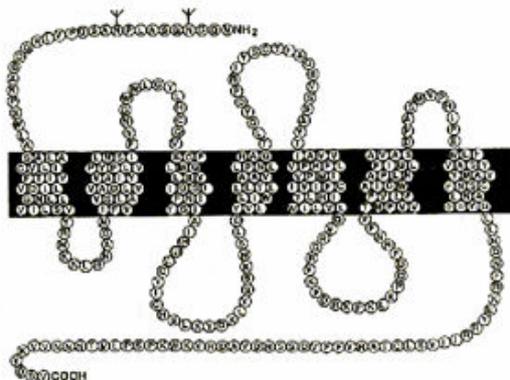


Rapport technique

**Localisation et variation nyctémérale des ARNm codant
pour les récepteurs à mélatonine mt_1 dans l’hypophyse du
black-bass (Poisson Téléostéen)**

Mathias DUBREUIL



Laboratoire d'accueil :
Laboratoire de biologie Animale et Appliquée
Faculté des Sciences et Techniques, Université Jean Monnet - Saint-Etienne

Directeur : B. BUISSON
Codirecteurs : J. ATTIA
 M. BEAUCHAUD
Parrains : S. GRENIER
 F. FLEURY
 D. LEGUELLEC

2000 - 2001

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	3
1.1 TERMINOLOGIE ET DÉFINITION	3
1.2 MATÉRIEL BIOLOGIQUE	4
1.2.1 Le black-bass	4
1.2.1.1 Position systématique	4
1.2.1.2 Conditions d'élevage au laboratoire	4
1.2.1.3 Les rythmes biologiques chez le black-bass	5
1.2.2 L'hypophyse	5
1.2.2.1 L'adénohypophyse	6
1.2.2.2 La neurohypophyse	7
1.3 MÉTHODES HISTOLOGIQUES	7
1.3.1 Préparation des échantillons	7
1.3.2 Technique d'hybridation in situ	8
1.3.2.1 Principe de l'hybridation <i>in situ</i>	8
1.3.2.2 Mise au point des sondes oligonucléotidiques	9
1.3.2.3 Protocole d'hybridation <i>in situ</i>	10
1.4 HISTOMÉTRIE	11
1.4.1 Numérisation	11
1.4.2 Amélioration des images	11
1.4.3 Mesures	12
1.4.4 Automatisation des mesures	13
1.5 ANALYSE STATISTIQUE	13
1.5.1 Plan expérimental	13
1.5.1.1 Etude préliminaire	13
1.5.1.2 Echantillonnage temporel	14
1.5.1.3 Variable mesurée	14
1.5.2 Statistiques inférentielles	14
1.5.2.1 Questions d'intérêts	14
1.5.2.2 Test t de Student	15
1.5.2.3 Analyse de la variance	15
2 RÉSULTATS	17
2.1 MISE EN ÉVIDENCE DES ARNm CODANT POUR LES RÉCEPTEURS À MÉLATONINE AU SEIN DE L'HYPOPHYSE DE BLACK-BASS	17
2.1.1 Validation du protocole expérimentale	17
2.1.2 Homogénéité du marquage anti-sens au sein de l'hypophyse	17
2.1.3 Spécificité du signal anti-sens	18
2.1.4 Localisation des ARNm mt_1	20
2.1.5 Caractérisation du signal non spécifique	21
2.2 VARIATIONS NYCTHÉMÉRALES DES ARNm mt_1	22
3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	25
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
ANNEXES	30

Introduction

Chez les Poissons Téléostéens, de nombreux rythmes biologiques ont été décrits dans les domaines circadiens et annuels. Ces rythmes concernent les activités comportementales telles que la locomotion et la prise alimentaire, mais aussi les sécrétions hormonales. Que ce soit pour les rythmes comportementaux ou physiologiques, la lumière est reconnue comme un des principaux facteurs de synchronisation. Chez les Mammifères, au niveau interne, l'effet synchroniseur de la lumière est relayé par la mélatonine, hormone sécrétée par la glande pinéale. Chez les Poissons, le rôle de cette hormone dans l'expression des rythmes comportementaux ou physiologiques n'est pas clairement défini. Toutefois son action est établie dans la fonction de reproduction.

La mélatonine agit sur des cellules cibles *via* des récepteurs membranaires. Ces derniers ont été retrouvés dans le système nerveux central. En ce qui concerne l'hypophyse, organe important dans les régulations physiologiques, la présence de récepteurs est en cours d'étude. Chez le poisson rouge et le brochet, Iigot *et al.* (1994) et Gaildrat et Falcon (2000) respectivement ont mis en évidence des récepteurs à mélatonine. Chez la truite, les études de Mazurais (2000) indiquent que la quantité de ces récepteurs est très faible et leur mise en évidence dépend de la sensibilité de la technique utilisée. Chez le black-bass, nous avons recherché les récepteurs à mélatonine de type mt_1 avec une méthode différente. Précisément, nous cherchons à localiser les ARNm codant pour ces récepteurs dans l'hypophyse par la technique d'hybridation *in situ*. Dans un deuxième temps, nous avons abordé les variations de densité en ARNm au cours d'un cycle de 24 heures en condition d'alternance lumière/obscurité (LD 12:12). Cette étude s'intègre dans un programme plus large de l'étude de l'effet de la mélatonine sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en relation avec la croissance et le comportement de prise alimentaire du poisson.

Après un bref rappel sur les rythmes nous décrivons le matériel et méthodes, en particulier la méthode d'histométrie que nous avons mis au point. Les résultats présentés dans un deuxième temps seront examinés lors d'une discussion finale. Bien que six prélèvements soient effectués régulièrement sur un nyctémère, seuls quatre horaires ont pu être traités.

1. Matériel et méthodes

Rappelons dans un premier temps le vocabulaire en rapport avec les rythmes biologiques.

1.1 Terminologie et définition

- Définition d'un rythme

Un rythme biologique peut-être défini comme la succession d'un certain nombre de cycles qui se répètent à intervalles de temps à peu près égaux (Millet et Manachère, 1983). Un cycle est une suite d'événements ordonnés. Un exemple simple est fourni par le cycle cardiaque : systole auriculaire/systole ventriculaire/diastole. La répétition de ce cycle définit le rythme cardiaque.

- Synchronisation et endogénéité des rythmes

Les cycles lumineux bénéficient d'une notation spécifique. Ils sont notés LD, L correspond à la phase éclairée ("light") ou photophase, D à la phase obscure ("dark") ou scotophase. La longueur de ces phases n'est pas nécessairement identique : lorsque la photophase est supérieure à la scotophase, on parle de conditions lumineuses de type "jour long". Inversement, on emploie le terme de "jour court" lorsque la scotophase est supérieure à la photophase. Les lettres DD indiquent l'obscurité continue. Le LL correspond à l'éclairage continu. On utilise la notation LDx:y pour indiquer la durée de la phase lumineuse (x) et la durée de la scotophase (y).

Lorsqu'un rythme biologique persiste en conditions constantes (DD ou LL), on dit que ce rythme possède une composante endogène. Le rythme observé est alors dit en libre cours et sa période est qualifiée de propre. Dire d'un rythme qu'il possède une composante endogène revient à dire qu'il existe au sein de l'organisme un mécanisme de repérage du temps. Ce mécanisme est appelé horloge biologique.

La localisation de l'horloge varie en fonction du groupe animal. Chez les Vertébrés mammaliens, les noyaux suprachiasmatiques situés dans l'hypothalamus abritent une horloge maîtresse (Ralph *et al.*, 1990). Chez les Poissons, les Amphibiens et certains Oiseaux, la glande pinéale joue ce rôle (Gaston et Menaker, 1968). Le rythme circadien de libération de mélatonine par cette glande est notamment en rapport avec les rythmes d'activité locomotrice.

L'alternance lumière-obscurité est unanimement reconnue comme le principal facteur entraînant les rythmes circadiens. L'entraînement se caractérise par le fait que le cycle lumineux impose sa période au rythme biologique (Boissin et Canguilhem, 1998).

1.2 Matériel biologique

1.2.1 Le black-bass

D'origine nord-américaine, le black-bass a été introduit en Europe à la fin du siècle dernier en vue de multiplier le nombre d'espèces intéressantes d'un point de vue sportif et économique. Son corps rappelle celui d'une perche robuste. Il a une teinte d'ensemble verdâtre. C'est un poisson carnivore qui se nourrit d'insectes aquatiques, de poissons mais aussi de grenouilles et de têtards (Pivnicka et Cerny, 1987).

1.2.1.1 Position systématique

Embranchement des Vertébrés.

Classe des Ostéichthyens.

Ordre des Perciformes.

Famille des Centrarchidés.

Genre : *Micropterus*.

Espèce : *Micropterus salmoides* Lacépède 1802.

Nom anglais : largemouth bass.

Noms français : black-bass, perche truite.

1.2.1.2 Conditions d'élevage au laboratoire

Les animaux proviennent de l'écloserie de Guyenne (33660, St-Sevrin). Ils sont maintenus au laboratoire en milieu contrôlé dans une salle climatisée garantissant une température constante de $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Un programmeur instaure une alternance de 12h de lumière d'une intensité de $0,5\text{W}/\text{m}^2$ et 12h d'obscurité. L'allumage s'effectue à 6h et l'extinction à 18h GMT. Ils sont nourris avec de la nourriture artificielle (Biomar, Ecolife 15 n°3) une fois par jour à 8h GMT avec une dose correspondant à 2% de la biomasse en poisson de chaque aquarium. Au moment des prélèvements, les animaux sont âgés de 12 mois, mesurent 15,6 cm et pèsent 45 g en moyenne.

1.2.1.3 Les rythmes biologiques chez le black-bass

Les rares études réalisées chez le black-bass montrent que ce poisson possède des activités de locomotion et de prise alimentaire diurnes synchronisées par la lumière (Petit, 2001). Au niveau de l'hypophyse du black-bass, Martin *et al.* (1998) ont montré que le nombre et la taille des cellules gonadotropes et lactotropes varie au cours de l'année.

Notre étude portant sur les récepteurs à mélatonine au sein de l'hypophyse, il convient de rappeler la structure et la fonction de cet organe.

1.2.2 L'hypophyse

L'hypophyse est une glande endocrine située au niveau de l'encéphale en position ventrale, logée dans une dépression de l'os sphénoïde. Elle est en relation étroite avec l'hypothalamus par la tige hypophysaire.

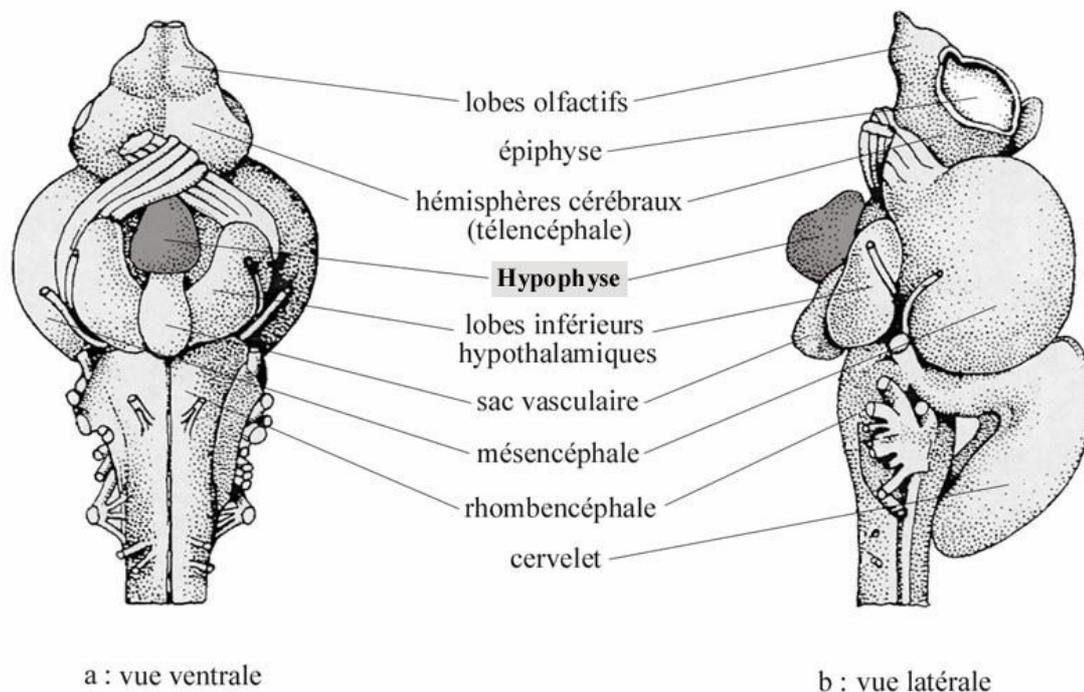


Figure 1 : Organisation générale de l'encéphale de truite
(d'après Meek et Nieuwenhuys, 1998).

La glande pituitaire est formée de deux tissus : un tissu nerveux, la neurohypophyse et un tissu glandulaire, l'adénohypophyse. L'adénohypophyse a pour origine une excroissance ectodermique du toit de la cavité buccale embryonnaire et la neurohypophyse une dépression

du plancher du diencephale. Chez les Vertébrés Tétrapodes, ces tissus s'organisent en deux lobes distincts, appelés respectivement lobe postérieur et lobe antérieur. Chez les Poissons Téléostéens, l'adénohypophyse et la neurohypophyse ne constituent pas deux lobes bien séparés, le tissu nerveux émet des digitations à l'intérieur du parenchyme glandulaire. L'organisation morphologique des différentes régions de l'adénohypophyse des Poissons est extrêmement variable d'une espèce à l'autre. De plus le contact entre l'adénohypophyse et la neurohypophyse peut être réduit ou important selon l'espèce. L'organisation de l'hypophyse du black-bass se rapproche de celle de la perche (figure 2).

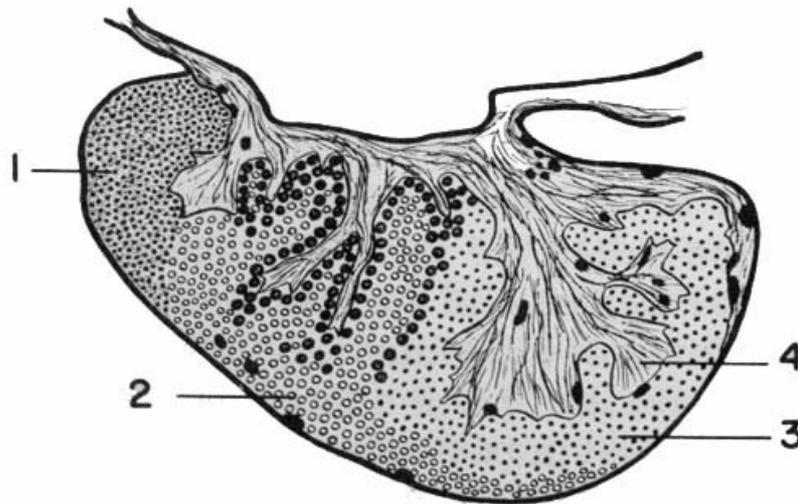


Figure 2 : représentation schématique de l'hypophyse chez la perche
(d'après Pickford et Atz, 1957 ; Takashina et Hibiya, 1995)

1 : pro-adénohypophyse ; 2 : méso-adénohypophyse ; 3 : méta-adénohypophyse ; 4 : neurohypophyse

1.2.2.1 L'adénohypophyse

Chez les Poissons, il a été montré (Takashina et Hibiya, 1995) que l'adénohypophyse synthétise et sécrète huit hormones : la prolactine, la corticostimuline, la thyrostimuline, l'hormone de croissance, deux types de gonadostimuline, la somatolactine et la MSH (Melanophore-Stimulating Hormone). Ces hormones sont sécrétées par différents types cellulaires qui peuvent être mis en évidence par les propriétés tinctoriales de leur sécrétion et par immunomarquage. Ces cellules occupent une position précise au sein de l'hypophyse.

L'adénohypophyse est sous divisée en trois régions : la pro-adénohypophyse ou *rostral pars distalis*, la méso-adénohypophyse ou *proximal pars distalis* et la méta-adénohypophyse ou *pars intermedia* (figure 2).

1.2.2.2 La neurohypophyse

La neurohypophyse est un tissu nerveux contenant des fibres nerveuses amyélinisées provenant de l'encéphale et principalement de l'hypothalamus et des cellules gliales, les pituicytes. La neurohypophyse est divisée en trois régions : l'*infundibulum*, l'éminence médiane et la *pars nervosa*. Chez les Poissons Téléostéens, la neurohypophyse libère des neuro-hormones de deux types :

- des hormones neurohypophysaires qui sont l'AVT (Arginine Vasotocin), l'isotonine et la MCH (Melanin Concentrating Hormone) ;
- des hormones hypothalamiques qui régulent la sécrétion des hormones de l'adénohypophyse. Les fibres nerveuses contenant ces neurohormones sont en contact direct avec les cellules de l'adénohypophyse dans la *pars distalis*. Chez les Poissons, les hormones suivantes ont été identifiées : La Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), la Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), la Corticotropin Releasing Hormone (CRH), Growth Hormone Releasing Factor (GRF) et la somatostatine ou Growth hormone Inhibiting Factor (GIF).

1.3 Méthodes histologiques

1.3.1 Préparation des échantillons

Les RNases (enzymes dégradant les ARN) agissent très rapidement dès la mort du poisson, il faut donc fixer l'organe le plus vite possible. Tout le matériel utilisé, ainsi que les paillasses et les milieux liquides sont traités de manière à éliminer les RNases.

Les animaux sont sacrifiés à l'aide d'une dose mortelle de MS 222 dilué dans l'eau. Ils sont décapités puis le crâne est décalotté. Immédiatement du fixateur (paraformaldéhyde à 4% dans du tampon PO₄, 100mM) est injecté sous le cerveau pour fixer l'hypophyse. L'encéphale est alors retourné et l'hypophyse prélevée et plongée dans le fixateur.

L'hypophyse est laissée pendant trois heures dans le fixateur puis placée dans de l'éthanol 70°. Entre la décapitation et l'immersion dans le fixateur, il se déroule moins d'une minute. L'organe est déshydraté dans des bains d'éthanol puis inclus dans de la paraffine (Martoja et Martoja, 1967). Lors de l'inclusion, nous orientons l'hypophyse pour obtenir des coupes comparables d'un individu à un autre. On réalise ensuite des coupes de 7µm d'épaisseur grâce à un microtome Leitz 1515. Ces coupes sont collées sur des lames silanisées (3-Amino-Propyl-tri-Ethoxy-Silane). Après séchage durant 24 heures dans une étuve à 37°C, les coupes sont traitées par hybridation *in situ*.

1.3.2 Technique d'hybridation *in situ*

1.3.2.1 Principe de l'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est utilisée pour localiser sur des coupes des acides nucléiques. Pour cela, on utilise une sonde spécifique de l'acide nucléique recherché. Cette sonde peut être de l'ADNc, de l'ARN ou un oligonucléotide. Pour pouvoir révéler le signal, cette sonde est couplée avec un marqueur qui peut être chaud (révélation par autoradiographie) ou froid (révélation immunochimique) la figure 3 illustre le cas d'un marqueur froid : la biotine.

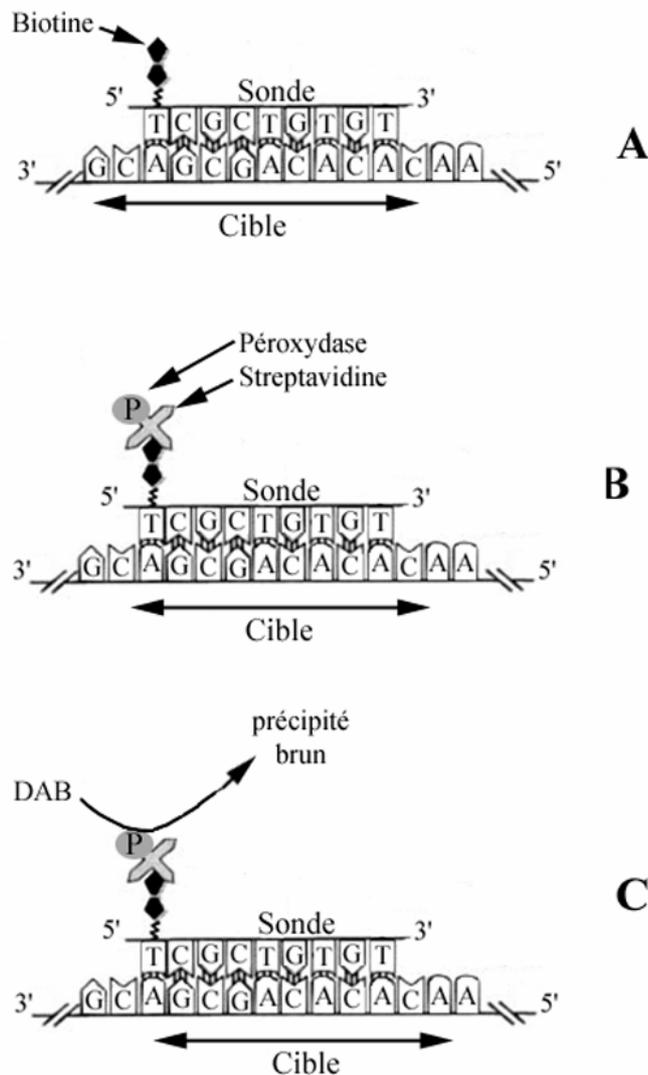


Figure 3 : Principe de la révélation en Hybridation *in situ* avec marqueur antigénique (d'après Morel et Cavalier, 1998)

A : la sonde s'hybride avec la cible. B : une streptavidine couplée à la peroxydase se fixe sur la biotine de la sonde. C : l'adjonction d'un réactif incolore (DAB) donne un précipité coloré en présence de l'enzyme.

1.3.2.2 Mise au point des sondes oligonucléotidiques

Il existe plusieurs types de récepteurs à mélatonine, mt_1 , MT_2 et $mellc$ (pour plus de détails se référer au rapport bibliographique). Les récepteurs mt_1 sont généralement exprimés dans les noyaux suprachiasmatiques et l'hypophyse tandis que les MT_2 se retrouvent dans la rétine (Reppert *et al.*, 1995). C'est pourquoi notre étude se focalise sur les récepteurs de type mt_1 (anciennement noté $mell1a$). La séquence de l'ARNm codant pour ce type de récepteur n'est pas encore connue chez le black-bass. A partir de là, plusieurs stratégies sont envisageables :

- soit une sonde est réalisée à partir du clonage du gène, ce qui entraîne des manipulations lourdes ;
- soit une sonde oligonucléotidique est synthétisée à partir des séquences présentes dans les banques de données.

Dans ce travail, nous avons opté pour la deuxième solution. Ce type de démarche a été utilisé auparavant par plusieurs auteurs dont Al-Ghoul *et al.*(1998) pour l'étude des ARNm mt_1 dans le cervelet humain.

Nous avons recherché dans la banque de gènes Genbank les séquences complètes codant pour les ARNm des récepteurs à mélatonine de type mt_1 . Les 20 séquences obtenues concernent des Vertébrés, avec 2 sources chez l'homme et le mouton.

L'alignement multiple de ces séquences à l'aide du programme Macaw révèle un fort taux d'homologie, de l'ordre de 70% en moyenne (figure 4).

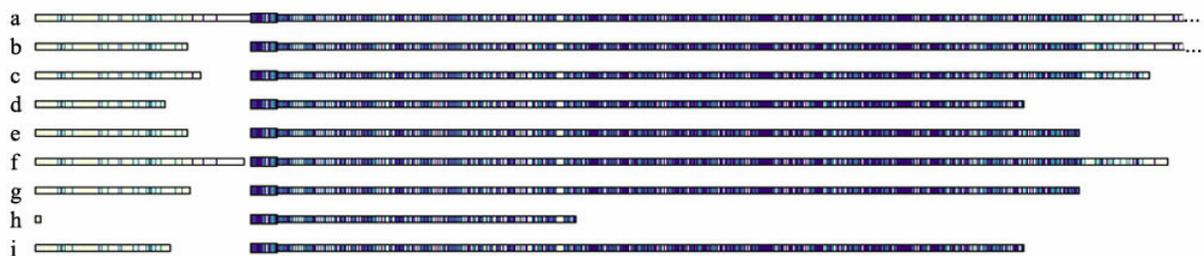


Figure 4 : Alignement multiple des séquences codant pour l'ARNm des récepteurs à mélatonine de type mt_1 .

Séquence de l'ARNm de : a : Homme ; b : *Mus musculus* ; c : *Oncorhynchus mykiss* ; d : *Mesocricetus auratus* ; e : *Phodopus sungorus* ; f : *Ovis aries* ; g : *Gallus gallus* ; h : *Oryctolagus cuniculus* ; h : *Rattus norvegicus*.

Dans les zones de forte homologie (en bleu sur la figure 4), une séquence spécifique des récepteurs de type mt_1 a été recherchée, l'objectif étant d'obtenir une séquence ne pouvant s'hybrider qu'avec les ARNm mt_1 . La suite de 29 nucléotides (nt) : 5' - TAA CTA GCC ACG AAC AGC CAC TCG GGG AT - 3' répond à ce critère. Confrontée grâce au logiciel Blast aux banques Genbank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory) et DDBJ (DNA

Data Bank of Japan), cette suite s'hybride virtuellement à 19 séquences, dont 15 codent pour des récepteurs à mélatonine de type mt_1 et 4 pour des séquences bactériennes ou virales (tableau I). Le pourcentage d'hybridation est de l'ordre de 80% pour les 9 premières séquences et la longueur des hybrides est d'au moins 19 paires de bases sans interruption.

Tableau I : Résultats de l'hybridation virtuelle de la sonde avec le logiciel Blast.

Expect est la valeur attendue lors d'une recherche au hasard, elle décroît exponentiellement avec le score. La valeur par défaut est 10.

	Score	Expect
<i>Mus musculus</i> melatonin receptor 1A (Mtnr1a), mRNA	50.1 bits (25)	3,00E-05
<i>Phodopus sungorus</i> melatonin receptor Mel-1a mRNA, complete cds	50.1 bits (25)	3,00E-05
<i>Mesocricetus auratus</i> melatonin receptor Mel1a mRNA, partial cds	50.1 bits (25)	3,00E-05
<i>Ovis aries</i> Mel 1a melatonin receptor mRNA, complete cds	50.1 bits (25)	3,00E-05
<i>Ovis aries</i> Mel-1a melatonin receptor mRNA, complete cds	50.1 bits (25)	3,00E-05
<i>Mus musculus</i> Mel-1a melatonin receptor mRNA, complete cds	50.1 bits (25)	3,00E-05
<i>Rattus norvegicus</i> melatonin receptor (MT1) mRNA, partial cds	42.1 bits (21)	0.008
<i>Rattus norvegicus</i> melatonin receptor mRNA, partial cds	42.1 bits (21)	0.008
<i>Oncorhynchus mykiss</i> melatonin receptor Mel1a mRNA, complete cds	38.2 bits (19)	0.13
<i>Oncorhynchus mykiss</i> melatonin receptor gene, partial cds	36.2 bits (18)	0.50
<i>Homo sapiens</i> melatonin receptor 1A (MTNR1A), mRNA	34.2 bits (17)	2.0
<i>Homo sapiens</i> melatonin receptor 1A (MTNR1A), mRNA	34.2 bits (17)	2.0
<i>Nectria haematococca</i> kinesin related protein 1 (KRP1) gene, complete cds	34.2 bits (17)	2.0
<i>Bos taurus</i> melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene, partial cds	34.2 bits (17)	2.0
Human Mel-1a melatonin receptor mRNA, complete cds	34.2 bits (17)	2.0
<i>Homo sapiens</i> hMel1a gene for melatonin 1a receptor, exon2, complete cds	34.2 bits (17)	2.0
<i>Halobacterium sp.</i> NRC-1 section 6 of 170 of the complete genome	32.2 bits (16)	7.8
<i>Pseudomonas</i> phage D3, complete genome	32.2 bits (16)	7.8
Bacteriophage D3, complete genome	32.2 bits (16)	7.8

Deux oligonucléotides biotinylés ont été fabriqués sur commande par CyberGene, la suite de 29 nt appelée sonde anti-sens et la sonde sens : 5'- ATC CCC GAG TGG CTG TTC GTG GCT AGT TA -3'. Cette dernière permet d'apprécier le taux d'hybridation non spécifique.

1.3.2.3 Protocole d'hybridation *in situ*

Nous avons adapté le protocole d'hybridation *in situ* décrit par Morel et Cavalier (1998) à notre problématique.

Après déparaffinage et hydratation, nous effectuons une déprotéinisation des acides nucléiques. L'hybridation est effectuée pendant trois heures à température ambiante avec d'une part la sonde anti-sens et d'autre part la sonde sens. Après lavage et inhibition des peroxydases endogènes, les hybrides sont révélés avec le Diaminobenzidine (DAB) puis les coupes sont déshydratées et montées sous Depex. Le protocole est détaillé en annexe 1.

Le résultat de la réaction enzymatique est un produit de couleur brune. Pour déterminer le bruit de fond lié à l'utilisation de ce substrat, certaines coupes sont traitées avec le seul tampon d'hybridation (sans sonde).

1.4 *Histométrie*

Les mesures effectuées sur les coupes sont obtenues à l'aide de différentes procédures d'analyse d'images détaillées ci-après.

1.4.1 Numérisation

Les coupes sont numérisées puis enregistrées dans un fichier de 640x480 pixels (champ réel : 950x700 μm) avec une résolution de 72 pixels/pouce et une profondeur de couleur de 24bits. Ceci s'effectue grâce à une caméra numérique (Sony SSC-C108P) fixée sur le microscope (Leica HCL3TP) et reliée à un ordinateur (Macintosh G3). Le logiciel d'acquisition utilisé est StrataVideoShop. Les fichiers définitifs sont au format tiff, en mode RVB (rouge, vert, bleu).

1.4.2 Amélioration des images

Le logiciel Photoshop (Adobe) permet de soustraire le fond (image d'un champ clair), de détourer les coupes et d'ajuster les niveaux colorimétriques (figure 5).

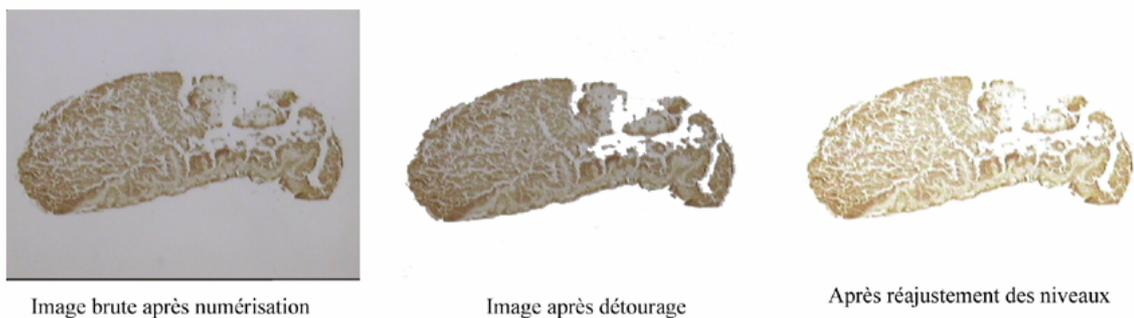


Figure 5 : Traitement des images sous Photoshop.

Nous avons remarqué que la périphérie des coupes est un peu plus marquée que le centre. Ce phénomène apparaît nettement sur les coupes témoin (sans sonde). Nous avons décidé de supprimer cet artéfact en éliminant systématiquement une frange de 7 pixels à la périphérie des coupes (figure 6).

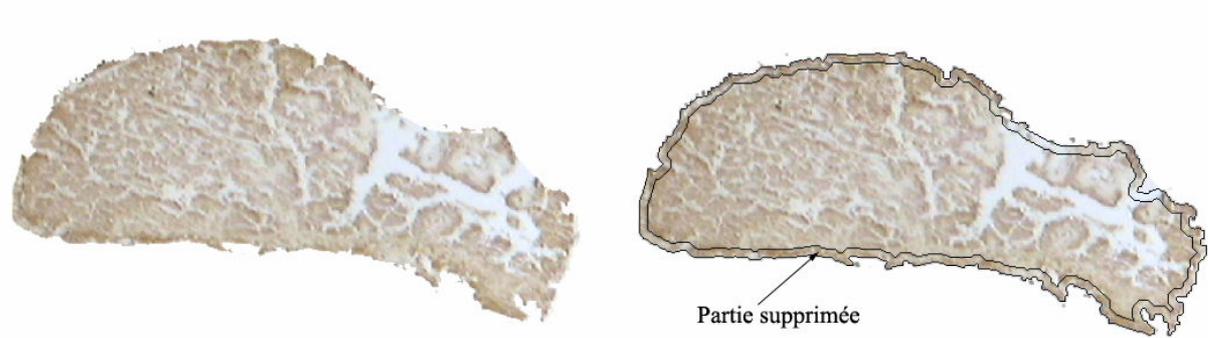


Figure 6 : Elimination de l'artéfact.

1.4.3 Mesures

Le logiciel utilisé pour analyser les images est un logiciel du domaine public, Image, développé à l'institut national de la santé des Etats-Unis et disponible sur internet à l'adresse suivante : <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.

Dans un premier temps nous séparons les trois couches colorimétriques rouge, verte et bleue. Nous conservons la couche la plus contrastée. Dans notre cas, il s'agit de la couche bleue (figure 7). Cette couche conserve l'information de niveau de gris : plus une zone de la coupe est marquée, plus elle apparaît gris foncé. L'échelle des gris s'étend de 0 (blanc) à 255 (noir).

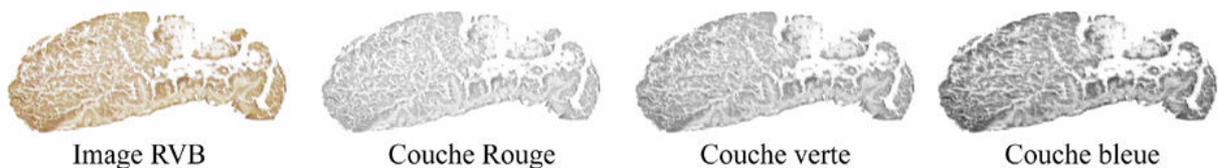


Figure 7 : Composition colorimétrique des images.

A partir d'observations simultanées au microscope et sur l'écran des coupes traitées anti-sens, nous avons déterminé un niveau de gris seuil (80). Toutes les structures cellulaires de niveau de gris supérieur ou égal au seuil sont considérées comme marquées. De plus nous avons calculé la surface totale de la coupe, en fixant deux seuils, un seuil haut (254) et un seuil bas (1) (figure 8). Les surfaces sont exprimées en pixel carré.



Figure 8 : Seuillage avec Image.

La variable retenue pour l'analyse statistique est le rapport surface marquée/surface totale (Sm/St).

1.4.4 Automatisation des mesures

Nous avons automatisé la plupart des tâches répétitives (élimination du fond, élimination des contours, mesure) en utilisant les scripts Photoshop et en élaborant des macros en langage Pascal pour Image. Ceci permet un gain de temps appréciable. D'autre part, cela conduit à diminuer le nombre de manipulations informatiques à la souris et au clavier, et donc le nombre d'erreurs potentielles.

1.5 Analyse statistique

1.5.1 Plan expérimental

1.5.1.1 Etude préliminaire

Notre plan expérimental est conçu dès le départ pour permettre l'analyse temporelle des ARNm mt_1 . Les premiers échantillons, trois hypophyses prélevées à 6h, 10h et 22h, ont été traités en détail de manière à optimiser l'échantillonnage.

Tout d'abord, nous avons cherché à vérifier l'homogénéité du marquage tout au long de l'hypophyse, de manière à pouvoir éventuellement limiter le nombre de coupes à traiter.

Ensuite, nous avons cherché à caractériser le signal non spécifique (sonde sens). Si ce signal est variable à l'intérieur de l'organe, il faut déduire ce marquage à celui obtenu avec la sonde anti-sens, ce qui entraîne des difficultés supplémentaires dans l'analyse d'images. Si le signal non spécifique est constant, soit on procède comme précédemment, soit on n'en tient pas compte pour l'analyse. Nous privilégierons la deuxième option, du fait que nous ne voulons pas effectuer une quantification absolue mais seulement relative.

1.5.1.2 Echantillonnage temporel

Pour l'étude des variations nycthémérales des ARNm, nous avons effectué des prélèvements sur un cycle de 24 heures à raison d'un prélèvement toutes les quatre heures : 2h, 6h, 10h, 14h, 18h et 22h. Pour des raisons pratiques, nous n'avons pu traiter que quatre points horaires. Nous avons choisi de retenir les horaires encadrant l'allumage et l'extinction : 6h-10h et 18h-22h. L'horaire « 6h » est réalisé juste avant 6h, heure d'allumage. L'horaire « 18h » est réalisé juste avant 18h, heure d'extinction.

Pour prendre la variabilité inter-individuelle en compte, nous avons effectué quatre prélèvements par horaire. Signalons que les animaux sont prélevés au hasard dans les viviers. Les échantillons sont indépendants car les individus sont sacrifiés et ne sont utilisés que pour un seul horaire.

1.5.1.3 Variable mesurée

Notre procédure d'analyse d'images permet de différencier les zones marquées des zones non marquées par la sonde anti-sens. La variable « surface de la zone marquée anti-sens » ne permet pas la comparaison entre deux ou plusieurs coupes, qu'elles appartiennent ou non à la même hypophyse. Ceci provient du fait que les coupes n'ont pas toujours la même surface, d'une part parce que les hypophyses n'ont pas toujours la même taille (400 à 900 μm) et d'autre part, parce que les extrémités de l'organe que l'on peut assimiler à une sphère varie significativement en surface suivant l'axe de coupe.

Pour s'affranchir de ces variations, nous avons rapporté la surface marquée (S_m) à la surface totale (S_t) de la coupe, le rapport obtenu (S_m/S_t) constitue la variable étudiée (Larson *et al.*, 1991).

1.5.2 Statistiques inférentielles

1.5.2.1 Questions d'intérêts

Quatre questions d'intérêts motivent l'analyse statistique des résultats :

- le marquage par la sonde anti-sens est-il constant au sein de l'hypophyse suivant l'axe perpendiculaire au plan de coupe (axe z) ? Rappelons que le traitement complet d'un organe conduit à une cinquantaine de coupes et au marquage par la sonde anti-sens du quart de ces coupes. S'il s'avère que le marquage est constant, il sera possible de limiter le nombre de coupe à marquer et/ou à analyser. Pour apprécier la variabilité suivant l'axe z, nous avons choisi de marquer exhaustivement la première hypophyse prélevée à 10h. L'échelle

d'observation considérée (objectif x5 du microscope) de même que la qualité de la fixation n'autorise qu'une analyse globale du signal, sans rentrer dans la répartition par type cellulaire.

- pour valider le signal anti-sens, l'étude histologique fait appel à un double marquage : une coupe traitée avec la sonde anti-sens est suivie d'une coupe traitée avec la sonde sens. La sonde sens représente le marquage non spécifique qui peut se retrouver en partie dans le marquage anti-sens lorsqu'il y a un signal de type mt_1 ou en totalité lorsqu'il n'y a pas ou très peu de signal de type mt_1 . Pour répondre à la question de la validité du signal, nous avons comparé le signal anti-sens au signal sens pour les 3 premiers individus prélevés (6h, 10h et 22h).

- nous avons cherché à caractériser le signal non spécifique : si ce dernier s'avère faible et constant, il est possible de le négliger et d'alléger ainsi l'analyse temporelle, en ne traitant plus systématiquement les coupes avec la sonde sens. Cette étude a été réalisée sur le même jeu de données que précédemment ;

- l'approche temporelle du signal, question d'importance dans notre travail, a été abordée par la méthode classique de l'analyse de variance à un facteur ou un critère de classification ; l'ANOVA a été utilisée en rapport avec le facteur horaire (4 modalités : 6h, 10h, 18h, 22h) tandis qu'un simple test t a été effectué en rapport avec le facteur éclaircissement qui ne comporte que 2 modalités (jour, nuit).

1.5.2.2 Test t de Student

Pour comparer le marquage sens au marquage anti-sens, nous avons effectué trois tests de Student sur échantillons appariés (un par horaire).

Pour répondre à la question de l'effet de l'éclaircissement (jour/nuit) sur le taux d'ARNm de type mt_1 , nous avons utilisé un test t de Student sur échantillons non appariés.

1.5.2.3 Analyse de la variance

Nous avons utilisé cet outil classique d'une part pour étudier la constance du signal sens en fonction des horaires de prélèvement, d'autre part pour effectuer l'analyse des variations temporelles du signal anti-sens. Le cadre conceptuel et la formalisation du test sont largement documentés dans les ouvrages de Dagnélie (1975) et Scherrer (1984).

Nous rappellerons simplement ci-dessous les conditions d'application du test et le degré de robustesse associé.

Les contraintes majeures restreignant l'utilisation de l'ANOVA sont au nombre de trois : indépendance des échantillons, normalité des populations et égalité des variances des groupes soumis à l'analyse.

Comme nous l'avons rappelé au paragraphe plan expérimental (1.5.1.), les échantillons sont indépendants étant donné qu'une hypophyse ne sert que pour un seul horaire.

Nous ne disposons pour le moment que de deux individus par horaire et de quelques coupes par individus, ce qui ne permet pas d'étudier rigoureusement la normalité des populations. Signalons toutefois que l'ANOVA, comme la plupart des tests statistiques classiques, est considérée comme robuste par rapport à la contrainte de normalité (Scherrer, 1984).

Il convient de tenir compte de la nature particulière de la variable étudiée, à savoir une fréquence comprise entre 0 et 1 (rapport surface marquée anti-sens/surface totale de la coupe). Ce type de variable est souvent assorti d'effets de « queue », autrement dit la répartition n'est plus gaussienne, les fréquences faibles (proches de 0%) et fortes (proches de 100%) étant généralement sous-représentées. Ceci a des incidences sur la normalité des populations et sur l'égalité des variances. Dagnélie (1975) préconise un changement de variable ou transformation pour contourner la difficulté, la transformation la plus appropriée étant la fonction arcsinus ou arccosinus.

La vérification de la condition d'égalité des variances ou condition d'homoscédasticité est impérative, le non-respect pouvant affecter fortement les résultats du test (Scheffé, 1959). Aussi nous nous attacherons à vérifier cette hypothèse et nous effectuerons le cas échéant une transformation de variable.

2 Résultats

2.1 *Mise en évidence des ARNm codant pour les récepteurs à mélatonine au sein de l'hypophyse de black-bass*

2.1.1 Validation du protocole expérimentale

Avant d'effectuer l'étude proprement dite, nous avons cherché à valider le protocole d'hybridation. Pour ce faire, nous avons utilisé une sonde universelle (polydT, Promega) qui s'hybride avec tous les ARNm présents sur les coupes. Les premiers essais de marquage ont montré un signal très faible peu différent de celui obtenu avec le témoin. Pour obtenir un signal, nous avons agi sur différentes étapes du protocole.

En particulier, nous avons testé différents temps et concentration de protéinase K. Nous avons également testé différents temps d'hybridation, différentes quantités de sonde (de 30 à 200pg/ml) et de formamide. Concernant les étapes post hybridation, nous avons optimisé le nombre, la durée et la température des lavages pour améliorer le rapport signal spécifique sur signal non spécifique. Nous avons aussi cherché à limiter le bruit de fond par l'élimination des peroxydases et des biotines endogènes. Seule l'inhibition des peroxydases diminue significativement le bruit de fond.

En définitive, les modifications apportées au protocole initial ont permis de dégager un signal avec la sonde polydT et la sonde anti-sens.

2.1.2 Homogénéité du marquage anti-sens au sein de l'hypophyse

L'hypophyse étudiée exhaustivement (10h) comporte 57 coupes. Le marquage AS étant réalisé toutes les 4 coupes, l'analyse de la variabilité du marquage suivant l'axe z s'est faite sur 14 coupes. Le rapport surface marquée sur surface totale s'avère relativement constant (0,35 +/- 0,16) comme le montre la figure 9, sauf aux extrémités de l'organe.

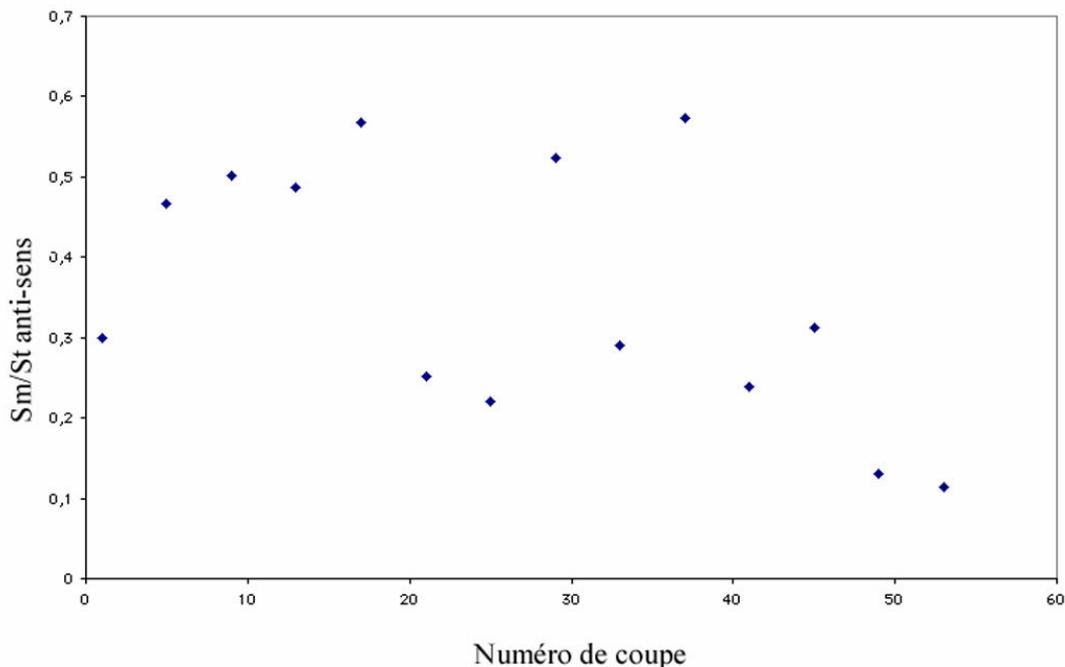


Figure 9 : Intensité du marquage tout au long de l'organe

Aussi, nous avons décidé de limiter le nombre de coupes à étudier en choisissant de marquer les coupes situées au centre de l'organe et de n'analyser parmi celles-ci que les coupes les mieux conservées. Dans le cas le plus défavorable, un individu n'est représenté que par 4 coupes dans l'analyse finale.

2.1.3 Spécificité du signal anti-sens

Afin de vérifier si le marquage obtenu avec la sonde anti-sens est spécifique, nous avons comparé le marquage sens avec le marquage anti-sens. La figure 10 illustre les différences de marquage obtenues dans le cas d'un échantillon prélevé à 10h.

Le marquage obtenu avec la sonde sens (b) est supérieur au témoin (c). Ceci indique la présence d'un signal non spécifique. Toutefois, le signal anti-sens (a) est plus important que le signal sens. Autrement dit, la coupe traitée anti-sens ne contient pas que du signal non spécifique. Si on compare ce dernier résultat avec la sonde polydT (d), qui rappelons-le, s'hybride avec tous les ARNm, une nette différence en faveur du marquage polydT apparaît. Ceci va dans le sens d'un marquage spécifique des ARNm par la sonde anti-sens.

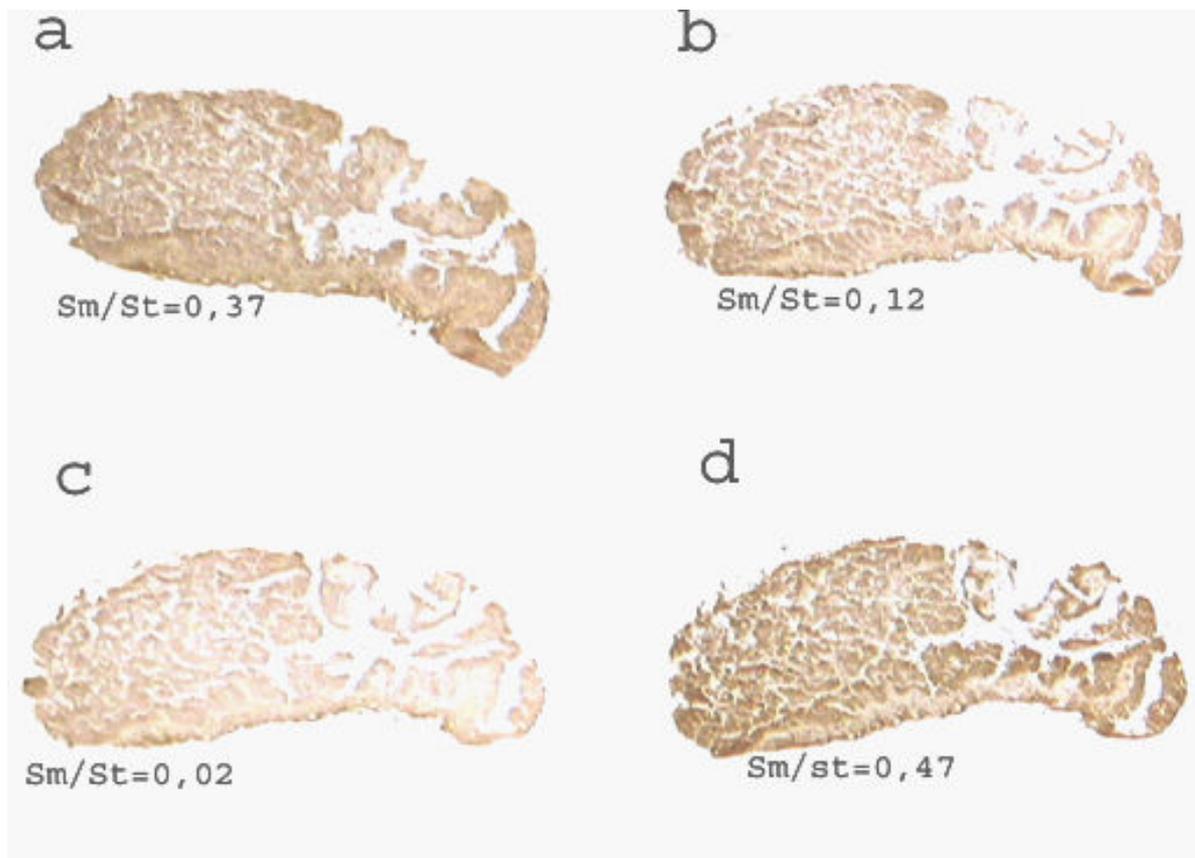


Figure 10 : Marquage obtenu avec la sonde anti-sens (a), la sonde sens (b), le témoin (sans sonde, c) et le polydT (d).

Ces différences de marquage sont généralisables à l'ensemble des coupes de l'organe prélevé à 10h, elles se retrouvent aussi aux deux autres horaires testés, comme le montrent les trois tests t présentés ci dessous. Pour ces trois test, les hypothèses sont :

H0 : égalité des moyennes Sm/St anti-sens et Sm/St sens

H1 : inégalité de ces moyennes

Tableau II : Test t apparié pour l'horaire 6h : X : Sm/St anti-sens, Y : Sm/St sens

DDL Moy. X-Y T apparié Prob. (bilatéral)

3	0.231	2.615	0.0795
---	-------	-------	--------

Au seuil $\alpha=0.05$, ce résultats est à la limite de la significativité.

Tableau III : Test t apparié pour l'horaire 10h : X : Sm/St anti-sens, Y : Sm/St sens

DDL Moy. X-Y T apparié Prob. (bilatéral)

13	0.158	4.335	0.0008
----	-------	-------	--------

Au seuil $\alpha=0.05$, ce résultat ($\alpha>0.0008$) montre une différence significative.

Tableau IV : Test t apparié pour l'horaire 22h : X : Sm/St anti-sens, Y : Sm/St sens

DDL	Moy. X-Y	T apparié	Prob. (bilatéral)
8	0.051	2.301	0.00504

Au seuil $\alpha=0.05$, ce résultat ($\alpha>0.00504$) montre une différence significative.

En résumé, le signal anti-sens est significativement différent du signal sens pour les horaires 10h et 22h, il est à la limite de la significativité ($\alpha=5\%$) pour l'horaire 6h. On peut accorder dans ces conditions une certaine validité au signal anti-sens, autrement dit qu'il y a des ARNm de type mt_1 sur les coupes analysées.

2.1.4 Localisation des ARNm mt_1

Le signal anti-sens est observé uniquement dans l'adénohypophyse. La neurohypophyse apparaissant toujours non marquée (figure 11). Les méthodes de fixations imposées pour obtenir le meilleur compromis entre le marquage HIS et la conservation des structures (Morel et Cavalier, 1998) ne nous permet pas une localisation plus fine.

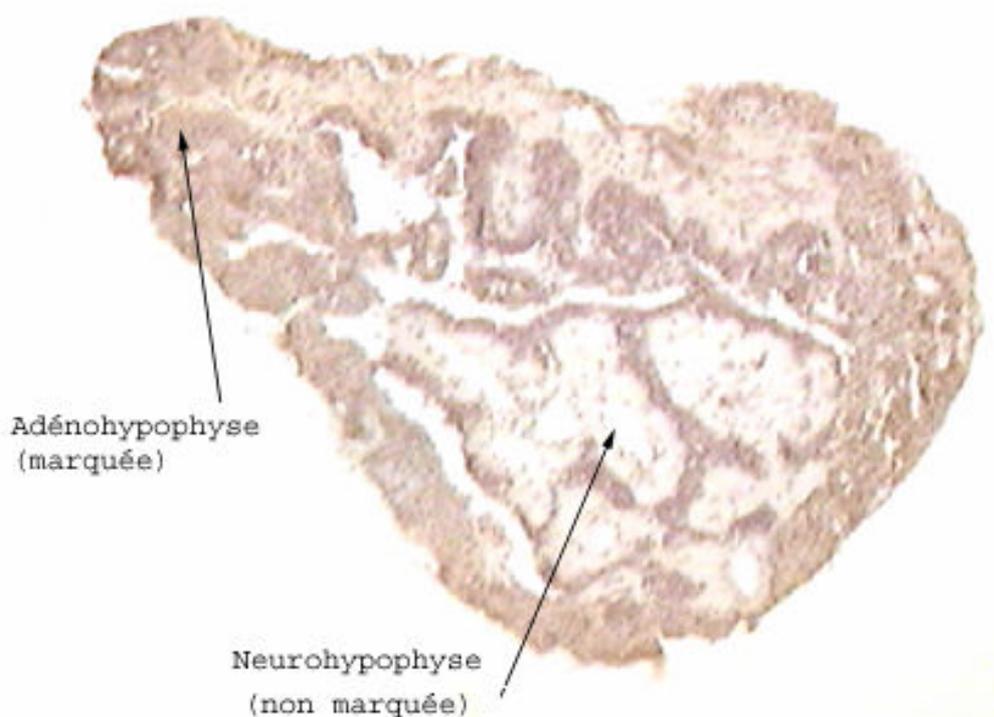


Figure 11 : Localisation du marquage dans l'hypophyse

Ainsi, on ne peut pas dire si ce sont les cellules somatotropes (sécrétrice de GH et de Prolactine) et/ou les cellules gonadotropes (sécrétrices des hormones sexuelles de l'hypophyse) de l'adénohypophyse qui expriment ces ARNm.

2.1.5 Caractérisation du signal non spécifique

Le signal non spécifique est caractérisé par l'étude de trois individus à trois horaires différents. Les données brutes présentées en annexe 2) sont représentées sur la figure 12.

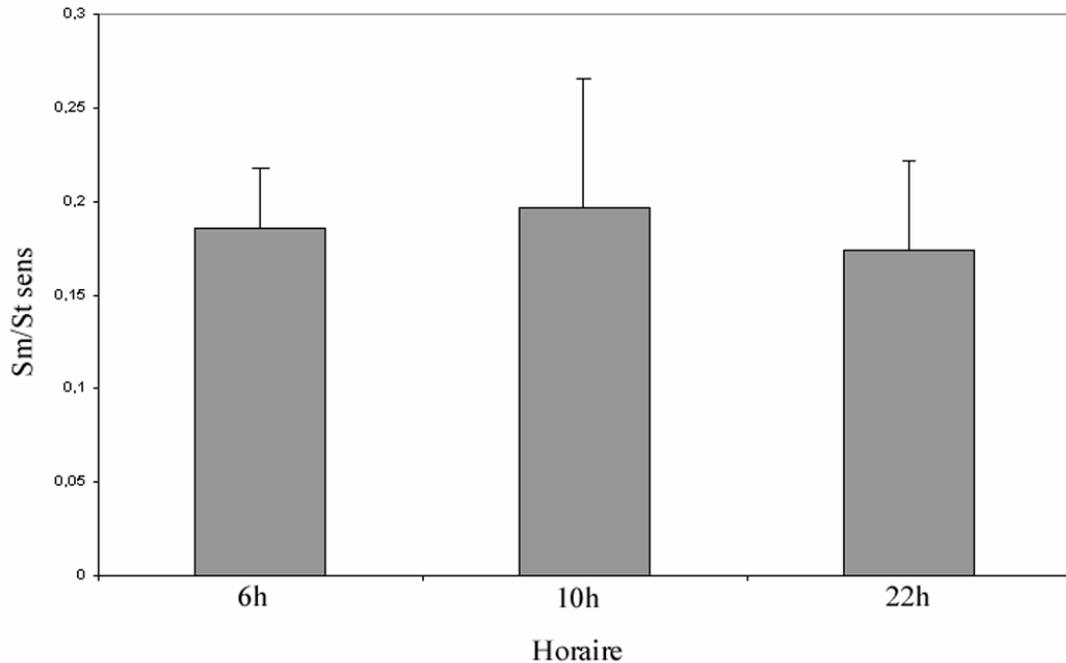


Figure 12 : Marquage sens sur trois individus.

Les statistiques descriptives (tableau V) font apparaître des variances proches qui s'échelonnent entre 0.001 et 0.004. Aussi nous considérons que l'hypothèse d'homoscédasticité est vérifiée. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer une transformation de variable.

Tableau V : statistiques descriptives

Horaire	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Variance
6h	4	0.185	0.032	0.001
10h	14	0.197	0.068	0.004
22h	9	0.174	0.048	0.002

La condition majeure d'application du test étant vérifiée, nous réalisons l'analyse de variance à un facteur. Les résultats sont présentés dans le tableau VI

Rappelons que les hypothèses du test sont :

H0 : égalité des moyennes des populations

H1 : au moins deux moyennes différent

Tableau VI : Table d'ANOVA à un facteur de Sm/St , X : horaire, Y : Sm/St sens,

Source	DDL	S. des carrés	Carré moyen	Test F
Entre groupes	2	0.003	0.002	0.463
Intra-groupes	25	0.085	0.003	P=0.6344
Total	27	0.088		

Si on fixe alpha à 5%, on ne rejette pas l'hypothèse nulle ($\alpha < 0.05$).

Les effectifs inégaux peuvent perturber le résultat du test. Aussi pour plus de sécurité, nous avons réalisé un test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Ce dernier va dans le même sens (non significativité, tableau VII)

Tableau VII : résultats du test de Kruskal-Wallis

DDL	2	
Nombre de groupes	3	
Nombres de cas	28	
H	1.413	p=0.4934
H corrigé pour les ex aequo	1.414	p=0.4931
Nombre d'ex aequo	3	

Les analyses effectuées vont dans le sens d'un niveau constant pour le signal sens ce qui permettra de le négliger pour l'étude temporelle.

2.2 Variations nycthémerales des ARNm mt1

Cette analyse s'effectue sur les coupes anti-sens sans tenir compte du marquage non spécifique (sens). Pour les horaires retenus (6h, 10h, 18h et 22h) nous disposons de deux individus (n=2). Les données brutes sont présentées en annexe 3. La tableau VIII représente la moyenne de la variable pour chaque individu.

Tableau VIII : données brutes

Facteur jour/nuite	Horaire	Individu	Moyenne Sm/St
N	6h	1	0.41625
		2	0.3345
J	10h	1	0.364
		2	0.35542857
J	18h	1	0.091
		2	0.34
N	22h	1	0.2192
		2	0.41625

La représentation graphique des résultats (figure 13) met en évidence des variations de la quantité d'ARNm mt_1 au cours d'un nyctémère. Plus précisément, la valeur maximale est observée à 6h et la minimale à 22h.

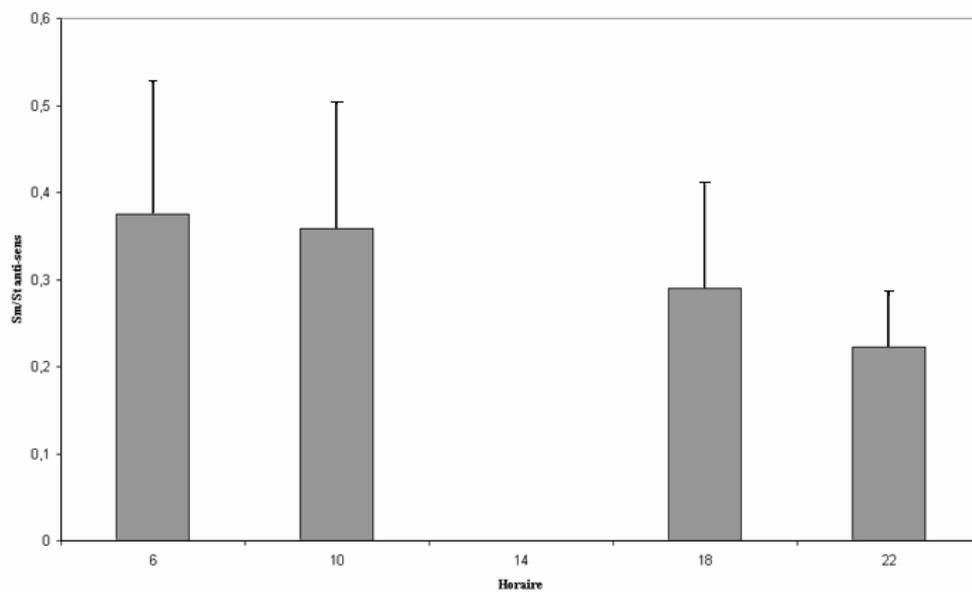


Figure 13 : Représentation graphique des variations des ARNm au cours du nyctémère.

Tableau IX : Statistiques descriptives

Horaire	Effectif	Moyenne	Ecart-type	Variance
6h	8	0.375	0.152	0.023
10h	21	0.358	0.144	0.021
18h	10	0.290	0.120	0.014
22h	10	0.222	0.063	0.004

Les rapports de variance sont tous inférieurs à 6, on peut donc considérer que la condition d'homoscédasticité est réalisée. Nous effectuons alors l'ANOVA

Les hypothèses sont alors :

H_0 : les moyennes sont égales

H_1 : au moins deux moyennes différentes

Tableau X : ANOVA à un facteur X : Horaire, Y : Sm/St anti-sens.

Source	DDL	S. des carrés	Carré moyen	Test F
Entre groupes	3	0.159	0.053	3.206
Intra-groupes	45	0.745	0.017	p=0.0319
Total	48	0.904		

Si on fixe α à 5%, on rejette l'hypothèse nulle. Donc au moins deux moyennes différent. Des comparaisons deux à deux sont effectuées avec le test de Fisher.

Les résultats sont regroupés dans le tableau XI suivant :

Tableau XI : Résultats des tests de Fisher.

	6	10	18	22
6				
10				
18				
22	*	*		

Il y a donc une différence entre l'horaire 22h et les horaires 6h et 10h. En revanche en ce qui concerne les autres comparaisons, on ne peut conclure.

Pour étudier l'effet jour/nuite on effectue un test t de Student en prenant 22h et 6h pour nuit et 10 et 18h pour jour.

Rappelons les hypothèses :

H0 : les deux moyennes sont égales

H1 : les deux moyennes différent

Condition d'application (robustesse par rapport à la normalité)

Tableau XII : Test t, X : jour/nuite, Y : Sm/St anti-sens.

Source	DDL	S. des carrés	Carré moyen	Test F
Entre groupes	1	0.024	0.024	1.278
Intra-groupes	47	0.88	0.019	p=0.2639
Total	48	0.904		

L'analyse statistique (au seuil $\alpha=0.05$) ne montre pas de différence significative entre le jour et la nuit (figure 14).

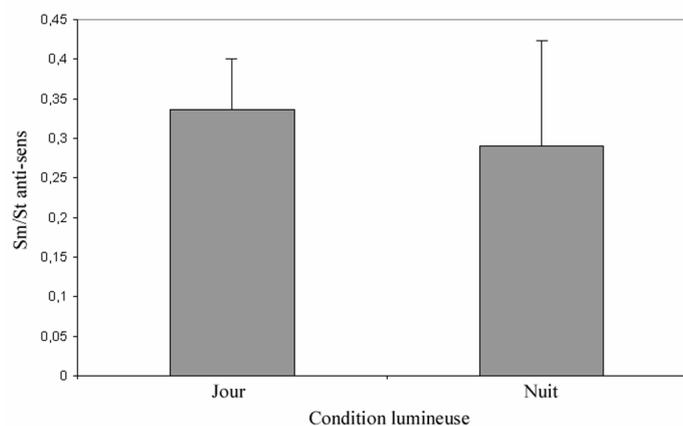


Figure 14 : Différences Jour/Nuit du marquage.

3 Discussion et perspectives

Si de nombreux travaux ont démontré l'importance jouée par la variation de la durée de synthèse et de libération de la mélatonine dans la transmission de l'information photopériodique, les mécanismes d'action de la mélatonine mis en œuvre dans les différentes régulations sont encore très mal connus. Ces connaissances se sont heurtées entre autres jusqu'à ces dix dernières années à l'absence d'agoniste et d'antagoniste spécifiques ainsi qu'au manque d'information concernant les organes et cellules cibles de l'hormone. Ce n'est qu'à partir de 1987 que la localisation, la caractérisation et l'isolement de récepteurs spécifiques à l'hormone ont pu réellement débiter avec la disponibilité d'un agoniste iodé, la 2-[(125)I]iodomélatonine. Ce nouvel outil a par la suite permis le clonage du premier ADNc complet de récepteur à la mélatonine (Ebisawa *et al.*, 1994). Toutefois, la localisation à l'échelle cellulaire avec ce type de marqueur n'est pas assez résolutive pour identifier avec haute précision les cellules exprimant les récepteurs à mélatonine sur des coupes d'hypophyse souvent de très petite taille. De plus, la coupe par congélation imposée par la méthode conserve mal la structure cellulaire difficile à observer.

C'est pourquoi afin de localiser les récepteurs, nous avons utilisé une technique qui préserve mieux les structures (notamment grâce à la fixation avec le paraformaldéhyde 4%). La technique d'hybridation *in situ* localise indirectement les récepteurs (on suppose que les messagers sont traduits) et permet de travailler sur l'expression du gène mt_1 .

Le signal obtenu avec la sonde anti-sens est en faveur de la présence de récepteurs à mélatonine de type mt_1 dans l'hypophyse. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus par Mazurais (2000), Iigot *et al.* (1994) et Gaildrat et Falcon (2000) chez la truite, le poisson rouge et le brochet. Chez la truite, les expériences d'hybridation *in situ* réalisées par Mazurais (2000) révèlent un signal spécifique faible. Notre étude corrobore ces résultats.

La faiblesse du signal peut aussi provenir d'un manque d'optimisation de la technique. Dans notre cas, la température d'hybridation utilisée favorise les liaisons spécifiques mais aussi les non spécifiques, ce qui engendre un bruit de fond important. Ce dernier entraîne une difficulté de traitement par l'analyse d'image, qu'il est intéressant de lever.

Il est nécessaire de confirmer ces résultats à l'aide d'une technique plus sensible. Celle-ci fait appel après extraction des ARNm à une amplification par RT-PCR (Reverse transcriptase – Polymerase Chain Reaction) puis par utilisation de la technique de *Southern blot* avec notre sonde anti-sens biotinylée. Une autre voie de confirmation est envisagée. Elle

nécessite le clonage du récepteur à mélatonine du black-bass qui permettra la fabrication d'une sonde spécifique à cette espèce. Cette sonde sera alors utilisée en hybridation *in situ* pour la localisation et en électrophorèse pour la quantification des récepteurs mt_1 .

Dans la littérature, il est reconnu que la mélatonine agit sur certaines sécrétions hypophysaires *via* des facteurs hypothalamiques tels que le GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), le TRH (Thyrotropin Releasing Hormon) ou la GRF (Growth Hormon Releasing Factor). La présence de récepteurs à mélatonine dans l'hypophyse suggère un mode d'action directe de la mélatonine sur cet organe. Cette voie de régulation décrite chez les Mammifères est assez nouvelle chez les Poissons. Ce résultat ouvre des perspectives originales pour l'étude de la régulation de la croissance et/ou de la reproduction. Il reste à préciser sur quels types cellulaires hypophysaires se trouvent les récepteurs mt_1 . Notre travail ne répond qu'en partie à cette question. Il montre que seules les cellules de l'adénohypophyse sont marquées. Les cellules sécrétrices de l'adénohypophyse diffèrent par leur sécrétion. Ces dernières peuvent être caractérisées par des anti-corps spécifiques. Nous envisageons un double marquage pour mettre en évidence simultanément les messagers mt_1 et la ou les hormones sécrétées.

Outre la mise en évidence de récepteurs à mélatonine dans l'hypophyse, l'étude de la variation du nombre de récepteurs a été réalisée. Le maximum de marquage est observé à 6h et le minimum à 22h. Chez le rat, Gauer *et al.* (1993) note une densité de récepteur 50 à 70% plus forte au crépuscule qu'à l'aube. Ceci est à l'opposé de nos observations, où on observe un marquage 77% plus fort en début qu'en fin de jour. Cependant, rappelons que le rat un animal nocturne alors que le black-bass est diurne.

Ce type de résultat chez le poisson n'a pas encore été noté dans la littérature. Toutefois, cette première approche doit être confirmée en incluant dans l'analyse les deux horaires 2h et 14h. L'utilisation de deux réplicats supplémentaires pourra améliorer la précision des résultats.

Si la variation temporelle des récepteurs se confirme, il y aurait décalage de phase entre le pic nocturne de mélatonine circulante donné dans la littérature et le pic de récepteurs. Des résultats similaires sont retrouvés chez le mouton et le hamster ou le rythme observé dans la *pars tuberalis* semble inversement corrélé à la forte concentration de mélatonine plasmatique nocturne (Piketty et Pelletier, 1993 ; Gauer *et al.*, 1993). L'étude de la variation des ARNm pourra être complétée par des analyses quantitatives plus fines type RT-PCR quantitative. Moins contraignantes que l'hybridation *in situ* qui reste une analyse semi-quantitative, ces méthodes permettront de traiter plus d'individus et plus de points horaires et

ainsi d'améliorer la précision des résultats. Une étude en condition de luminosité constante (LL ou DD) permettra d'envisager l'endogénéité des rythmes.

La perspective de l'étude dans laquelle s'inscrit ce travail est de mieux appréhender les mécanismes d'intégration du message photopériodique par l'axe hypothalamo-hypophysaire chez diverses espèces de poisson d'intérêt économique (la truite, le black-bass et le bar). Ces espèces sont sensibles aux manipulations photopériodiques (photopériode artificielle) tant pour l'étude de la croissance que pour les comportements de prise alimentaire (Petit, 2001). A long terme, ces études visent par une meilleure connaissance du mode d'action de l'axe hypothalamo-hypophysaire à améliorer l'efficacité des élevages piscicoles.

Références bibliographiques

- AL-GHOUL W., HERMAN M.D. and DUBOCOVICH M.L.** (1998) Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum, *neuroreport*, 9:4063-4068.
- BOISSIN J. et CANGUILHEM B.** (1998) Les rythmes du vivant : origine et contrôle des rythmes biologiques, Ed. Nathan/CNRS Editions, Paris, 320p.
- DAGNELIE P.** (1975) Théorie et méthode statistiques, Presses agronomique de Gembloux, 463p.
- EBISAWA T., KARNE S., LERNER M.R. and REPPERT S.M.** (1994) Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophore, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:6133-6137.
- GAILDRAT P. and FALCON J.** (2000) Melatonin receptor in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[(125)I]iodomelatonin binding and cyclic AMP response, *Neuroendocrinology*, 72(1):57-66.
- GASTON S. and MENAKER M.** (1968) Pineal function: the biological clock in the sparrow?, *Science*, 160:1125-1127.
- GAUER F., MASSON-PEVET M., SKENE D.J., VIVIEN-ROELS B. and PEVET P.** (1993) Daily rhythms of melatonin binding sites in the rat *pars tuberalis* and suprachiasmatic nuclei; evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself, *Neuroendocrinology*, 57:120 - 126.
- LARSON L.-I., TRAASDHL B. and HOUGAARD D.M.** (1991) Quantitative non-radioactive *in situ* hybridation. Model studies on pituitary proopiomelanocortin cells after adrenalectomy, *Histochemistry*, 95:209-215.
- IIGOT M., KOBAYASHI M., OHTANI-KANEKO R., HIRATA K., SHINOHARA H., TABATA M. and AIDA K.** (1994) Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain, *Brain research*, 644:213-220.
- MARTIN M., KAMWIRA S., EXBAYAT J.M., KOKKIDIS M.J. et GOUBIER V.** (1998) L'hypophyse du black-bass (Poisson Téléostéen Centrarchidé) au cours du cycle de reproduction, *Rev. Fr. Histotechnol.*, 11(1):65-73.
- MARTOJA R. et MARTOJA M.** (1967) Initiation aux techniques de l'histologie animale, Masson, Paris, 345p.

- MAZURAS D.** (2000) Clonage et expression des récepteurs à la mélatonine chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) : contribution à l'étude des mécanismes d'intégration du message photopériodique, Thèse d'université, Université de Rennes I, 216p.
- MEEK J. and NIEUWENHUYS R.** (1998) Holostean and Teleosts *in* The central nervous system of Vertebrates (volume 2), Nieuwenhus R., Donkelaas J. and Nicholson C. Eds, Springer, 759-937.
- MILLET B. et MANACHERE G.** (1983) Introduction à l'étude des rythmes biologiques, Ed. Vuibert, Paris, 88p.
- MOREL G. et CAVALIER A.** (1998) Hybridation *in situ* en microscopie photonique, Polytechnica, Paris, 304p.
- PETIT G.** (2001) Influence de l'éclairage (LD12:12, LL) et de la densité d'élevage sur les activités comportementales (déplacement, prise alimentaire et agressivité), la croissance pondérale et l'hormone de croissance chez le black-bass (*Micropterus salmoides* Lacépède), Thèse d'université, Université de Saint-Etienne. 180p.
- PICKFORD G.E. et ATZ J.W.** (1957) The physiologie of the pituitary gland of fishes, N.Y. Zool. Soc., New York, 613p.
- PIKETTY V. ET PELLETIER J.** (1993) Melatonin receptors in the lamb *pars tuberalis*/median eminence throughout the day, Neuroendocrinol., 58:359-365.
- PIVNICKA K. et CERNY K.** (1987) Poissons, Gründ, Paris, 304p.
- RALPH M.R., FOSTER R.G., DAVIS F.C. and MENAKER M.** (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period, Science, 247:975-978.
- REPERT S.M., WEAVER D.R., CASSONE V.M., GODSON C. and KOLAKOWSKI L.F.** (1995) Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain, Neuron, 15:1003-1015.
- SCHEFFÉ H.** (1959) The analyse of variance, Wiley, New York, 477p.
- SCHERRER B.** (1984) Biostatistique, Gaëtan Morin Editeur, Chicoutimi, 850p.
- TAKASHIMA F. and HIBIYA T.** (1995) An atlas of fish histology: normal and pathological feature, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 195p.

Annexes

Annexe 1 : protocole d'hybridation *in situ*.

- Déparaffinage et hydratation
 - Deux bains de toluène de 5min ;
 - Trois bains d'éthanol de concentration décroissante (100°, 95°, et 70°) de 3min chacun ;
 - Un bain de NaCl à 9g/l de 5min (les ions Na⁺ maintiennent *in situ* les acides nucléiques) ;
 - Un bain de TrisHClCaCl₂ de 5min à 37°C (ce tampon contient du calcium qui est un cofacteur de la Protéinase K) ;
- Déprotéinisation des acides nucléiques
 - Un bain de protéinase K à 5µg/ml dans du tampon TrisHClCaCl₂ à 37°C pendant 30min ;
 - Un bain de lavage dans du tampon PO₄ à 100mM pendant 2min à température ambiante (ce tampon arrête l'action de la protéinase K et enlève les traces du tampon précédent) ;
 - Un rinçage dans un bain de NaCl à 9g/l pendant 5min (pour éviter les précipités dans l'alcool) ;
 - Deux bains d'éthanol 95° de 3min ;
 - Séchage sous hotte pendant 40min (cela permet d'éliminer le milieu aqueux pour empêcher la dilution du tampon d'hybridation et de la sonde) ;
- Tampon d'hybridation
 - sulfate de Dextran à 10% (protège les ARN cellulaires et augmente l'efficacité de l'hybridation) ;
 - Standard Sodium Citrate (SSC) à 4% (la concentration de Na⁺ influence la stabilité des hybrides et le pH doit être voisin de la neutralité) ;
 - Denhardt à 1% (sature des liaisons non spécifiques par compétition avec des macromolécules) ;
 - ARNt à 250mg/ml ;
 - ADN de sperme de saumon dénaturé à 250mg/ml (permet une saturation des liaisons non spécifiques) ;
 - Formamide à 50% (l'ajout de formamide diminue la température d'hybridation) ;
 - Sonde à 200pg/ml (deux sondes différentes, la sonde anti-sens ou la sonde sens) ;
 - Le volume est complété avec de l'eau pure stérile ;
- Hybridation pendant 3h en chambre humide et à température ambiante
- Lavages (la stabilité des hybrides dépend de la température, la force ionique, les hybrides les moins stables sont dénaturés avant les plus stables)
 - Rinçage rapide avec du SSC 5x ;
 - Un bain de SSC 2x de 30min à 45°C sous agitation légère ;
 - Un bain de SSC 2x de 30min à température ambiante sous agitation légère ;
 - Un bain de SSC 1x de 30min à température ambiante sous agitation légère ;
 - Un rinçage rapide avec du tampon TrisHClNaCl ;
 - Deux rinçages de 5 et 10min dans du tampon TrisHClNaCl ;
- Inhibition des peroxydases endogènes
 - En chambre humide, H₂O₂ à 3% dans du tampon TrisHClNaCl pendant 30min à température ambiante ;
 - Un rinçage rapide dans du tampon TrisHClNaCl ;
 - Deux rinçages dans du tampon TrisHClNaCl de 5 et 10min ;
- Préparation de la révélation
 - Un rinçage dans du BSA à 1% dans du tampon TrisHClNaCl pendant 5 min ;
 - Incubation pendant 30min de Streptavidine/péroxydase diluée au 1/50 dans du tampon TrisHClNaCl+BSA 1% ;
 - Un rinçage rapide dans du tampon TrisHClNaCl ;
 - Deux rinçages de 5 et 10min dans du tampon TrisHClNaCl ;
- Révélation avec de 3'-DiaminoBenzidine tétrachlorure (DAB) (kit chromogène DAKO)
 - En chambre humide, 30 min de DAB dans son tampon et en présence de d'H₂O₂ ;
 - Rinçage avec de l'eau distillée ;
- Déshydratation et montage
 - Deux bains d'éthanol de concentration croissante (70° et 95°) pendant 2min ;
 - Deux bains d'éthanol 100° de 2min ;
 - Deux bains de toluène pendant 2min ;
 - Montage sous Depex ;

Annexes 2 : Données brutes de la caractérisation du marquage sens

Facteur jour/nuit	horaire	Coupe	Sm/St
N	6h	1	0,181
		2	0,155
		3	0,231
		4	0,175
J	10h	1	0,218
		2	0,292
		3	0,275
		4	0,203
		5	0,158
		6	0,1
		7	0,203
		8	0,248
		9	0,272
		10	0,231
		11	0,224
		12	0,115
		13	0,141
		14	0,077
N	22h	1	0,2
		2	0,189
		3	0,235
		4	0,2
		5	0,211
		6	0,148
		7	0,163
		8	0,202
		9	0,089
		10	0,101

Annexe 3 : Données brutes de l'étude des variations nycthémerales des ARNm

Facteur jour/nuit	Horaire	Individu	Sm/St
N	6h	1	0,255
			0,471
			0,669
			0,27
		2	0,263
			0,331
			0,258
			0,486
J	10h	1	0,225
			0,536
			0,476
			0,351
			0,23
			0,41
			0,32
		2	0,299
			0,466
			0,502
			0,487
			0,568
			0,251
			0,221
	18h	1	0,523
			0,291
			0,574
			0,238
			0,312
			0,13
			0,114
		2	0,057
			0,125
			0,419
			0,417
			0,308
			0,234
			0,365
N	22h	1	0,352
			0,281
			0,344
			0,225
		2	0,2
			0,237
			0,273
			0,161
		1	0,25
			0,224
		2	0,325
			0,238
			0,093