroïdogénèse altérée associée à l'expression surrénalienne de StAR, influence probablement les taux de GC circulants, car une augmentation des taux plasmatiques de corticostérone a été observée vers ZT00 (un pic matinal), lorsque la teneur en corticostérone surrénale a atteint son pic (Son et al., 2008). Cependant, le deuxième pic à ZT12, se trouve aussi bien lorsque les niveaux de GC circulants étaient élevés chez les souris nourries ad libitum, que chez les souris soumises à une alimentation restreinte pendant la journée, malgré son amplitude réduite. La suppression de l'expression d'ARNTL dans les cellules productrices de GC surrénaliennes diminue apparemment la rythmicité de l'expression surrénale de StAR

et de la teneur en corticostérone, mais n'a fait qu'atténuer le rythme de la corticostérone plasmatique.

XII.1.2.2 Effet de l'alimentation restreinte diurne sur l'expression surrénalienne de StAR et le rythme GC :

Dans cette étude, on a vérifié l'effet de la durée d'alimentation restreinte sur l'expression diurne de StAR et le rythme de corticostérone. L'alimentation restreinte a progressivement modifié l'expression circadienne de la protéine StAR (Figure 17 a et b) au bout de 6 jours (Figure. 20a). De plus le profil de la teneur de corticostérone surrénalienne se trouve opposés chez les souris RF (Figure 17c) par rapport à ceux des souris FF.

L'augmentation de l'expression de StAR autour de ZT00 en raison du stress lié à la faim, et, plus important encore au jour 7, une augmentation substantielle de l'expression de la protéine StAR à ZT12 à cause de la famine (Figure 17a , panneau inférieur). Cependant, une alimentation restreinte a produit des rythmes de corticostérone circulatoires séparés, avec deux pics distincts à ZT00 et à ZT12 (Figure. 17d).

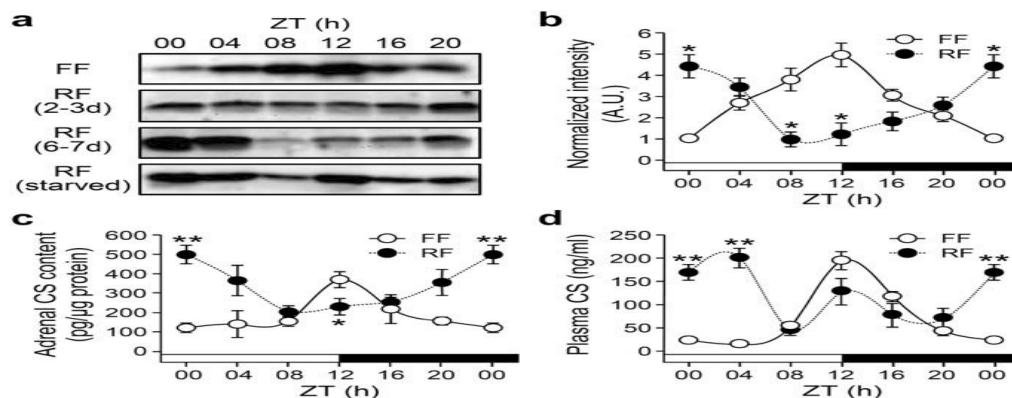


Figure 17 :Effet de l'alimentation restreinte sur l'expression surrénalienne de StAR et sur les niveaux de la corticostérone.(chung et al .,2017)

(a et b) Niveaux de protéine StAR surrénalienne chez les souris FF et RF telles que déterminées par immunoblot. Les souris RF ont été sacrifiées au jour 3 (2 à 3 jours) ou au jour 7 (6 à 7 jours). Des souris nourries avec restriction (affamées) ont été sacrifiées au jour 7 sans nourriture le dernier jour pour examiner l'effet possible de la faim sur l'expression de StAR (a). Les intensités de bande optique pour les souris FF et RF (6–7 j) sont exprimées en

moyenne \pm SE des unités arbitraires (AU), les valeurs des souris FF à ZT00 étant définies comme 1 (b ; n = 3 ; * p <0,05 vs. FF à la même heure). (c et d) Effets d'une alimentation restreinte sur le rythme quotidien de la teneur en corticostérone surrénalienne (c ; n = 7 à 10 ; * p <0,05 et ** p <0,01 vs FF au même moment de la journée) et taux de corticostérone circulante dans le plasma (j ; n = 4-5; ** p <0,01 vs FF au même moment- of-day) tel que mesuré par radioimmunoessai.

Analyse :

Les intensités de l'expression de la StAR chez les souris FF et RF (6–7 j) :

Chez les souris FF on remarque que l'intensité de l'expression de StAR est faible à ZT00 et légèrement intense à ZT04. À ZT08, l'expression est plus intense est atteint le summum à ZT12 au-delà elle diminue jusqu'à ZT20.

Chez les souris sous-régime restreint sacrifié au jour 3 (2-3 jours), l'intensité est faible de ZT00 à ZT16 mais moins faible à ZT20 (6-7jours). L'intensité d'expression est très marquée à ZT00 et à ZT04 et très faible à ZT08, ZT12, ZT16 et à ZT20.

Une forte intensité forte en ZT00et ZT04 et très faible à ZT08 et forte à ZT12 et très faible en ZT16 et ZT20.

d'intensité normalisé de l'expression de protéine StAR chez les souris FF et RF en période sombre /lumière en fonction du Temp Zeitgeber (ZT) :

-Chez les Souris nourries librement (FF) pendant la période lumière une augmentation du taux d'expression est remarquable jusqu'au pic à ZT (12) \cong 400 puis diminue durant la nuit.

Contrairement aux taux chez les souris sous-régime restreint (RF) une diminution des taux est remarquable en période de lumière puis un rehaussement des taux durant la période sombre les résultats sont significatifs à ZT (00) (temp initial) jour (début d'expérience) (claire), (08) (8h) (jour)(claire).

Graphique d'Effets d'un régime restreint sur les taux et le rythme quotidien de la teneur en corticostérone surrénalienne chez les souris FF et RF en période sombre et lumière en fonction du Temps Zeitgeber :

-Chez les souris librement nourris (FF), il y a une augmentation des taux de corticostérone durant la période lumière et une diminution des taux durant la période sombre, contrairement chez les souris sous régime restreint (RF) les résultats diminuent significativement durant la

période lumière à ZT (00) (temp initial) jour (début d'expérience) (claire) puis augmentent durant la période sombre à ZT (12) et à ZT (00) (temp initial) jour (début d'expérience) (claire).

Discussion des résultats :

-La présente étude démontre que la production et la sécrétion diurnes de GC par la glande surrénale sont sous le contrôle bimodal ; le stimulateur NSC et l'oscillateur intrinsèque surrénalien.

L'alimentation restreinte pendant la journée, dissocie les rythmes centraux et périphériques, et pourrait inverser le rythme quotidien des GC plasmatiques (Damiola et al., 2000). Alors que le pic précoce des niveaux de corticostérone était étroitement lié aux modifications de la stéroïdogénèse surrénale, le pic ultérieur était indépendant de la production rythmique de GC mais nécessitait un NSC intact. De plus, l'activation photique du NSC a augmenté les taux plasmatiques de GC sans nécessiter une augmentation de la stéroïdogénèse surrénale ou une horloge moléculaire fonctionnelle dans les cellules productrices de GC surrénaliennes (Kalsbeek et al., 1996 ; Ulrich-Lai et al., 2006). Alors que la libération de GC pulsatile et induite par le stress est principalement régulée par l'axe HPA par une boucle de rétroaction négative vers les régulateurs hormonaux en amont, l'innervation autonome contrôlée par le NSC et les horloges circadiennes surrénaliennes sont nécessaires pour les rythmes quotidiens de la GC.

Le système nerveux autonome dérivé du NSC médie également la stimulation photique de la glande surrénale, réinitialisant ainsi l'horloge locale surrénale et augmentant rapidement les taux plasmatiques de GC (Ishida, A. et al., 2005).

En plus de ce mécanisme neuronal, l'oscillateur intrinsèque surrénalien stimule l'augmentation circadienne des niveaux de GC circulants en régulant divers sites de la stéroïdogénèse et des cascades de signalisation intracellulaire qui médient la production périodique de GC et contrôle un mécanisme de déclenchement impliqué dans la sensibilité à l'ACTH (Oster et al., 2006 ; Son et al., 2008).

Il apparaît que l'alimentation diurne restreinte favorise l'activité d'anticipation de la nourriture et dissocie les horloges locales dans les tissus périphériques et les régions cérébrales extra-NSC du stimulateur central du NSC chez les rongeurs nocturnes (Damiola et al., 2000 ; Hara et al., 2001 ; Wakamatsu et al., 2001).

Les phases d'expression du gène de l'horloge dans la glande surrénale ont également été entraînées par un accès restreint à la nourriture, ce qui correspond à une découverte précédente de Girotti et al., 2009.

Plusieurs auteurs, montrent que parallèlement à l'expression du gène horloge dans la glande surrénale, les altérations diurnes de la teneur en GC surrénaliens et l'expression périodique de la protéine StAR ont également été modifiées par l'alimentation diurne (Son et al., 2008 ; Girott et al., 2009 ; Kil et al., 2012 ; Fahrenkrug et al., 2012 ; Park et al., 2013).

XIII. Autres résultats par rapport au génotype :

XIII.1 Expression des gènes circadiens glandes surrénales des lignées de souris C57BL / 6 et 129S2

Košir et al. (2016), ont évalué les modèles d'expression génique de 10 gènes horloges centrales et 15 gènes métaboliques collectés dans des conditions DD et LD (figure supplémentaire S2)(Annexe). Dans les glandes surrénales, ils se sont concentrés sur le métabolisme des stéroïdes (Cyp51, Cyp17a1, Cyp11a1, Cyp11b2, Cyp21a1). Une liste détaillée se trouve dans le tableau supplémentaire S1 (Annexe). Une analyse cosinor a été faite pour l'étude de données d'expression des gènes pour déterminer la présence / l'absence d'oscillation circadienne (tableau 1, tableau supplémentaire S2). Dans des conditions LD, tous les gènes horloge centrale ont montré un rythme diurne clair dans les glandes surrénales des deux lignées de souris (tableau 1). Les gènes métaboliques sont significativement plus affectés par le génotype puisque beaucoup sont circadiens (DD) et diurnes (LD) dans une mais pas dans l'autre lignée de souris dans la même condition (tableau supplémentaire S2). Dans l'ensemble, un plus grand nombre de gènes étudiés affiche une expression circadienne et diurne dans le génotype 129S2 (87%) par rapport au C57BL/6J (76%) (tableau 3).

	Souche 129S2		C57BL/6J	
	DD	LD	DD	LD
Gènes d'horloge de base	10 (100%)	10 (100%)	9 (90%)	10 (100%)
Gènes métaboliques	1 (17%)	6 (100%)	3 (50%)	4 (67%)
Tous les gènes	11 (69%)	16 (100%)	12 (75%)	14 (88%)
Par tissu et souche	27 (84%)		26 (81%)	

Tableau 3 : évaluation de la rythmicité circadienne dans l'expression des gènes dans la surrénal .(Kosir et al ., 2016)

Remarque :

Le gène *Per1* est arythmique sous DD chez les souris C57BL par rapport au souris 129S2.

Au contraire le gène *Per1* sous LD est rythmique chez les deux souches.

Les gènes *Cyp11a1* et *Cyp21a1* sont rythmiques sous DD les souris C57BL par rapport au 129S2.

Le gène *Cyp11a1* sous LD est rythmique chez les deux souches.

Le gène *Cyp21a1* est arythmique sous LD chez les souris C57BL par rapport au 129S2.

La présence d'une oscillation circadienne (DD) ou diurne (LD) pour chaque gène a été déterminée avec l'analyse cosinor des données d'expression recueillies avec qRT-PCR. Une valeur p de 0,01 a été déterminée comme une coupure de valeur au-dessus de laquelle les gènes n'étaient pas considérés comme ayant un modèle d'expression circadien ou diurne. Le nombre et le pourcentage de gènes présentant un schéma circadien ou diurne est indiqué ci-dessous pour chacune des 8 conditions possibles en fonction du nombre de souches (2), de tissus (2) et de conditions d'éclairage (2). Une liste des gènes horloge centrale et des gènes métaboliques se trouve dans le tableau supplémentaire S1.

L'analyse comparative montre que les phases de plusieurs gènes horloge de base sont affectées par le génotype, y compris *Per2*, *Dec1*, *Cry1* et *Rev-ErbA* dans les glandes surrénales (Figures 21 et 22). Les différences de phases sont principalement observées dans des conditions de LD (figures 21B et 22B). Comme le montre la figure 3, l'expression

maximale des gènes horloge de base est retardée en phase dans C57BL/6J par rapport au 129S2 à l'exception de Rev-ErbA dans les glandes surrénales (figure 19A).

Dans des conditions de lumière, tous les gènes métaboliques pour lesquels la rythmicité circadienne ou diurne a été confirmée ont montré un retard de phase dans le génotype C57BL/6J (figures 18 et 19). Le retard de phase est en moyenne de 2,8 h pour les gènes horloge de base et de 6,1 h pour les gènes métaboliques pour les tissus et les conditions lumineuses.

Interprétation : diagrammes démontre la rythmicité circadienne chez les gènes de base et métabolique au niveau de la surrénale mis sous DD et LD pendant 24h.

Sous DD :

Les rythmicités des gènes Per2, Cry1, Dec1 sont augmentés en période de la nuit et hautement exprimés chez la souche C57BL /6J par rapport au souris 129S2 Cyp51a1, les résultats sont presque égaux, contrairement à REV-ErbA l'expression diminue en période de nuit et hautement exprimés chez la souche 129S2 par rapport au souris C57BL /6J.

Cyp21a1 est rythmique que chez la souche C57BL /6J.

Cyb39a1 et Cyb17a1 est arythmique chez les deux souches.

Sous LD :

Per1, Cry1, Dec1, Rev-ErbA, Cyp51a1, Cyp17a1 sont augmentés en période du jour que de la nuit avec une expression plus élevée et une rythmicité plus apparente chez la souche 129S2 par rapport à la souche C57BL /6J sauf en fin de la période de nuit il y'a un léger haussement des rythmicités chez la souche C57BL /6J.

-Cyp21a1 et Cyp39a1 est rythmique que chez la souche 129S2 et augmentés qu'en période de nuit.

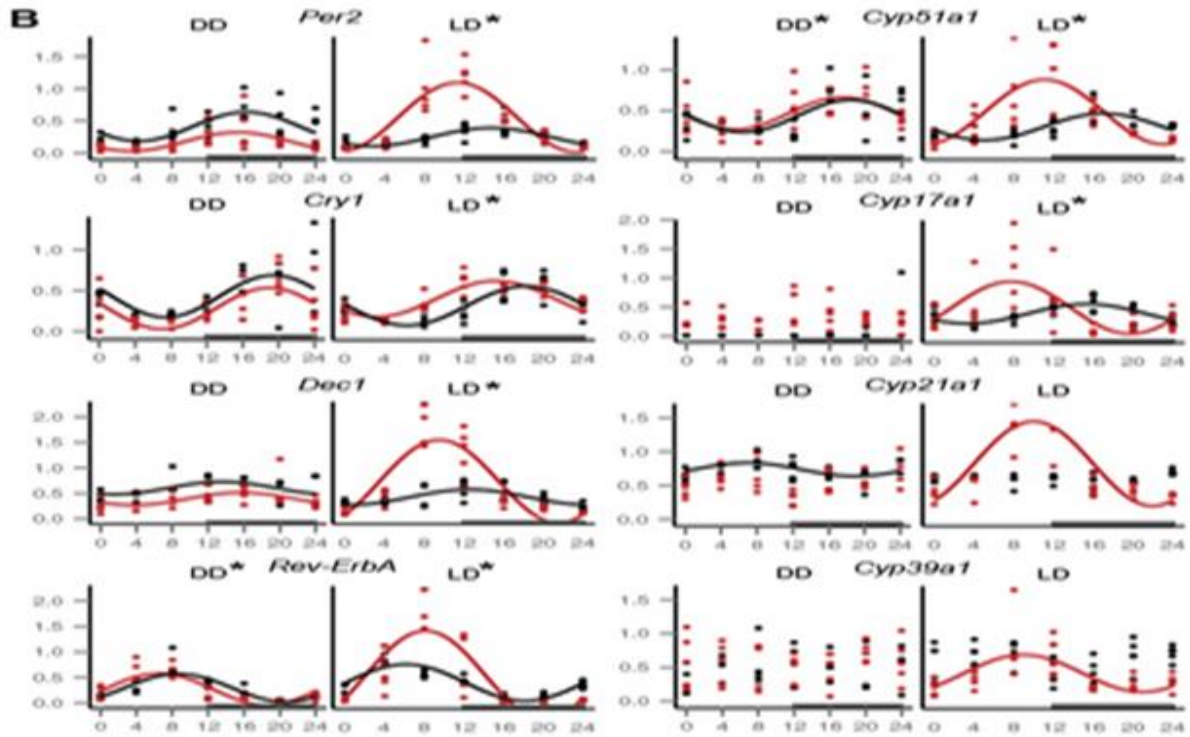


Figure 18 : Modèles d'expression des gènes circadiens (Kosir et al ., 2016)

Des différences de phase de l'horloge centrale et des gènes métaboliques ont été découvertes. Chaque point représente un échantillon de souris de la souche 129S2 (rouge) ou C57BL / 6J (noir). Les courbes confirment la présence d'un rythme circadien (DD) ou diurne (LD) basé sur l'analyse cosinor avec une période de 24 h. Si aucune courbe n'est présente, le gène n'a pas montré de modèle d'expression circadien statistiquement significatif ($p < 0,01$). Les souris ont été échantillonnées toutes les 4 heures pendant une période de 24 heures dans des conditions DD - sombre-sombre ou LD - clair-sombre. L'axe horizontal représente le temps circadien ou diurne de l'échantillonnage ; CT0 correspond à 7 heures du matin. Le rectangle gris foncé indique la nuit et la nuit subjectives dans des conditions DD et LD respectivement.

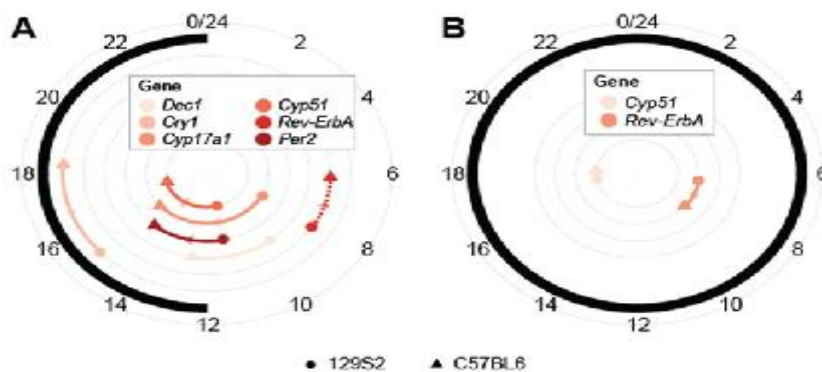


Figure 19 : Effet génotypique de la phase d'expression génique.(Kosir et al ., 2016)

La journée de 24 h est représentée sous la forme d'un diagramme circulaire avec chaque gène représenté sur un cercle concentrique séparé. Le moment du pic d'expression (phase) pour chaque gène (code couleur) est marqué d'un cercle (129S2) ou d'un triangle (C57BL/6J) selon le génotype de la souris. Les lignes colorées pleines et en pointillés représentent les gènes pour lesquels le génotype C57BL/6J présentait respectivement un retard de phase ou une avance de phase. La ligne noire continue indique le temps d'extinction des lumières (obscurité) dans les conditions LD (A) et DD (B). Tous les gènes à l'exception de Rev-ErbA présentent un retard de phase (pic d'expression à un CT ultérieur) dans la souche C57BL/6J dans toutes les conditions, Rev-ErbA dans les glandes surrénales dans des conditions de LD (A - ligne pointillée) montre une avance de phase. L'effet le plus important du génotype a été observé dans des conditions de LD.

Discussions des résultats lié au génotype :

Le degré relativement élevé de similitudes anatomiques, physiologiques et génomiques entre les humains et les souris (environ 95 % des gènes sont commun) des modèles de souris importants pour l'étude de diverses questions biomédicales (Arble et al., 2010 ; Bryda et al., 2013). Pour éliminer les résultats trompeurs dus à la variabilité génétique des souris, des lignées présentant le plus faible degré de variabilité intra-souche ont été sélectionnées. Cela nous a empêché de voir les effets des antécédents génétiques de la souris sur les processus étudiés Troublesomevariability in mouse studies. Nat Neurosci 12, 1075 (2009).

En montrant un effet génotypique clair sur l'expression génique circadienne ou diurne, avec des différences dans les phases et les amplitudes de l'horloge de base et des gènes métaboliques dans les lignées de souris C57BL/6J et 129S2

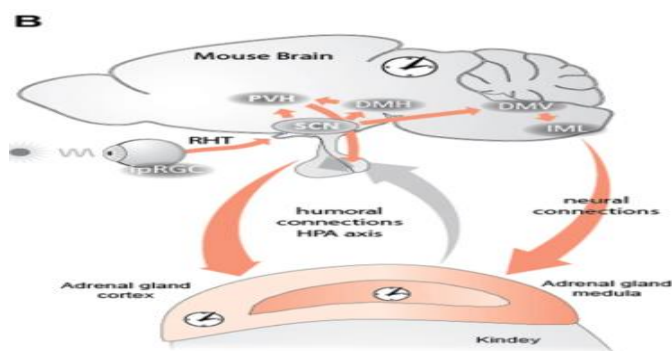


Figure 20 : effet du génotype sur l'expression des gènes.(kosir et al ., 2016)

Conclusion

Le présent travail porte sur l'effet des facteurs externes, représentés essentiellement par : la lumière, la nourriture, et le facteur interne représenté par le fond génétique, sur la synchronisation des gènes de contrôle de la biosynthèse et de la rythmicité de la fonction corticosurrénalienne chez la souris.

1- L'effet de la lumière :

-l'activation photique du NSC stimule la libération aigue des glucocorticoïdes par la glande surrénale par un mécanisme indépendant de la stéroïdogénèse et de l'axe HPA (Ishida et al.,2005), mais plutôt, par un mécanisme neural impliquant le système nerveux sympathique.

-l'expression des gènes horloge surrénaux dépendent du cycle circadien et de l'intensité lumineuse.

-le taux plasmatique de la corticostérone induit par la lumière était fortement liée à l'expression des gènes horloges.

-l'augmentation de la corticostérone plasmatique observée après la stimulation lumineuse de forte intensité (3500 lux) ne serait pas médiée par une augmentation de l'écart, les niveaux ;ACTH ne différaient pas entre les animaux témoins maintenus dans l'obscurité (0 lux) et les animaux stimulés avec une lumière de 3500 lux.

2-L'effet du régime alimentaire :

-Il semble que le régime hyper gras et hyper salé réduit ;activité locomotrice dans les conditions LD et DD.

-les niveaux d'expression des gènes horloge dans la surrénale : Bmal1 ; Clock ; Per1 ; Per2 et Cry2 est significativement plus faible chez le groupe de souris soumis à un régime hyper gras et hyper salé.

-le régime restreint peut décaler l'expression des gènes surrénaux (Per1, Per2, Arntl et Nr1d1) durant les phases claire et sombre qui laisse déduire que la nourriture est un puissant Zeitgeber pour la synchronisation de l'horloge surrénalienne périphérique et pourrait détacher les oscillateurs surrénaux du rythme central produit par le NSC.

3- L'effet génotypique sur l'expression rythmique des gènes horloge et métabolique

-les phases des gènes horloge (Per2, Dec1, Cry1 et Rev-ErbA) sont affectées (voir retardés en phase) par le génotype, dans les glandes surrénales dans les conditions lumière /obscurité, suggérant que les voies d'entraînement pourraient être affectées par le génotype de la souris.

Ce qui déduit que le fond génétique a un grand impact sur la rythmicité circadienne des gènes horloge et métabolique.

Références

- Abdel-Malek ZA (2001) Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci* 58:434–441.
- ADEME. Jean-Michel Monier et Sébastien Cécillon. 2015. Les outils de biologie moléculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués – Synthèse. 39 pages.
- Angeletti L, Revue de la littérature sur l'implication du cortisol dans l'origine chronobiologique de la dépression, doctorat en médecine troisième cycle, université de Lorraine, 2017, p62.
- Arble, D. M., Ramsey, K. M., Bass, J. & Turek, F. W. Circadian disruption and metabolic disease: findings from animal models. *Best Pr. Res Clin Endocrinol Metab* 24, 785–800 (2010).
- Bachmanov, A. A., Reed, D. R., Beauchamp, G. K. & Tordoff, M. G. Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains. *Behav. Genet.* 32, 435–443 (2002).
- Bargiello, T. A., Jackson, F. R., Young, M. W., 1984. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature.* 312, 752-4.
- Buijs RM, Wortel J, van Heerikhuizen JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, et al. (1999) Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus-adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci* 11:1535–1544.
- Bittman EL, Doherty L, Huang L, Paroskie A (2003) Period gene expression in mouse endocrine tissues. *Am J Physiol* 285:R561–R569.
- Bonnemaison, Charlotte. Développement et validation de sondes d'hybridation in-situ pour le tracking des cellules souches mésenchymateuses canines dérivées du tissu adipeux. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 66 p.
- Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ (1990) Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinol* 127:900–906.
- Brooker C. (2000). Le corps humain. Étude, structure et fonction édition De Boeck Supérieur,
- Chung S, Lee EJ, Cha HK, Kim J, Kim D, Son GH, Kim K. Rôles coopératifs de l'horloge centrale du noyau suprachiasmatic et de l'horloge surrénale dans le contrôle du rythme circadien des glucocorticoïdes. *Représentant Sci.* 2017 ; 7 :46404.
- Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2011;1812(5):581-91.
- Dallmann R, Touma C, Palme R, Albrecht U, Steinlechner S. Rythme glucocorticoïde quotidien avec facultés affaiblies chez les souris *Per1^{Brd}*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2006 ; 192 (7) : 769-775. 16, 67–74 (2010).
- Damiola, F. et al., Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14, 2950–2961 (2000).
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The circadian mammalian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.* 2010 ; 72 (1) : 517-549.
- Dibner, C. & Schibler, U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J Intern Med* 277, 513–527 (2015).
- Dunlap, J. C., 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell.* 96, 271-90.




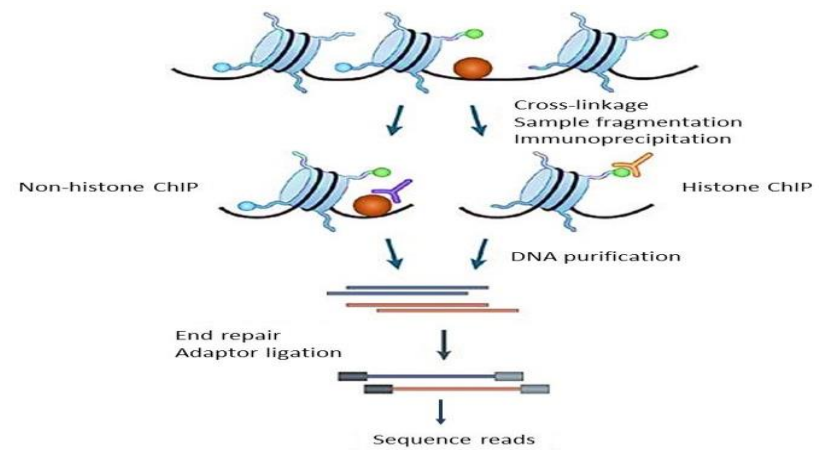
- Durand G, Beaudoux J L. (2011). Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives. Éditeur Lavoisier, 475-476 P.
- Doi, M. et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med.*
- Eade NR, Wood DR (1958) The release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal medulla of the cat during splanchnic stimulation. *British J Pharmacol Chemother* 13:390–394.
- Engeland, W. C. Sensitization of endocrine organs to anterior pituitary hormones by the autonomic nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* 117, 37–44 (2013).
- Engeland WC, Arnhold MM (2005) Neural circuitry in the regulation of adrenal corticosterone rhythmicity. *Endocrine* 28:325–332.
- Fabrice Coppex, Anatomie fonctionnelle et topographique du système nerveux humain, chapitre 5 Les circuits du stress, Version 3.0 - 28.02.2005 réalisé par site de université de Geneve .
- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J. & Jørgensen, H. L. Altered rhythm of adrenal clock genes, StAR and serum corticosterone in VIP receptor 2-deficient mice. *J. Mol. Neurosci.* 48, 584–596 (2012).
- Fuller PM, Lu J, Saper CB. Sauvetage différentiel des rythmes circadiens entraînés par la lumière et la nourriture. *Sciences* . 2008 ; 320 (5879) :1074-1077.
- Herzog éd. Neurones et réseaux aux rythmes quotidiens. *Nat Rev Neurosci* . 2007 ; 8 (10) :790–802.
- Girotti, M., Weinberg, M. S. & Spencer, R. L. Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E888–E897 (2009).
- Guyton A. (1991). Précise de physiologie médicale. Huitième édition, 842 P.
- Hara, R. et al. Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6, 269–278 (2001).
- Hatanaka, F. et al. Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. *Mol Cell Biol* 30, 5636–5648 (2010).
- Holland WC, Schumann HJ (1956) Formation of catechol amines during splanchnic stimulation of the adrenal gland of the cat. *British J Pharmacol Chemother* 11:449–453.
- Ikeda M, Nomura M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 233(1):258–64. Epub 1997/04/07.
- Ishida, A. Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H. Light activates the adrenal gland : timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.* 2, 297–307 (2005).
- Halberg, F. (1953). Some physiological and clinical aspects of 24-hour periodicity. *Lancet* 73, 20–32
- Kalsbeek, A., van Heerikhuizen, J. J., Wortel, J. & Buijs, R. M. A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist. *J. Neurosci.* 16, 5555–5565 (1996).
- Kiessling S, Sollars PJ, Pickard GE (2014) Light Stimulates the Mouse Adrenal through a Retinohypothalamic Pathway Independent of an Effect on the Clock in the Suprachiasmatic Nucleus. *PLoS ONE* 9(3): e92959. doi:10.1371/journal.pone.0092959.
- Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu MC, Bae SH, Rhee SG. Rétrocontrôle de la stéroïdogénèse surrénale via l' inactivation réversible et dépendante de H₂O₂ de la peroxyredoxine III dans les mitochondries. *Cellule Mol.* 2012 ; 46 (5) : 584–594.

- Kil, I. S. et al. Feedback control of adrenalsteroidogenesis via H₂O₂-dependent, reversible inactivation of peroxiredoxin III in mitochondria. *Mol. Cell* 46, 584–594 (2012).
- King DP, Takahashi JS (2000) Moleculargenetics of circadianrhythms in mammals. *Ann RevNeurosci*23:713–742.
- Klein DC, Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-Omethyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*174:245–262.
- Koike, N. et al. Transcriptional Architecture and ChromatinLandscape of the CoreCircadianClock in Mammals. *Science* 338,349–354 (2012).
- Konopka, R. J., Benzer, S., 1971.Clock mutants of *Drosophila melanogaster* SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC. *Proc NatlAcadSci USA*. 68, 2112-6.
- Košir R, ProsenčZmrzljak U, Korenčič A, Juvan P, Ačimovič J, Rozman D .2016 , Mouse genotypes drive the liver and adrenal gland clocks.p13.
- Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlenhaut NH, Jonker JW, et al. Cryptochromes mediaterythmicrepression of the glucocorticoidreceptor. *Nature*. 2011; 480(7378):552–6. Epub 2011/12/16. <https://doi.org/10.1038/nature10700> PMID: 22170608; PubMed Central PMCID: PMC3245818.
- Leliavski, A., Shostak, A., Husse, J. &Oster, H. Impairedglucocorticoid production and response to stress in Arntl-deficient male mice. *Endocrinology* 155, 133–142 (2014).
- Lightfoot, J. T. et al. Strain screen and haplotype association mapping of wheel running in inbred mouse strains. *J. Appl. Physiol.* 109, 623–634 (2010).
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF, Clark BJ, Stocco DM, et al. (1995) Role of steroidogenic acute regulatoryprotein in adrenal and gonadalsteroidogenesis. *Science* 267:1828–1831.
- Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Régulation de l'expression du gène de la protéine régulatrice aiguë stéroïdogène : perspectives présentes et futures . *Mol Hum Reprod* . 2009 ; 15 (6):321-333.
- Martin C,ValletB,Riou B. (2017). *Physiologie humaine appliquée* (2e édition). Éditeur Arnette John Libbey Eurotext.384, 431.
- Miller WL (2007) Steroidogenic acute regulatoryprotein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *BiochimBiophys Acta* 1771:663–676.
- Minette M, HasenmajerV, PofilR ,Venneri M A, KrystalleniaAlexandraki and Isidor M A, Fixing the brokenclock in adrenal disorders: focus on glucocorticoids and chronotherapy , Using hormones and drugs as Entrainers *Journal* 2019, 246:2 R21.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS (2012) Central and peripheralcircadianclocks in mammals. *Ann RevNeurosci*35:445–462.
- Mohn, C. E. et al. The rapid release of corticosteronefrom the adrenalinduced by ACTH ismediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 102, 6213–6218 (2005).
- Morin LP (2013) Neuroanatomy of the extendedcircadianrhythm system. *ExpNeurol*243:4–20.
- Mutoh T, Shibata S, Korf HW, Okamura H (2003). Melatoninmodulates the light-inducedsympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Physiol*547:317–332.
- Nakao, N. et al. Circadianclockgeneregulation of steroidogenic acute regulatoryproteingene expression in preovulatoryovarianfollicles. *Endocrinology* 148, 3031–3038 (2007).
- Nijijima A, Nagai K, Nagai N, Nakagawa H (1992) Light enhancessympathetic and suppresses vagal outflows and lesionsincluding the suprachiasmatic nucleus eliminatethese changes in rats. *J AutonomNerv Sys* 40:155–160.

- Oster H, Challet E, Ott V, Arvat E, de Kloet ER, Dijk DJ, Lightman S, Vgontzas A, Van Cauter E. La signification fonctionnelle et clinique du rythme de 24 heures des glucocorticoïdes circulants . *EndocrRev* . 2017 ; 38 (1):3–45.
- Oike H, Nagai K, Fukushima T, Ishida N, Kobori M. High-saltdietadvancesmolecularcircadianrhythms in mouse peripheral tissues. *BiochemBiophysRes Commun*. 2010; 402(1):7–13. Epub 2010/10/05. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.072> PMID: 20888322.
- Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N. Genome-wide expression analysisreveals 100 adrenal gland-dependentcircadiangenes in the mouse liver. *DNA Res*. 2005; 12(3):191–202. Epub 2005/11/24.
- Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, et al. (2006) ,Thecircadianrhythm of glucocorticoidsisregulated by a gatingmechanismresiding in the adrenal cortical clock. *CellMetab*4:163–173. (2006).
- Park SY, Walker JJ, Johnson NW, Zhao Z, Lightman SL, Spiga F. La lumière constante perturbe le rythme circadien des protéines stéroïdogènes dans la glande surrénale du rat . *Mol CellEndocrinol* . 2013 ; 371 (1-2):114-123.
- Park, J. et al. Single- celltranscriptionalanalysisrevealsnovel neuronal phenotypes and interaction networks involved in the central circadianclock. *Front. Neurosci*. 10, 481 (2016) in Hastings M H. Elizabeth S. Maywood and Marco B ,2018, Generation of circadianrhythms in the suprachiasmatic nucleus.
- Park, S. Y. et al. Constant light disrupts the circadianrhythm of steroidogenicproteins in the rat adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol*. 371, 114–123 (2013).
- Philippe N, Legendre M, Doutre G, Couté Y, Poirot O, Lescot M, Arslan D, Seltzer V, Bertaux L, Bruley C, Garin J, Claverie JM, Abergel C. Pandoraviruses:amoebaviruseswithgenomes up to 2.5 Mb reachingthat of parasiticeukaryotes. *Science*. 2013 Jul19;341(6143):281-6. doi: 10.1126/science.1239181. Erratum in: *Science*. 2013 Sep 27;341(6153):1452. PMID: 23869018.
- Pontes ALB de, Engelberth RCGJ, Nascimento J, Cavalcante JC, Costa MSM de O, Pinato L, et al. Serotonin and circadianrhythms. *Psychology & Neuroscience*. 2010;3(2):217-28.
- PugnièreP , Contribution à l'Amélioration de la Quantification des Acides Nucléiques par qPCR et RT-qPCR,doctorat, UNIVERSITÉ DE GRENOBLE, 2006,p298.
- Ralph, M. R., Menaker, M., 1988. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science*.241, 1225-7.
- Schibler U, Ripperger J, Brown SA (2003) Peripheralcircadianoscillators in mammals: time and food. *J Biol Rhythms*18:250–260.
- Schrader JA, Nunez AA, Smale L (2010) Changes in and dorsal to the rat suprachiasmatic nucleus durigearlypregnancy. *Neurosci*171:513–523. 48. Eade NR, Wood DR (1958) The release of adrenaline and noradrenalinefrom the adrenalmedulla of the cat duringsplanchnic stimulation. *British J PharmacolChemother*13:390–394.
- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B. and Young, M.W. (1994) Loss of circadianbehavioralrhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, 263, 1603-1606.
- Son GH, Cha H K, Chung S, Kim K, Multimodal Regulation of CircadianGlucocorticoidRhythm by Central and AdrenalClocks, *J Endocr Soc*,2018 ;2(5): 444–459.
- Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, Lee HW, Choi S, Sun W, Kim H, Cho S, Lee KH, Kim K. L'horloge périphérique surrénale contrôle le rythme circadien autonome de glucocorticoïde en provoquant une production rythmique de stéroïdes . *Proc NatlAcadSciUSA* . 2008 ; 105 (52):20970–20975.
- Son GH, Chung S, Choe HK, Kim HD, Baik SM, Lee H, Lee HW, Choi S, Sun W, Kim H, Cho S, Lee KH, Kim K. L'horloge périphérique surrénale contrôle le rythme circadien autonome de glucocorticoïde en provoquant une production rythmique de stéroïdes . *Proc NatlAcadSciUSA* . 2008 ; 105 (52):20970–20975.

- Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *AnnuRevPhysiol.* 2001,63:193–213. Epub 2001/02/22.
- Thibault C, Levasseur M C. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme. Éditeur Editions Quae.152 P.
- Troublesomevariability in mouse studies. *Nat Neurosci* 12, 1075 (2009).
- Ulrich-Lai, Y. M., Arnhold, M. M. &Engeland, W. C. Adrenalsplanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulatingadrenalsensitivity to ACTH. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1128–R1135 (2006).
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D.,Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., Takahashi, J. S., 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadianbehavior. *Science.* 264, 719-25.
- Wakamatsu, H. et al. Restricted-feeding-inducedanticipatoryactivityrhythmisassociatedwith a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. *Eur. J. Neurosci.* 13, 1190–1196 (2001).
- Yang S, Liu A, Weidenhammer A, Cooksey RC, McClain D, Kim MK, Aguilera G, Abel ED, Chung JH. Le rôle du gène de l'horloge *mPer2* dans les rythmes des glucocorticoïdes et de l'alimentation. *Endocrinologie.* 2009 ; 150 (5) : 2153-2160.
- Yokoyama Y, Nakamura TJ, YoshimotoK,Ijyuin H, Tachikawa N, Oda H, et al. (2020) A highsalt/ high fat dietalterscircadianlocomotoractivity and glucocorticoidsynthesis in mice. *PLoS ONE* 15 (5): e0233386.
- Zaidi SK, Shen WJ, Bittner S, Bittner A, McLean MP, Han J, Davis RJ, Kraemer FB, Azhar S. p38 MAPK régule la stéroïdogenèse par la répression transcriptionnelle du gène STAR . *J Mol Endocrinol .* 2014 ; 53 (1):1-16.
- Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. Un atlas d'expression génique circadienne chez les mammifères : implications pour la biologie et la médecine . *Proc NatlAcadSciUSA .* 2014 ; 111 (45):16219-16224.
- Zhu, H. et al. Integrative Gene Regulatory Network AnalysisReveals Light-InducedRegional Gene Expression Phase Shift Programs in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus. *PLoS ONE* 7, e37833 (2012).
- Zurita, E. et al. Geneticpolymorphismsamong C57BL/6 mouse inbredstrains. *TransgenicRes.* 20, 481–489 (2010).

ANNEXE

Matériel	Information :
Cage KY-1 : CL-0135 Et la roue de course	<p>-activité locomotrices des souris HFS , HF ,C</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>Figure : Cage KY-1 : CL-0135 roue de course</p>
Centrifugeuse	
ChIP-seq	<p>-ChromatinImmunoPrecipitationSequencing . -analyser les interactions entre les protéines et l'ADN. -Cette technologie combine l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), en utilisant des anticorps spécifiques d'une protéine d'intérêt et le séquençage haut débit. -cartographier tous les sites de liaison sur l'ADN d'une protéine d'intérêt à l'échelle du génome. (<i>PJ Park et al. 2009</i>).</p> <p>Le principe de la méthode consiste à fixer de façon covalente les protéines liées à l'ADN(histones) par un traitement chimique, de fragmenter la chromatine, d'isoler des complexe ADN-protéines par immunoprécipitation en présence de l'anticorps d'intérêt. Une fois l'élimination des protéine et la purification, les fragments d'ADN obtenus sont séquencés.</p> <div style="text-align: center;">  </div>
films d'autoradiographie	<p>L'autoradiographie est une technique permettant de localiser et de visualiser un composé marqué par un isotope radioactif dans un échantillon solide par production d'une image dans une émulsion photographique.</p> <p>les composés marqués :(ADN ou de protéines) l'échantillon solide (chromatine fixée ou un échantillons monté sur une lame de verre).</p> <p>L'échantillon solide est placé au contact immédiat d'un film à rayons X, feuille de plastique recouverte d'une émulsion photographique. L'émission radioactive provenant de l'échantillon</p>

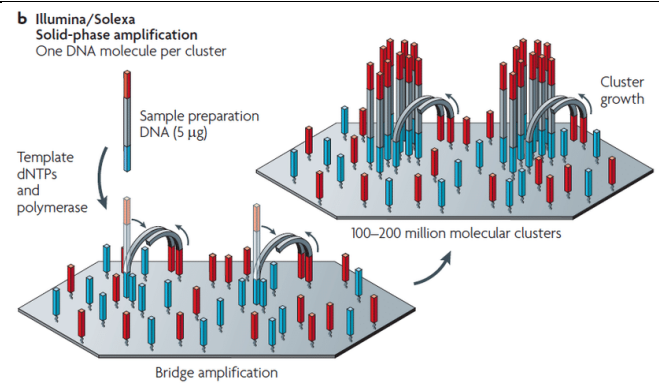
traverse l'émulsion et transforme les ions Ag^+ en atomes d'Ag.
 L'autoradiographie directe est mieux adaptée à la détection des radio- isotopes à émission β faible ou moyenne . Cependant, les particules β à haute énergie passeront à travers le film en perdant la majorité de leur énergie (Tableau). Pour les échantillons qui émettent des radiations de forte énergie, une modification est nécessaire. Elle consiste en la conversion en lumière de l'énergie émise grâce à un agent chimique adéquat (scintillateur ou fluor).
 (Tom STRACHAN et Andrew READ , édition 4eme , génétique moléculaire humaine , Lavoisier , p200 ,Chapitre 7 : Hybridation des acides nucléiques : principes et applications,2004)

TABLEAU 1 CARACTÉRISTIQUES DES RADIO-ISOTOPES UTILISÉS EN GÉNÉRAL POUR MARQUER LES SONDAS ADN ET ARN

Isotope	Demi-vie	Type d'émission	Énergie émise (MeV)	Temps d'exposition	Adéquation pour des études à haute résolution
3H	12,4 années	β^-	0,019	Très long	Excellente
^{32}P	14,3 jours	β^-	1,710	Court	Mauvaise
^{33}P	25,5 jours	β^-	0,248	Moyen	Intermédiaire
^{35}S	87,4 jours	β^-	0,167	Moyen	Intermédiaire

Illumina

Amplification en phase solide - séquençage par synthèse (mesure de fluorescence)
 L'ADN génomique est fragmenté.
 Des adaptateurs sont fixés aux extrémités des fragments d'ADN.
 L'ADN est dénaturé puis chaque brin est immobilisé en le fixant à une amorce, elle-même fixée sur un support.
 Le brin complémentaire est synthétisé puis ce nouvel ADN double-brin est dénaturé.
 Chaque brin fixé forme alors un pont en s'hybridant localement avec l'amorce complémentaire de l'autre extrémité. Le brin complémentaire est synthétisé.
 L'opération est répétée un grand nombre de fois : il y a formation d'amas ("*cluster*") du même fragment d'ADN.



Grzych (2018)

Un nucléotide marqué par une étiquette fluorescente ("*fluorescently labeled chain-terminating nucleotide*") est incorporé dans la chaîne en cours de synthèse (synthèse du brin complémentaire de celui qui est séquençé). La fluorescence de ce nucléotide est mesurée. Mais l'incorporation de ce terminateurs de chaîne est réversible, ce qui permet que la synthèse continue jusqu'à ce qu'un autre terminateur de chaîne soit incorporé.

Faible taux d'erreurs d'insertion/délétion (indel).
 1 milliard de bases séquencées (lectures d'environ 30-40 bases - les terminateurs de chaîne réversibles sont incorporés moins efficacement) avec une exactitude moindre que la technologie 454.

Immunoblot

Un western blot.

Séparation des échantillons protéiques par rapport à leur poids protéique sur le gel électrophorèse possédant un champ électrique . Plus les protéines ont une taille importante, moins elles migrent vite ;

une fois que les protéines ont migré, elles sont transférées sur une membrane qui peut être composée de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène (PVDF). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines ;

blocage de la membrane : cette étape est indispensable pour limiter les interactions non spécifiques ultérieures entre les anticorps et la membrane. Le blocage est réalisé dans une solution de protéines concentrées ;

détection : le principe consiste à appliquer sur la membrane des anticorps marqués qui sont spécifiques des protéines que l'on veut observer. On pourra ainsi observer leur position sur le gel.(Futura science)

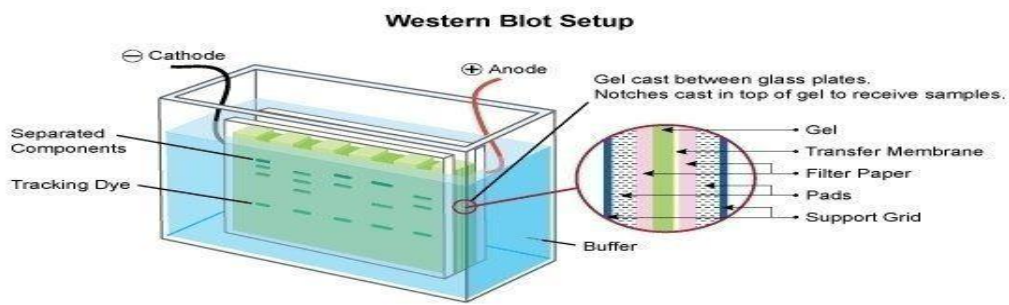


Diagram 1: Illustration of Western Blot Setup.

(Anticops en ling.fr)

Avantage :
Sensibilité

L'un des plus grands arguments en faveur du western blot est sa sensibilité. En raison de sa capacité à détecter aussi peu que 0,1 nanogramme de protéine dans un échantillon, la technique peut théoriquement servir d'outil de diagnostic précoce efficace, détectant même la plus petite réponse immunogène d'un virus ou d'une bactérie dans un échantillon de patient. Un transfert Western indirect renforce encore cette sensibilité à partir de la capacité de l'anticorps secondaire à amplifier l'intensité du signal détecté par le système d'imagerie. Une plus grande sensibilité signifie que moins d'anticorps sont nécessaires pour les tests, ce qui réduit considérablement les coûts de laboratoire.

Spécificité

La technique du Western blot doit sa spécificité à deux facteurs importants. Premièrement, l'électrophorèse sur gel trie un échantillon en protéines de différentes tailles, charges et conformations. Ce processus est en lui-même un énorme pas vers la détection, car les bandes formées dans le gel donnent déjà des indices sur la taille de la protéine ou du polypeptide d'intérêt. La spécificité de l'interaction anticorps-antigène sert de second facteur important. Parce que les anticorps spécifiques montrent une affinité pour des protéines spécifiques, le processus peut détecter sélectivement une protéine cible même dans un mélange de 300 000 protéines différentes.

Inconvénient:

subjectes à des résultats faux ou subjectifs

Malgré sa sensibilité et sa spécificité, un Western blot peut encore produire des résultats erronés. Un résultat faussement positif lorsqu'un anticorps réagit avec une protéine non prévue, ce qui arrive fréquemment lorsqu'un patient soumis à un test de dépistage du VIH est atteint de tuberculose ou d'un certain nombre d'infections parasitaires. D'un autre côté, un faux négatif peut facilement se produire si les protéines plus grosses ne reçoivent pas suffisamment de temps pour se transférer correctement sur la membrane. Un mauvais épongeage et un mauvais traitement produisent souvent des bandes asymétriques, fanées ou même multiples, ce qui soumet les résultats des tests à l'interprétation du technicien.

coût élevé et demande technique

Le coût d'un transfert de Western est un composé des dépenses individuelles importantes pour les anticorps marqués, les analystes qualifiés et l'équipement de laboratoire. Un processus délicat, western blotting nécessite une précision à chaque étape pour l'identification correcte des constituants d'un échantillon. Une erreur mineure dans la concentration du réactif ou dans la période d'incubation peut être désastreuse pour l'ensemble du processus. Enfin, l'équipement requis pour la détection et l'imagerie - les systèmes de détection chimioluminescents, fluorescents, radioactifs ou laser - peut être trop coûteux pour l'unité de microbiologie moyenne.


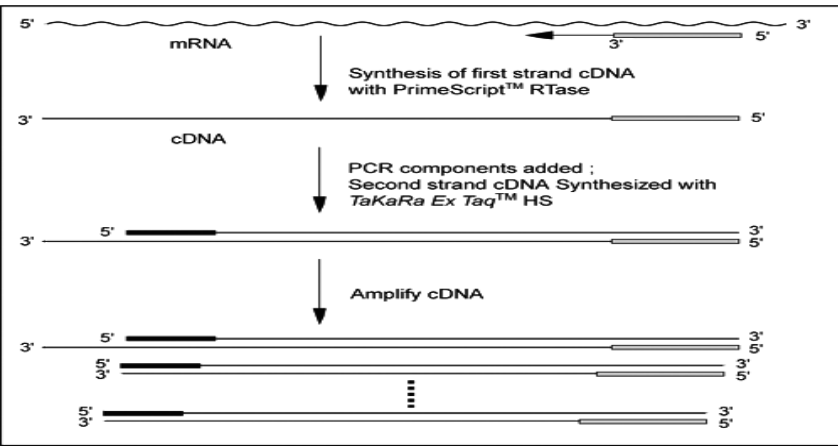
MMLV

MMLV est codée par le virus de la leucémie murine Moloney (La transcriptase inverse MMLV est une **ADN polymérase ARN-dépendante** qui synthétise le premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un modèle d'ARN monocaténaire auquel une amorce a été hybridée. Cette enzyme est également capable d'étendre les amorces hybridées à de l'ADN monocaténaire. La synthèse du deuxième brin de l'ADNc peut être obtenue à partir de certains modèles d'ARNm sans ADN polymérase supplémentaire. La transcriptase inverse M-MLV est utilisée pour la préparation de banques d'ADNc ou pour la synthèse d'ADNc par Reverse-Transcription PCR (RT-PCR).

La transcriptase inverse M-MuLV ne possède **pas d'activité d'exonucléase 3' → 5'**.

Comparée à la transcriptase inverse AMV, la MMLV ne possède pas d'activité endonucléase et a une activité RNase H plus faible. La RNase H (Ribonucléase H) est une endoribonucléase qui hydrolyse spécifiquement les liaisons phosphodiester de l'ARN qui est hybridé à l'ADN. Cette enzyme ne digère pas l'ADN simple brin ou bicaténaire.(clinisciences)

<https://www.clinisciences.com/achat/cat-transcriptase-inverse-mmlv-3526.html>

<p>PIKO Real</p>	
<p>Prime Script RT</p>	<p>Le kit de réactifs PrimeScript RT (Perfect Real Time) comprend la transcriptase inverse PrimeScript pour une forte activité de déplacement de brin et une synthèse efficace de l'ADNc pour la PCR en temps réel. PrimeScriptRTase est une transcriptase inverse MMLV (virus de la leucémie murine de Moloney) recombinante modifiée et il est vérifié qu'elle est RNase H-moins. PrimeScriptRTase est également robuste, polyvalent et peut être utilisé pour la transcription inverse de pratiquement n'importe quelle matrice d'ARN, y compris les matrices qui ont un degré élevé de structure secondaire ou qui sont riches en GC. En raison de l'excellente capacité d'extension de PrimeScript, les réactions de synthèse d'ADNc peuvent être effectuées à 42 °C, minimisant le risque de dégradation de l'ARN qui se produit souvent à des températures plus élevées.(TAKARA),(Clontech),(cellartis)</p> 
<p>RandomHexamers</p>	<ul style="list-style-type: none"> -un mélange d'oligonucléotides représentant toutes les séquences . - amorcer la synthèse dans un oligo-étiquetage similaire à l'utilisation d'hexamères et de la synthèse d'ADNc. Points forts du produit - Mélange d'oligonucléotides -pour ARN(indiamart)

<p>Reverse transcptaseSuperscript III</p>	<p>SuperScript III RT offre des rendements d'ADNc plus élevés, des longueurs d'ADNc améliorées, une efficacité améliorée sur les ARN cibles riches en GC et de meilleures performances globales que les enzymes MMLV de type sauvage et MMLV RNase H moins</p>
<p>RIA</p>	<p>La technique de radio-immunoessais (RIA) repose sur le principe de tous les immuno-essais qui est la reconnaissance d'un antigène présent dans un échantillon par des anticorps dirigés contre cet antigène. Le principe des radio-immunoessais est compétitifs et permet de quantifier des petites molécules, des peptides et des protéines dans des échantillons biologiques.(ANAWA cliniscience groupe)</p> <p>Etapes :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ag spécifique etAc quand en ceux détectéet marqué par (I^{125}) . - la préparation contenait l'Anti-corp est alors incube avec anti gène marqué . -le complexe Ag/Ac en phase liquide sont alors précipité avec une solution de chlorure ammonium . - le culot de précipitation est ensuite lavé et la présence de Ac dosé est déterminer en mesurant la radio activité présente dans le précipité et en comparant avec la courbe standard d'étalonnage <p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Elle est plus spécifique et beaucoup plus sensible. C'est ainsi qu'elle a permis de doser des composés pour lesquels aucune autre méthode de dosage n'était disponible. Enfin, son champ d'application est immense. <ul style="list-style-type: none"> • L'isotope permet un marquage facile. • Le signal est direct, émis par le marqueur lui-même

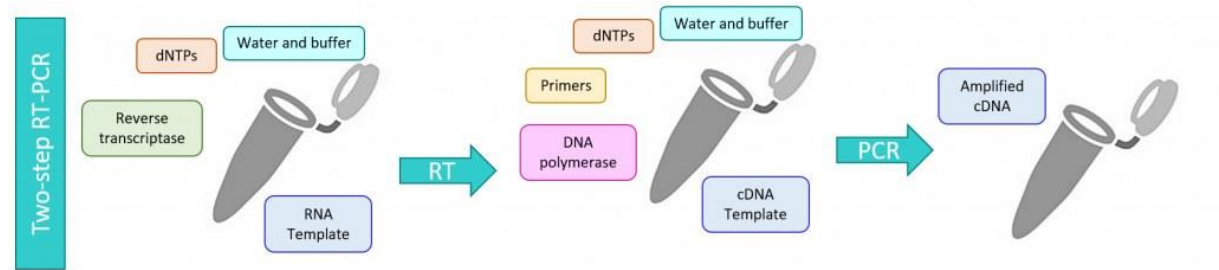
• Le signal est spontané, ne faisant pas intervenir une source d'énergie extérieure

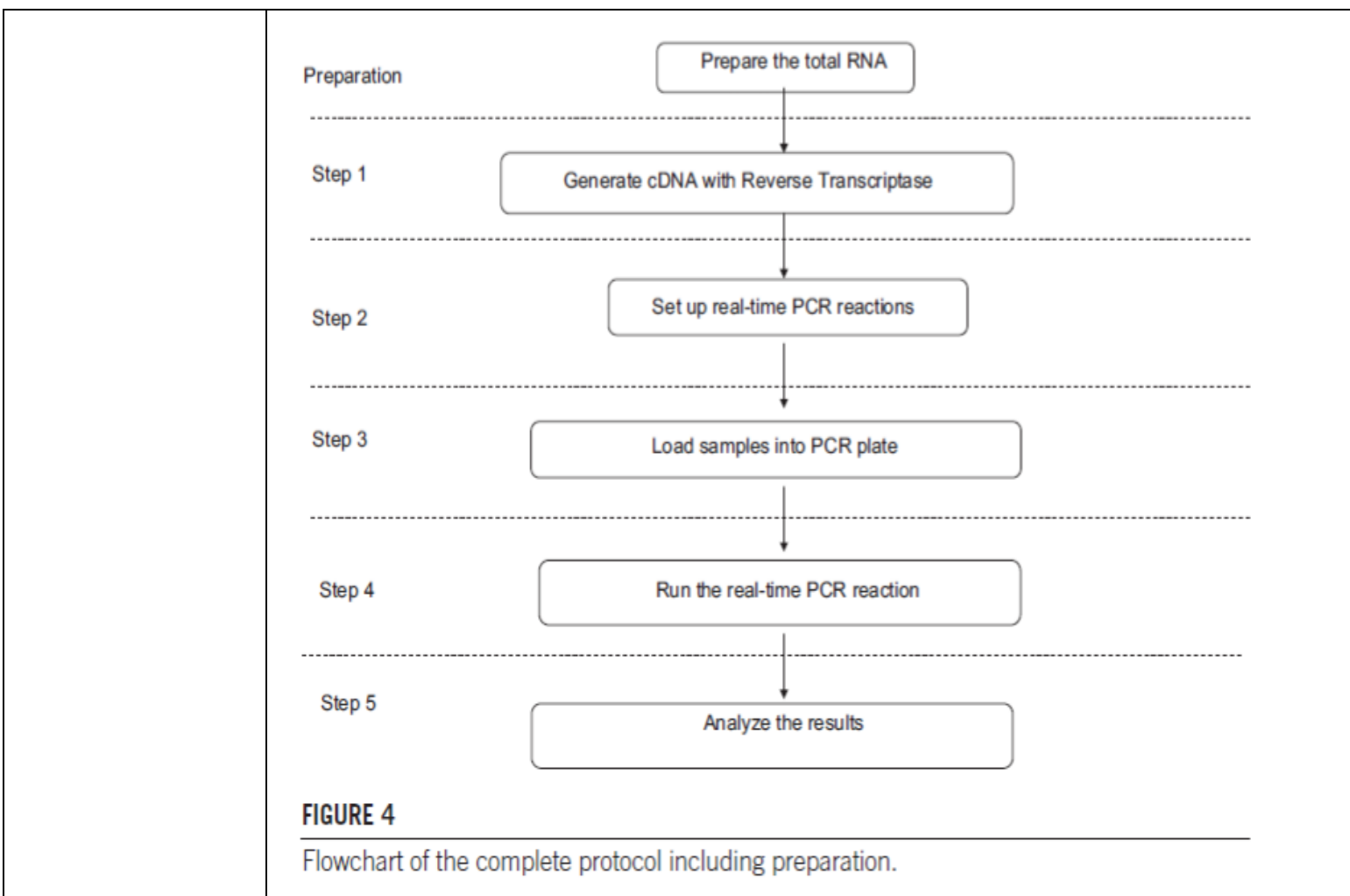
RT-PCR

. Les étapes de RT PCR par les Mix et Kit :

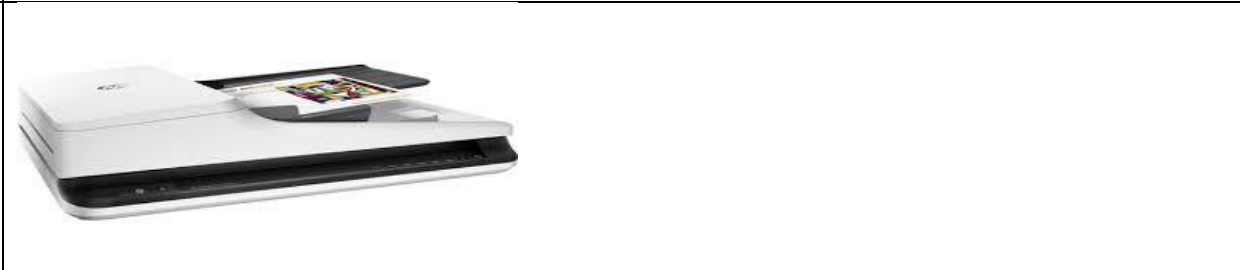
D'après le site CliniSciences La première étape consiste en une synthèse de l'ADNc du premier brin (transcription inverse - RT).

- la seconde est une amplification d'une partie de l'ADNc résultant par PCR dans un tube séparé. Par conséquent, la RT-PCR en deux étapes est utile pour détecter de multiples gènes dans un seul échantillon d'ARN. La séparation des réactions RT et PCR permet d'optimiser les conditions réactionnelles pour chaque étape ainsi que la souplesse avec l'amorçage par transcription inverse (amorces oligo (dT), hexamères aléatoires ou amorces spécifiques de gènes) et PCR (par exemple choix d'ADN polymérase et des composants PCR). Comparés à la RT-PCR en une étape, les inconvénients de la RT-PCR en deux étapes incluent plusieurs étapes pour un flux de travail étendu, une manipulation et un traitement supplémentaires de l'échantillon, et augmentent les risques de contamination et de variation des résultats.





scanner à plat HP Laserjet



SNP et SVN

SNP et SNV sont souvent confondus à tort. Bien qu'ils désignent tous deux la variation d'un seul nucléotide, on parle de SNP quand la mutation est conservée au sein d'une espèce dans une fraction significative de la population (polymorphisme génétique) alors que le SNV est une mutation intrinsèque à un individu, une mutation qui peut se manifester à n'importe quel moment de la vie (cellulaire).

SOAP

SOAPSnp est membre du SOAP (Short Oligonucleotide Analysis Package). Malgré son nom, le programme est un utilitaire de reséquençage qui peut assembler une séquence consensus pour le génome d'un individu nouvellement séquencé en fonction de l'alignement des lectures de séquençage brutes sur la référence connue. Les SNP peuvent ensuite être identifiés sur la séquence consensus par comparaison avec la référence. (SOURCE FORGE)

solution tampon phosphate (PBS)

Ce tampon sert surtout à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter. Il est prévu pour un usage sur les cellules maintenues hors de l'incubateur à CO₂ et n'est pas conçu pour des incubations à long terme. Son pouvoir tampon repose sur le couple dihydrogénophosphate / hydrogénophosphate (pK_A= 7,2), qui est par ailleurs un des trois grands mécanismes permettant le maintien du pH sanguin (HPO₄²⁻ + H⁺ = H₂PO₄⁻).



SYBR Green I

-PCR quantitative .

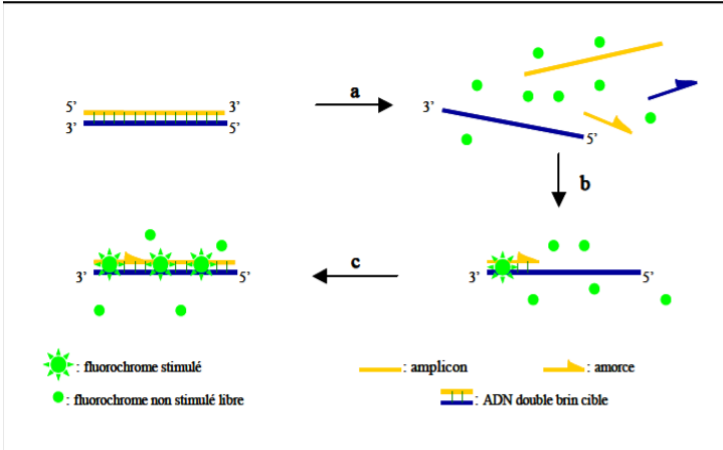


Figure : étapes de la SYBER Green
 c'est un colorant devient fluorescent quand il intègre L'ADN double brain .

Matériels :



- Master Mix SYBER
- RT-PCR primers
- Transcriptase inverse (transcriptase inverse M-MLV)
- Inhibiteur de RNase
- 10 M de dNTP
- 10 M oligo dT18 ou oligo dT21
- Oligo-hexamère aléatoire, Tampon de réaction RT (livré avec la transcriptase inverse)
- ,Plaques PCR 96 puits ou 384 puits ,Tubes PCR 0,2 mL/8 bandes
- Film de couverture transparent optique ou capuchons transparents optiques , Pipette ,Pointes de pipette sans DNase/RNase, Eau de qualité PCR sans nucléase ,Microtubes à centrifuger de 1,5 ml ,Des gants (Yibing Jia chapitre 3 , 2012)

Avantages du colorant SYBR :
 Il peut être utilisé pour surveiller l'amplification de toute séquence d'ADN double brin.

Aucune sonde n'est requise, ce qui peut réduire la configuration du test et les coûts de fonctionnement, en supposant que les amorces PCR sont bien conçues et la réaction est bien caractérisée.

Inconvénient du colorant SYBR :

Dans le site ThermoFisherScientific Le principal inconvénient est qu'il peut générer de faux signaux positifs; c'est-à-dire, parce que le colorant SYBR se lie à n'importe quel ADN double brin spécifique et non spécifique. Par conséquent, il est extrêmement important d'avoir des amorces bien conçues qui n'amplifient pas les séquences non cibles et que l'analyse de la courbe de fusion soit effectuée.

Taq Man

- Taq polymérase et de PacMan .
- Cette technique est basé sur l'hybridation 5' exonucléase de la taqpolymérase dégrade tous les oligonucléotides
- PCR quantitative .
- Tout d'abord une sonde TaqMan se fixe au fragment de l'ADN interne il y a marquage de la sonde rapporter par lecolorant FAM ou VIC l'extrémité 5' et (quencher) 3' TAMRA, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonanceenergytransfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (Mackay et al, 2002) .puis l'activité de l'activité de la polymérase se fais de 5' a 3' le Raporter n'est plus attaché au quencher la dégradation de la sonde augmente la fluorescence . (Elyse Poitras et Alain Houde .2002)
- Matériels utilisé pour cette technique :

TaqMan dosage

Master mix universel 2x TaqMan disponible dans le commerce

Sondes TaqMan à double marquage en 10 M

Primer TaqMan réglé dans 10 M

Transcriptase inverse (transcriptase inverse M-MLV)

Inhibiteur de RNase

10 M de dNTP

10 M oligo dT18 ou oligo dT21

Oligo-hexamère aléatoire, ,Tampon de réaction RT (livré avec la transcriptase inverse)

,Plaques PCR 96 puits ou 384 puits ,Tubes PCR 0,2 mL/8 bandes

Film de couverture transparent optique ou capuchons transparents optiques , Pipette ,Pointes de pipette sans DNase/RNase, Eau de qualité PCR sans nucléase ,Microtubes à centrifuger de 1,5 ml ,Des gants (Yibing Jia chapitre 3 , 2012)

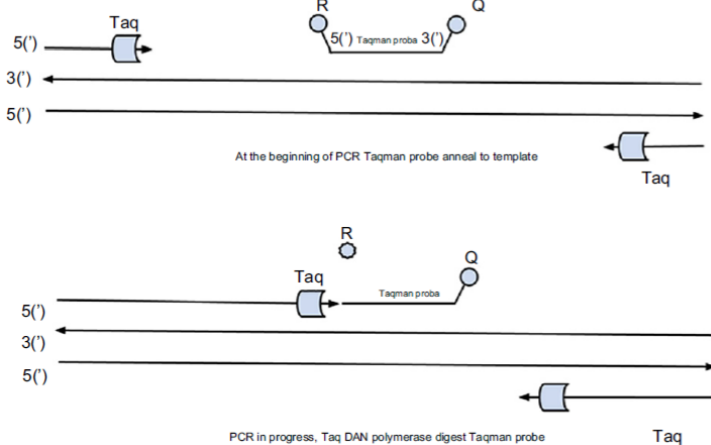


Figure : étapes de la TaqMan


Avantages de la chimie TaqMan : . (Thermo Fisher Scientific)

Une hybridation spécifique entre la sonde et la cible est nécessaire pour générer un signal fluorescent.

Les sondes peuvent être marquées avec différents colorants rapporteurs distinctifs, ce qui permet l'amplification et la détection de deux séquences distinctes dans un tube de réaction, Le traitement post-PCR est éliminé, ce qui réduit les coûts de main-d'œuvre et de matériel de test.

Inconvénients de la chimie TaqMan :

Synthèse de différentes sondes est nécessaire pour différentes séquences .

<p>transcription inverse MultiScript</p>	 <p>Une transcriptase inverse recombinante du virus de la leucémie murine de Moloney (rMoMuLV), qui a été optimisée pour les dosages TaqMan.(Fisher scientific)</p>
<p>Trizol</p>	<p>Protocole d'isolement D'ARN :</p> <p>A. Réactifs requis : Eau traitée au DEPC (Ambion), Réactif TRIZol (Invitrogen),PBSglacé,Racloir à cellules ,70% d'éthanol, Alcool isopropylique</p> <p>B. Équipements et fournitures : Centrifugeuse réfrigérée Micro centrifugeuse, Micropipettes, Embouts anti-aérosols, Mélangeur de vortex, Gants sans poudre, Tubes à centrifuger</p> <p>C : Homogénéisation :</p> <p>1. Tissus : Homogénéiser les échantillons de tissus dans 1 ml de réactif TRIZOL pour 50 à 100 mg de tissu à l'aide d'un verre-téflon ou homogénéisateur électrique. L'échantillon ne doit pas dépasser 10 % du volume de réactif TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation.</p> <p>2. Cellules cultivées en monocouche : Rincer la monocouche cellulaire avec du PBS glacé une fois. Lysér les cellules directement dans une boîte de culture en ajoutant 1 ml de Réactif TRIZOL par boîte de 3,5 cm de diamètre et racler avec la cellule grattoir. Passer le lysat cellulaire plusieurs fois à travers une pipette. Vortex à fond. La quantité de réactif TRIZOL ajoutée est basée sur la surface de la boîte de culture (1 ml par 10 cm²) et non sur le nombre de cellules présentes. Une quantité insuffisante de TRIZOL Le réactif peut entraîner une contamination par l'ADN de l'ARN isolé.</p> <p>3. Cellules cultivées en suspension : Spin cellules pendant 5 min à 300 X g. Retirer le support et remettre les cellules en suspension dans du PBS glacé. Pellet cellules en tournant à 300 X g pendant 5 min. Lysér les cellules avec le réactif TRIZOL par répétition pipetage ou par passage dans une seringue et une aiguille. Utiliser 1 ml de réactif par 5-10 X ,10⁶ de cellules animales.</p> <p>4. Incuber l'échantillon homogénéisé pendant 5 minutes à température ambiante pour permettre la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Centrifuger pour retirer la cellule débris. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.</p> <p>E. SÉPARATION DES PHASES : Ajouter 0,2 ml de chloroforme pour 1 ml de réactif TRIZOL. Boucher solidement les tubes d'échantillons. Vortexer vigoureusement les échantillons pendant 15 secondes et les incuber à température ambiante pendant 2 à 3 min. Centrifuger les échantillons à pas plus de 12 000 x g pendant 15 minutes à 2 à 80C. Après centrifugation, le mélange se sépare en rouge inférieur, phase phénolchloroforme, une interphase et une phase aqueuse supérieure incolore. L'ARN reste exclusivement en phase aqueuse. Transférer la phase aqueuse supérieure avec précaution sans perturber l'interphase dans le tube frais. Mesurer le volume de la phase aqueuse</p>

(Le volume de la phase aqueuse est d'environ 60% du volume de Réactif TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation).

F. PRÉCIPITATION D'ARN :

Précipiter l'ARN de la phase aqueuse en mélangeant avec de l'alcool isopropylique. Utiliser 0,5 ml d'alcool isopropylique pour 1 ml de réactif TRIZOL utilisé pour l'homogénéisation initiale.

Incuber les échantillons à 15 à 30 °C pendant 10 minutes et centrifuger à pas plus de 12 000 x g pendant 10 minutes à 2 à 4°C. L'ARN précipité, souvent invisible avant centrifugation, forme une pastille de type gel sur le côté et le fond du tube.

G : ARN WASH :

Retirer complètement le surnageant. Laver le culot d'ARN une fois avec de l'éthanol à 75 %, en ajoutant au moins 1 ml d'éthanol à 75 % pour 1 ml de réactif TRIZOL utilisé pour le premier homogénéisation. Mélanger les échantillons par vortex et centrifuger à pas plus de 7 500 x g pendant 5 minutes à 2 à 8 °C. Répétez la procédure de lavage ci-dessus une fois. Enlever tout restes d'éthanol.

H. ARN REDISSOUS :

Sécher à l'air ou sécher sous vide le culot d'ARN pendant 5 à 10 minutes. Ne pas sécher le culot d'ARN en centrifugeuse sous vide. Il est important de ne pas laisser le culot d'ARN sécher complètement car cela diminuera considérablement sa solubilité. Les échantillons d'ARN partiellement dissous ont un A260/A280

rapport < 1,6. Dissoudre l'ARN dans de l'eau traitée au DEPC en faisant passer la solution plusieurs fois

à l'aide d'une pointe de pipette.

I. ANALYSE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE :

Diluer 1 ul d'ARN avec 39 ul d'eau traitée au DEPC (dilution 1:40). Utilisation de 10 l microcuvette, prendre OD à 260 nm et 280 nm pour déterminer la concentration de l'échantillon et pureté. Le rapport A260/A280 doit être supérieur à 1,6. Appliquer la convention que 1 OD à 260 équivaut à 40 ug/ml d'ARN.

Important : pour les expériences de microarray, l'ARN total isolé par la méthode TRIZOL doit être nettoyés davantage à l'aide du protocole de nettoyage RNeasy.

Protocole :**Conditions d'hygiène :**

-Le premier pré-requis avant de commencer une série d'expérience d'HIS est d'établir un environnement dépourvu d'ARNases. utilisation de solutions « ARNases free ». Cela consiste à traiter eau et solutions avec du pyrocarbonate de diéthyle (DEPC). Utilisé à la concentration de 0.1%, le DEPC inhibe les ARNases. Après une incubation à 37°C des solutions traitées avec DEPC pendant deux heures minimum, celles-ci sont autoclavées permettant ainsi la destruction de l'excès de DEPC.

-port de gants pendant toute la durée de l'expérience

- utilisation d'embouts et tubes portant la mention « ARNases free », c'est-à-dire qui ont subi des traitements permettant la destruction des ARNases

- stérilisation de toute la verrerie et de tout le matériel possible (récipients en plastique, métal ...) utilisés pendant l'expérience

Préparation des tissus :**Fixation des tissus :****Se définit en deux étapes :**

-Fixateurs additifs: ils forment des liaisons covalentes entre les protéines des préparations cellulaires et histologiques.

Exemple : paraformaldéhyde (PFA), glutéraldéhyde.

-Fixateurs dénaturants: ils entraînent l'insolubilisation et l'inactivation des sites enzymatiques tout en préservant les sites antigéniques des modifications de la structure tertiaire des protéines.

Exemple : alcool ou acétone

Les tissus peuvent être stockés dans -70°C dans de l'azote liquide .

Hybridation :

Le contrôle de l'hybridation des sondes au ARNm cible par une température T_m est la température pour laquelle 50% de la population d'hybrides formés se dissocient en simples brins.

$$T_m = 81.5 + 16.6 \ln(M) + 0.41(GC\%) - 0.61(F\%) - 500/L$$

longueur de la sonde (L), du pourcentage de bases G et C (GC%), du pourcentage de formamide (F%) et de la concentration (M) de cations monovalents présents dans la solution d'hybridation.

Lavages post-hybridation

La spécificité et la stabilité de l'appariement de deux molécules d'acides nucléiques dépendent de leur degré de complémentarité. Pour éliminer les hybrides non spécifiques une succession de lavages à stringence croissante est effectuée, de telle sorte que seuls les hybrides spécifiques, qui sont les plus stables, persistent. Le choix de la stringence de ces lavages est critique. Il s'agit en effet d'éliminer uniquement les hybrides non spécifiques. La stringence dépend à la fois de la concentration en sels et de la température à laquelle les lavages sont effectués. Comme pour l'étape d'hybridation, on peut calculer la température optimale de lavage en utilisant la formule donnée ci-dessus. Il est alors conseillé de laver 15 à 20°C en dessous de la température calculée.

supérieure à celle de l'étape d'hybridation (Morel et Cavalier, 2001).

Etape de révélation

Il existe de multiples méthodes de révélation qui dépendent du marquage des hybrides explicités plus haut.

Quelle que soit la nature du marquage, l'étape de révélation implique deux paramètres essentiels : la sensibilité et la résolution. Il y a trois approches possibles pour révéler les

hybrides :

	<p>l'autoradiographie, la fluorescence et l'immunocytochimie. Les lames sont observées au microscope optique.</p> <p>Contrôles</p> <p>Il existe de nombreux contrôles que l'on peut effectuer à toutes les étapes. Nous en suggérons ici quelques-uns. Les contrôles utilisés pour ce protocole d'HIS sont expliqués dans la partie méthode :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sondes : <ul style="list-style-type: none"> - Recherche de séquences homologues dans une banque de gènes (recherche BLAST) pour éviter le risque d'une forte homologie avec une séquence existante pouvant causer la formation d'hybrides -Hybridation avec des sondes « sens » (possibles pour les oligonucléotides et les sondes ARN). • Hybridation et lavages <ul style="list-style-type: none"> - Hybridation avec absence de sondes. - Variation sur la stringence des conditions d'hybridation et de lavage. • Tissu <ul style="list-style-type: none"> - Hybridation positive sur tissus ou cellules connus pour exprimer l'acide nucléique cible. - Hybridation négative sur tissus ou cellules connus pour ne pas exprimer l'acide nucléique cible.
Spectromètre Nanodrop100	<p>Les spectrophotomètres NanoDrop™ permettent de réaliser des spectres d'absorbance pour micro volume sans cuvette ni capillaire. Il permet des mesures sur une large gamme de longueurs d'onde pour l'analyse des spectres dans le visible et l'UV. Avec plus de 40 000 NanoDrop™ utilisés dans le monde entier, c'est la référence des spectrophotomètres pour micro volumes.</p> <p>Le nouveau NanoDrop™ One inclut un système de pilotage androïde, un écran tactile haute définition et la technologie « Sample Intelligent Technology » : logiciel d'analyse très puissant, permettant d'obtenir des informations quantitatives et qualitatives de vos échantillons.</p>

Chirurgie : (stéréotaxie)

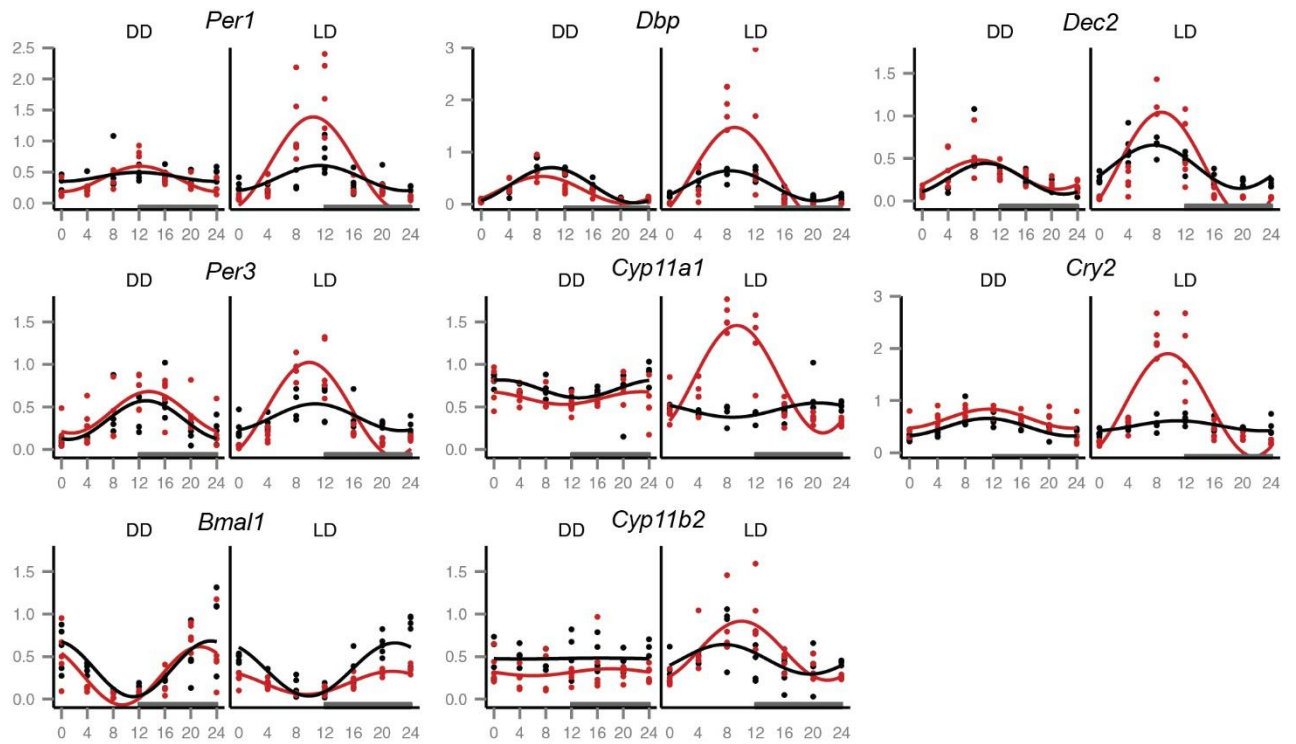
- La lésion thermique bilatérale du SCN a été réalisée par stéréotaxie sous anesthésie à la kétamine/hydrazine. Un électrode en acier inoxydable (0,35 mm de diamètre) a été inséré dans le SCN (0,5 mm postérieur et 0,0 mm) latéral à le bregma à une profondeur de 5,3 mm sous la surface du crâne à l'aide d'un dispositif de lésion thermique (RFG-4A, Muromachi, Tokyo, Japon).

- UNE lésion a été faite en maintenant une température de 55 °C pendant 15 s via un chemin de courant, et des animaux simulés ont été créés sans l'utilisation d'un chemin actuel .

Évaluation du rythme d'activité locomotrice des souris (Yokoyama et al.,2020) :

Chaque souris était logée dans une cage séparée (183 × 340 × 148 mm ; CL-0135, CLEA Japon, Tokyo Japon) (placées dans des boîtes ventilées et imperméables à la lumière, dans lesquelles l'intensité lumineuse au fond de la cage était de 200 à 300 lx) avec une roue de course (12 cm de diamètre, SANKO, Osaka, Japon) . Le nombre de tours de roue a été déterminé à l'aide d'un signal activé par un capteur magnétique entre un bouton aimanté sur la roue en mouvement et un relais magnétique (59070-010, Littelfuse, Inc., Chicago, IL, USA) fixé sur une paroi latérale de la cage , et a été introduit dans un ordinateur toutes les minutes. Un kit de chronobiologie (Stanford Software Systems, Naalehu, HI, USA) et le logiciel ClockLab (version 2.72, Actimetrics, Wilmette, IL, USA) ont été utilisés pour organiser et visualiser les données d'activité. Les périodes d'activité de roulage pendant 15 jours dans des conditions d'obscurité constante (DD) ont été déterminées à l'aide de périodogrammes du chi carré. Les activités quotidiennes et les durées de la phase active pendant 7 jours dans un cycle LD normal et 15 jours dans DD ont été quantifiées à l'aide de la fonction de profil d'activité dans ClockLab.(Yokoyama et al., 2020).

Figure supplémentaire S2:analyse des expressions des gènes des genes central et métabolique dans la glande surrénal. L' Axe X correspond a (CT); l' Axe Y correspond a l'expression des gènes .



Kosir et al., (2016) tableauxupplémentaireS1: les primers utilisé pour la RTq-PCR.

Gene	NCBI ID	Sequence	Length of primer in [bp]	Amplification Factor
Reference genes				
<i>Rplp0</i>	NM_007475.4	Fw	CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	22
		Rv	GGTGCCTCTGGAGATTTTCG	20
<i>Ppib</i>	NM_011149.2	Fw	GGAGATGGCACAGGAGGAAA	20
		Rv	CCGTAGTGCTTCAGTTGAAGTTCT	25
<i>Hprt1</i>	NM_013556.2	Fw	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	19
		Rv	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	21
<i>Rn18s</i>	NR_003278.1	Fw	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	20
		Rv	TTGGCAAATGCTTTCGCTC	19
<i>Utp6</i>	NM_144826.3	Fw	TTTCGGTTGAGTTTTTCAGGA	21
		Rv	CCCTCAGGTTTACCATCTTGC	21
Circadian genes – core clock				
<i>Arntl – Bmal1</i>	NM_007489	Fw	GCAGTGCCACTGACTACCAAGA	22
		Rv	TCCTGGACATTGCATTGCAT	20
<i>Dbp</i>	NM_016974.2	Fw	AATGACCTTTGAACCTGATCCCGCT	25
		Rv	GCTCCAGTACTTCTCATCCTTCTGT	25
<i>Per1</i>	NM_011065.3	Fw	TCCTCCTCTACTGCCTCT	21
		Rv	TTGCTGACGACGGATCTTT	19
<i>Per2</i>	NM_011066.3	Fw	CAACACAGACGACAGCATCA	20
		Rv	TCCTGGTCTCCTTCAACAC	20
<i>Per3</i>	NM_011067.1	Fw	CTGCTCCAACCTCAGTCTCCTTT	22
		Rv	TTAGACAGCAAGGCTCTGGTTCT	23
<i>Cry1</i>	NM_007771	Fw	CCCAGGCTTTTCAAGGAATGGAACA	25
		Rv	TCTCATCATGGTCATCAGACAGAGG	25
<i>Cry2</i>	NM_009963	Fw	AGGGCTGCCAAGTGCATCAT	20
		Rv	AGGAAGGGACAGATGCCAATAG	22
<i>Bhlhe40 – Dec1</i>	NM_011498.4	Fw	TCTCCTACCCGAACATCTCAA	21

		Rv	AATGCTTTCACGTGCTTCAA	20	
<i>Bhlhe41 – Dec2</i>	NM_024469.1	Fw	ATTGCTTTACAGAATGGGGAGCG	23	1.89
		Rv	AAAGCGCGCGAGGTATTGCAAGAC	24	
<i>Nr1d1 – RevErba</i>	NM_145434.3	Fw	ACGACCCTGGACTCCAATAA	20	2.00
		Rv	CCATTGGAGCTGCTACTGTAGA	22	
Metabolic genes					
<i>Rxra</i>	NM_011305.3	Fw	GCTTCGGGACTGGTAGCC	18	1,99
		Rv	GCGGCTTGATATCCTCAGTG	20	
<i>Cyp51a1</i>	NM_020010.2	Fw	ACGCTGCCTGGCTATTGC	18	1,86
		Rv	TTGATCTCTCGATGGGCTCTATC	23	
<i>Cyp11a1</i>	NM_019779.3	Fw	AAGTATGGCCCCATTACAGG	21	1,99
		Rv	TGGGGTCCACGATGTAAACT	20	
<i>Cyp39a1</i>	NM_018887.3	Fw	ACCTATGATGAGGGCTTTGAGTA	23	1,84
		Rv	CCATCTTTGGATTTGACCA	21	
<i>Hmgcr</i>	NM_008255.2	Fw	CTTGTGGAATGCCTTGTGATTG	22	1.90
		Rv	AGCCGAAGCAGCACATGAT	19	
<i>Por</i>	NM_008898.1	Fw	GGGAACTTGAAGAGGATTCA	22	2.00
		Rv	CCCGAAGAAGCTCGCACACA	19	
<i>Ppara</i>	NM_011144.6	Fw	CCTCTTCCAAAGCTCCTTCA	21	2.00
		Rv	CGTCGGACTCGGTCTTCTTG	20	
<i>Cyp7a1</i>	NM_007824.2	Fw	TCTCAAGCAAACACCATTCTCT	21	1.94
		Rv	GGCTGCTTTCATTGCTTCA	19	
<i>Cyp8b1</i>	NM_010012.2	Fw	GGAAGTGAGCCAGTTGCAG	19	1.70
		Rv	TTTTCCAGGTTTTGCTCCAC	20	
<i>Cyp11b2</i>	NM_009991.3	Fw	GCACCAGGTGGAGAGTATGC	20	1.78
		Rv	GCCATTCTGGCCCATTTAG	19	
<i>Cyp17a1</i>	NM_007809.3	Fw	CATCCCACAAAGGCTAACA	20	1.97
		Rv	CAGTGCCAGAGATTGATGA	20	
<i>Cyp21a1</i>	NM_009995.2	Fw	AGGAATTCTCCTTCTCACTTGT	23	1.99
		Rv	TCTGTACCAACGTGCTGTCC	20	
<i>Nr1i3 – Car</i>	NM_009803.4	Fw	CAGGGTTCCAGTACGAGTTTTG	22	2,00
		Rv	AGGCTCCTGGAGATGCAGTC	20	
<i>Ppargc1a</i>	NM_008904.2	Fw	CATTGTATGCACTGACAGATGGA	23	1,94
		Rv	CCGTCAGGCATGGAGGAA	18	
<i>Cyp27a1</i>	NM_024264.4	Fw	CCTCACCTATGGGATCTTCATC	22	1,87
		Rv	TTTAAGGCATCCGTGTAGAGC	21	

Tableau supplémentaire S2 : Détermination de l'expression circadienne des gènes dans les conditions LD etDD dans les glandes surrénales des deux souches.

La rythmicité circadienne a été déterminée par analyse des cosineurs (période = 24h). Une valeur p de 0,01 a été sélectionnée comme seuil et les gènes avec des valeurs p supérieures à cette valeur ont été définis comme non circadiens. YES : le gène est circadien ; NON : le gène n'est pas circadien. Les cases rouges indiquent les gènes où, dans les mêmes conditions, l'oscillation circadienne est présente dans l'un mais pas dans l'autre génotype.

Gene	Adrenal gland			
	DD		LD	
	129Pas	C57BL6	129Pas	C57BL6
1 <i>Arntl</i>	YES	YES	YES	YES
2 <i>Cry1</i>	YES	YES	YES	YES
3 <i>Cry2</i>	YES	YES	YES	YES

4	<i>Dbp</i>	YES	YES	YES	YES
5	<i>Bhlhe40</i>	YES	YES	YES	YES
6	<i>Bhlhe41</i>	YES	YES	YES	YES
7	<i>Per1</i>	YES	NO	YES	YES
8	<i>Per2</i>	YES	YES	YES	YES
9	<i>Per3</i>	YES	YES	YES	YES
10	<i>Nr1d1</i>	YES	YES	YES	YES
11	<i>Nr1i3</i>				
12	<i>Cyp11a1</i>	NO	YES	YES	YES
13	<i>Cyp11b2</i>	NO	NO	YES	YES
14	<i>Cyp17a1</i>	NO	NO	YES	YES
15	<i>Cyp21a1</i>	NO	YES	YES	NO
16	<i>Cyp27a1</i>				
17	<i>Cyp39a1</i>	NO	NO	YES	NO
18	<i>Cyp51</i>	YES	YES	YES	YES
19	<i>Cyp7a1</i>				
20	<i>Cyp8b1</i>				
21	<i>Hmgcr</i>				
22	<i>Pgc1a</i>				
23	<i>Por</i>				
24	<i>PparA</i>				
25	<i>Rxr</i>				

Gènes	Amorces (RTqPCR)
Arntldn	5'-GAT TGC AGT CCA CAC CAC TG-3 '
Arntl up	5'-CAA GCA CCT TCC TTC CAA TG-3 '
Nr1d1 dn	5'-CAC AGG CGT GCA CTC CAT AG-3'
Nr1d1 up	5'-AGG GCA CAA GCA ACA TTA CC-3 '
Per1 dn	5'-ACC ACT CAT GTC TGG GCC-3 '
Per1 up	5'-GTG TCG TGA TTA AAT TAG TCA G-3 '
Per2 dn	5'-GCG GAA TCG AAT GGG AGA AT-3'
Per2 up	5'-ATG CTC GCC ATC CAC AAG A-3 '
Star dn	5'-GAA ACA CCT TGC CCA CAT CT-3 '
Star up	5'-TTG GGC ATA CTC AAC AAC CA-3 '
Tbpdn	5'-CCG TAA GGC ATC ATT GGA CT-3 '
Tbp up	5'-GGG AGA ATC ATG GAC CAG AA-3 '

Tableau 1 : des séquences d'amorce des souris RF et FF utilisé d'après Chung et al .,(2017)

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Actb</i>	CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
<i>Bmal1</i>	CTCCAGGAGGCAAGAAGATTC	ATAGTCCAGTGGAAAGGAATG
<i>Clock</i>	GCCTCAGCAGCAACAGCAGC	ACCGCATGCCAACTGAGCGA
<i>Per1</i>	AGTTCCTGACCAAGCCTCGTTAG	CCTGCCCTCTGCTTGTCATC
<i>Per2</i>	GGGGTGAGATTCGTCATTGAACTTG	AGGACATTGGCACACTGGAAAGAG
<i>Cry2</i>	GCTGGAAGCAGCCGAGGAACC	GGGCTTTGCTCACGGAGCGA
<i>StAR</i>	AGCCAGCAGGAGAACGGGG	CGCACGCTCACGAAGTCTCG
<i>Cyp11a</i>	GAGACTGAGACTCCACCCCATC	AGACTGCCCAGAACCCCA
<i>Cyp11b1</i>	TCACCATGTGCTGAAATCCTTCCA	GGAAGAGAAGAGAGGGCAATGTGT

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233386.t001>

Tableau 2 : tableau des primers utilisé des souris HFS,HF.c (yokoyama et al ., 2020)

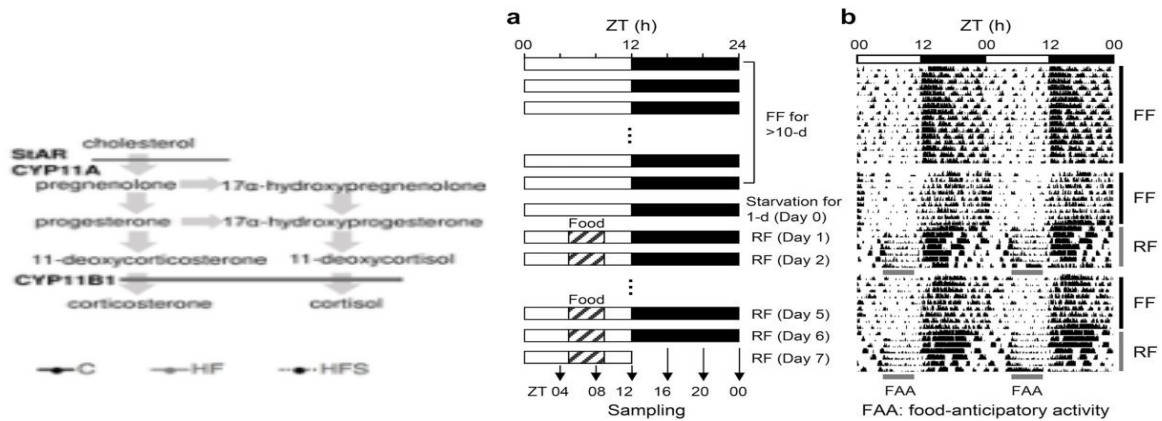


Figure 7: Une représentation schématique des voies de synthèse des glucocorticoïdes.(Yokoyama et al., 2020)

Figure 6 : (a) Représentation schématique du régime alimentaire restreint. Après un jour de famine, les souris ont été nourries exclusivement pendant la journée (ZT05 à 09) pendant 7 jours consécutifs. Au cours de la dernière journée, les souris ont été sacrifiées à des intervalles de 4 heures. (b) Activités locomotrices de souris nourries librement (FF) et nourries restreintes (RF).(Chung et al .,2017)

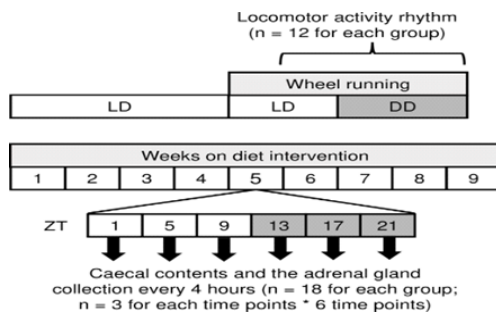


Figure 6: Organigramme de cette étude.(Yokoyama et al.,2020)

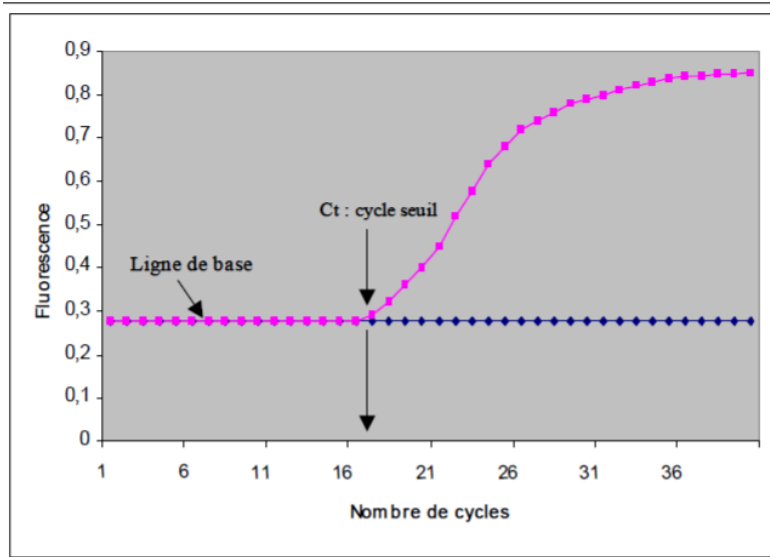


Figure 21 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base. (Elyse Poitras et Alain Houde . 2002)

Cycle seuil (Threshold cycle) :

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction (figure 26) . Plus il y a de matrices (Template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson et al, 1996). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, 2000) .(Elyse Poitras et Alain Houde . 2002)

Protocole standard utilisé par Yokoyama et al., 2020 :

DétecterX[®]

Protocole d'extraction de stéroïdes solides

Pour notre DétecterX[®] kits de dosage immunologique de stéroïdes



INTRODUCTION

Nous recommandons une extraction en phase organique pour extraire les stéroïdes de matrices non liquides telles que les solides séchés ou d'autres matières organiques. Nous utilisons l'éthanol ou l'acétate d'éthyle comme alternatives plus sûres à l'éther diéthylique ou au chlorure de méthylène. Nous recommandons des appareils à vite centrifuge (c'est-à-dire un SpeedVac[™]) pour éliminer le solvant complètement et en toute sécurité après l'extraction. Alternativement, la couche organique peut être séparée et stockée pour une utilisation à une date ultérieure. Nous recommandons également d'utiliser de l'éthanol pour solubiliser complètement le stéroïde extrait séché, car les stéroïdes ont généralement une solubilité aqueuse limitée.

LES MATÉRIEAUX NÉCESSAIRES

- Standard de stéroïdes pour permettre la détermination de l'efficacité
- d'extraction éthanol de qualité ACS (ou acétate d'éthyle)
- Tubes à essai en verre

PROCÉDURE

Assurez-vous que l'échantillon est complètement sec et poudrez l'échantillon pour améliorer la récupération par extraction. Retirez toutes les grosses particules, comme l'herbe si possible. Nous suggérons de vérifier l'efficacité de l'extraction en préparant une solution de stéroïdes de concentration connue dans le kit Assay Buffer (AB). Veuillez vous référer à la section Efficacité d'extraction ci-dessous pour plus de détails. Extraire les échantillons et les contrôles d'efficacité d'extraction avec de l'éthanol ou de l'acétate d'éthyle comme suit :

1. Peser $\geq 0,2$ g de solide fécal séché dans un tube. Les échantillons peuvent être séchés par séchage passif, chauffage doux ($\leq 60^{\circ}\text{C}$), ou lyophilisation (lyophilisation).
2. Ajouter 1 ml d'éthanol (ou d'acétate d'éthyle) pour chaque 0,1 g de solide (0,1 g de solide fécal/ml) et sceller.
3. Agiter vigoureusement pendant au moins 30 minutes.
4. Centrifuger les échantillons à 5 000 tr/min pendant 15 minutes à 4°C . Réserver le surnageant dans un tube propre. Ce matériel peut être stocké à -20°C pendant au moins un mois si correctement scellé.

Noter: Les échantillons contenant de faibles niveaux d'analyte peuvent être concentrés en séchant l'extrait et en le remettant en suspension dans un volume réduit de tampon de dosage. Les échantillons extraits avec de l'acétate d'éthyle doivent être complètement séchés pour éliminer le solvant avant d'être ajoutés au tampon aqueux. Transférer un volume mesuré de surnageant de l'étape 4 (Evaporation Vol.) dans un tube propre et évaporer à sec dans un SpeedVac ou sous azote. Les échantillons séchés et extraits peuvent être conservés congelés- 20°C dans un dessiccateur. Dissoudre l'échantillon extrait séché avec de l'éthanol (par exemple, 100 μl) et passez à l'étape 5.

5. **Il s'agit de directives générales, veuillez ajuster les volumes au besoin.** Ajouter 100 μl de surnageant d'échantillon extrait de l'étape 4 dans un volume minimum de 400 μl AB (Vol. de reconstitution totale = 100 μl + 400 μl). Bien vortexer et laisser reposer 5 minutes à température ambiante. Vortex et laisser reposer pendant 5 minutes deux fois de plus pour assurer une solubilité complète des stéroïdes. **Pour les dosages immunologiques, la teneur en éthanol du dosage doit généralement être $\leq 5\%$. Cela nécessitera une dilution supplémentaire dans le tampon de dosage.** Il est important de vérifier la tolérance de teneur maximale en éthanol du test, comme décrit dans la section « Préparation des échantillons » du manuel du kit.
6. Analyser immédiatement les échantillons dilués reconstitués dans le dosage conformément aux instructions de l'insert.

Protocole d'extraction info@ArborAssays.com | www.ArborAssays.com 148222



CALCUL DE LA CONCENTRATION D'ANALYTE DE L'ÉCHANTILLON :

Concentration du test (c.-à-d. pg/mL) x Facteur de dilution du test x Vol de reconstitution (mL) + Vol d'évaporation (mL) + 0,1 g de solide fécal/mL = unité d'analyte (c'est-à-dire pg/g) de solide fécal.

Exemple de scénario d'extraction et calculs ultérieurs. Ceci n'est qu'un exemple simplifié, les volumes décrits ci-dessous doivent être ajustés selon les besoins pour votre (vos) échantillon(s) spécifique(s).

1. Extraire 0,2 g de matière fécale séchée avec 2,0 ml d'éthanol.
2. Sécher l'extrait à l'éthanol de 2,0 ml jusqu'à siccité. Re-suspendre l'extrait séché dans 100µL d'éthanol. (il s'agit d'un facteur de concentration 20x de l'extrait).
3. Ajouter 25µL de l'extrait concentré de l'étape 2 à 475µL Tampon de dosage. (il s'agit d'un facteur de dilution 20x). Cette préparation sera ajoutée à la plaque de dosage en tant qu'échantillon. Ajouter 50µL de cette préparation au dosage comme indiqué. Exécutez le test en suivant les instructions fournies avec le kit.
4. Si le dosage rapporte 100 pg/mL, multipliez cette valeur par 20 pour obtenir la concentration en extrait concentré (2 000 pg/mL). Divisez cette valeur par 20 pour obtenir la concentration en extrait non concentré (100 pg/mL).
5. Ajustements finaux si nécessaire : Ici, 1,0 ml de solvant a été utilisé pour extraire chaque 100 mg de matière fécale, la quantité d'analyte présente dans l'échantillon séché de départ était de 100 pg pour chaque 100 mg de matière fécale (ou 10,0 pg/g de échantillon original).

Ajustez davantage cette valeur calculée par la détermination de l'efficacité d'extraction si elle est effectuée. Si l'efficacité d'extraction est de 50 %, la valeur ajustée nécessite une correction en multipliant par un facteur 2, ou en divisant la valeur calculée par l'efficacité d'extraction (valeur d'essai÷ Coefficient d'efficacité d'extraction = valeur réelle). La procédure pour déterminer l'efficacité d'extraction est ci-dessous si nécessaire.

EFFICACITÉ D'EXTRACTION

Pour déterminer l'efficacité, un échantillon sera préparé deux fois ; une fois avec une quantité connue d'analyte ajoutée (contrôle de pointe) et une avec un volume équivalent d'AB ajouté (témoin sans pointe) pour représenter le volume de la pointe. Les deux échantillons sont traités avec les autres échantillons extraits comme indiqué précédemment. L'efficacité d'extraction est calculée avec la formule suivante :

$$\text{(Concentration de pointe mesurée - Conc. non enrichie mesurée)} / \text{Concentration de la pointe} = \text{Efficacité}$$

Détection immuno-chimique de stéroïdes solides

Protocole standard du prélèvement d'organe : Kosir et al.,2016

Les souris ont été sacrifiées toutes les 4 heures sur une période de 24 heures avec dislocation cervicale dans des conditions clair-sombre (LD) et sombre-sombre (DD) . Les souris sacrifiées dans des conditions DD ont été maintenues dans l'obscurité totale pendant 36 h avant la scarification. les glandes surrénales ont été excisés, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. L'ARN total provenant d'échantillons homogénéisés de la glande surrénale a été isolé selon les instructions du fabricant en utilisant respectivement 1000 ul et 500 ul de réactif TRI (Sigma). La qualité et la quantité d'ARN ont été déterminées à l'aide de NanoDrop 1100.

Conception d'amorces et RT-qPCR

Dans la mesure du possible, les amorces couvrant les introns ont été conçues sur la base de séquences accessibles au public (tableau supplémentaire S1). La spécificité de l'amorce et l'efficacité d'amplification ont été validées empiriquement à l'aide d'une analyse de courbe de fusion et de courbe standard d'une série de dilutions de six fois.

Le traitement à la DNase a été effectué sur tous les échantillons en utilisant la DNase I (Roche Applied Bioscience) selon les instructions du fabricant. La synthèse d'ADNc a été réalisée en utilisant la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen). 1 g d'ARN de glande surrénale a été mélangé avec 10 µl de mélange maître de transcriptase inverse qui contenait 5 µl de tampon de premier brin 5x, 1,25 µl de 100 mM DTT, 1,25 µl de mélange de dNTP 10 mM, 0,65 µl d'amorces aléatoires (Promega 500 ng/µl), 0,5 µl de SuperScript III (200 U/µl), 0,5 µl de RNase OUT (Invitrogen) et 0,85 µl d'eau sans RNase dans un volume final de 25 µl. Les mélanges réactionnels ont été incubés à 25°C pendant 5 minutes, 50°C pendant 60 minutes et 70°C pendant 10 minutes.