

RÔLE DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN DANS LE TRANSPORT DE LA MÉLATONINE PINÉALIEUNE VERS SES CIBLES CENTRALES

ROLE OF CEREBROSPINAL FLUID IN CARRYING MELATONIN TO ITS CENTRAL TARGET SITES

Par Benoît MALPAUX⁽¹⁾ et Céline LEGROS
(Communication présentée le 6 novembre 2008)

RÉSUMÉ

La mélatonine, par sa durée nocturne de sécrétion, traduit les effets de la photopériode sur la reproduction. Dans cette revue, nous décrivons des résultats récents qui étayent l'hypothèse selon laquelle la mélatonine est transportée de la glande pinéale vers ses cibles cérébrales par le liquide céphalo-rachidien (LCR), plutôt que par le sang. Premièrement, la mélatonine est libérée dans le LCR en un site spécifique dans le recessus pinéalien où des pinéaloctes sont en contact direct avec le LCR. En conséquence, la mélatonine est présente à des concentrations environ 100 fois plus élevées dans le LCR que dans le sang. Deuxièmement, la mélatonine du LCR est capable de diffuser dans les tissus cérébraux rapidement et efficacement et peut donc atteindre des structures périventriculaires dans lesquelles des sites de liaison à la 2-iodomélatonine sont présents. L'ensemble de ces données conforte l'idée que la mélatonine du LCR est un signal physiologique pour le cerveau.

Mots-clés: liquide céphalo-rachidien, cerveau, mélatonine, reproduction, photopériode.

SUMMARY

Through the duration of its nocturnal secretion, melatonin is the primary transducer of photoperiodic information to the reproductive axis in seasonal breeders. In this review, we describe recent results supporting the hypothesis that melatonin, released by the pineal gland, reaches its central targets carried by cerebrospinal fluid (CSF), rather than blood. Firstly, melatonin is released in the CSF through a specific site in the pineal recess where protruding pinealocytes contact with the CSF. Consequently, melatonin is present in much higher concentrations (100 times), in the cerebrospinal fluid (CSF) than in the blood. Secondly, CSF melatonin diffuses in the brain tissues quickly and efficiently and thus reaches periventricular structures featuring 2-iodomelatonin binding sites. These data support the idea that CSF melatonin acts as a physiological signal for the brain

Key words: cerebrospinal fluid, brain, melatonin, reproduction, photoperiod.

(1) UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly, France.

INTRODUCTION

De nombreux rôles ont été attribués au liquide céphalo-rachidien (LCR) comme la protection du cerveau ou l'élimination des déchets cérébraux. De plus en plus de données suggèrent un rôle possible du LCR comme transporteur de signaux chimiques dans le cerveau et son implication dans la communication intracérébrale non-synaptique (Abbott, 2004). La mélatonine (MLT) est un de ces signaux chimiques et son transport par le LCR pourrait être d'importance physiologique. Elle y est en effet, présente, chez certains mammifères, à fortes concentrations et induit certains de ses effets physiologiques par une action sur des cibles cérébrales. Après quelques rappels sur la physiologie du LCR, nous montrerons l'existence d'un mécanisme spécifique de libération de la mélatonine dans le LCR et nous analyserons l'importance fonctionnelle de la présence de mélatonine dans ce milieu. L'ensemble de ces données suggèrent que, dans les conditions physiologiques, le LCR joue un rôle de transport de la mélatonine de son lieu de synthèse vers ses cibles cérébrales et renforcent l'hypothèse d'une implication du LCR dans la communication intracérébrale.

ORIGINE ET FONCTIONS DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

Le LCR, liquide incolore présent dans le cerveau et le canal rachidien, est majoritairement synthétisé et sécrété par les plexus choroïdes des ventricules latéraux (et/ou du troisième ventricule). Son volume intracrânien varie d'une espèce à l'autre, 25ml chez l'Homme et 14ml chez le mouton. Sa production est de l'ordre de 170ml par 24h chez le mouton et la totalité du LCR serait renouvelé 12 fois par jour (Evans *et al.* 1974).

Depuis plus d'un siècle, l'idée prévaut que le LCR, sécrété par les plexus choroïdes, circule dans le système ventriculaire (ventricules latéraux, troisième ventricule, aqueduc de Sylvius et quatrième ventricule), pour passer ensuite dans les espaces sous-arachnoïdiens encéphaliques et spinaux, à la sortie du quatrième ventricule, et enfin être réabsorbé, pour sa majeure partie, dans le sinus sagittal supérieur où des granulations arachnoïdiennes sont les plus nombreuses.

Selon ce modèle, le liquide céphalo-rachidien ne ferait qu'un seul « passage » linéaire dans le cerveau. Des résultats relativement récents (Maurizi 2003) suggèrent l'existence d'un phénomène de recirculation / recyclage du LCR. Le LCR ne serait pas réabsorbé dans sa totalité par les granulations arachnoïdiennes du sinus veineux mais repasserait, *via* les plexus choroïdes, dans les ventricules suivant un circuit fermé, d'une part pour se recharger en éléments indispensables à sa fonction et d'autre part, pour limiter ses pertes.

La composition du liquide céphalo-rachidien est proche de celle du plasma sanguin, mais le LCR n'est pas un ultra-filtrat du plasma et résulte d'une sécrétion active. Les molécules présentes peuvent provenir du sang, être directement libérées par les cellules nerveuses à son contact ou diffuser depuis le compartiment

extracellulaire. Ce sont un très grand nombre d'hormones comme les hormones « hypothalamiques », hypophysaires, stéroïdiennes, pancréatiques et neuroendocrines (comme la mélatonine), des protéines de liaison et de transport, des neuropeptides et des cytokines (Wood 1982; Yuan & Desiderio, 2005).

En ce qui concerne ses fonctions, on lui attribue, par sa présence autour du cerveau et dans les ventricules, un rôle dans le positionnement et la protection du cerveau et dans le maintien de l'homéostasie du milieu péri-cérébral. Il participe à l'élimination des métabolites cérébraux, à l'apport de nutriments aux cellules nerveuses et gliales. En relation avec les plexus choroïdes, il maintient constants le pH, la composition protéique et hormonale du microenvironnement cellulaire (Nilsson *et al.* 1992). Il constituerait une voie de communication, permettant aux molécules présentes ou sécrétées d'atteindre rapidement diverses régions cérébrales. D'après Abbot (2004), ce rôle de médiateur de l'information serait relayé par le liquide extracellulaire (interstitiel) du cerveau dont l'origine et la composition sont liées à celles du LCR et participerait avec ce dernier à la communication non-synaptique de cellule à cellule et à l'apport de molécules dans des régions spécifiques du cerveau (Abbott, 2004).

L'hypothèse selon laquelle le LCR serait une voie physiologique dans le transfert d'informations est illustrée par les expériences d'injection de molécules radiomarquées. Les résultats d'injections intra-cérébro-ventriculaires de ¹⁴C-inuline (Proescholdt *et al.* 2000), ¹⁴C-uridine (Jakoubek 1976), de ¹²⁵I-leptine ou de ¹⁴C et ³H-mélatonine (Anton-Tay *et al.* 1988; Vitte *et al.* 1988), ont montré une distribution plus ou moins rapide des molécules dans l'ensemble du système ventriculaire et leur passage dans le cerveau en proportions variables, d'abord dans les régions péri-ventriculaires, puis dans certaines régions plus éloignées comme l'hypothalamus. On a également montré le passage inverse des molécules des tissus cérébraux vers le LCR (Hoistad *et al.* 2005), argument supplémentaire en faveur d'un rôle important du liquide céphalo-rachidien dans la communication intracérébrale non synaptique.

LA MÉLATONINE EST PRÉSENTE EN FORTES CONCENTRATIONS DANS LE LCR

La mélatonine (MLT) est principalement sécrétée par la glande pinéale; libérée dans la veine de Galien pendant la nuit, elle rejoint la circulation périphérique et y reste indétectable pendant le jour. On note de larges variations spécifiques et individuelles des concentrations nocturnes. Mesurées dans le sang de la veine jugulaire, elles varient, dans l'espèce ovine, de moins de 50 pg/ml à 1000 pg/ml (Zarazaga *et al.* 1998). Cette variabilité inter-individuelle, répétable et héritable, n'est pas due à des variations de l'activité des enzymes de synthèse de la MLT mais à la taille de la glande pinéale et au nombre de pinéalcocytes qu'elle contient (Coon *et al.* 1999). Les concentrations de MLT sont trois à cinq fois inférieures dans les artères car-

tides à celles constatées dans les veines jugulaires. Cette différence résulte de la dégradation hépatique de la mélatonine et de sa captation par les tissus périphériques, avant le retour au cerveau par les carotides.

La présence de mélatonine dans le liquide céphalo-rachidien a été démontrée dans toutes les espèces étudiées, mais les concentrations obtenues sont très variables. La diversité des résultats est liée en grande partie à la localisation des prélèvements de LCR et éventuellement, à des différences de morphologie de la glande pinéale. Dans la *Cisterna magna* et le canal rachidien, les taux de mélatonine sont de 30 pg/ml chez le rat (Withyachumnarnkul & Knigge, 1980), de 10-300 pg/ml chez le mouton, (Rollag *et al.* 1978), de 20-40 pg/ml chez le singe *Rhesus* (Perlow *et al.* 1981) : ils sont relativement faibles et comparables à ceux du sang. Ceux dans le LCR des ventricules latéraux dépassent nettement ceux dans la *Cisterna magna* : ils atteignent 600 à 2400pg/ml chez le mouton, la chèvre (Kanematsu *et al.* 1989 ; Skinner & Malpaux, 1999) ; de même chez l'Homme (Longatti *et al.* 2004), la concentration est plus élevée lorsque le LCR est prélevé dans le ventricule latéral droit (172pg/ml) que par ponction lombaire (27pg/ml). Sont également rapportées des variations des concentrations de MLT au sein même du système ventriculaire : chez le mouton, il existe un rapport de un à cinq entre les taux mesurés dans les ventricules latéraux (525 ± 212 pg/ml) et ceux du troisième ventricule (2247 ± 629 pg/ml) (Skinner & Malpaux, 1999) ; chez l'Homme, ce rapport varie de un à trois (Longatti *et al.* 2004). Le profil nyctéméral de la concentration de MLT dans le LCR est similaire à celui observé dans le sang. Chez le mouton, les taux sont très élevés la nuit, de 1497 ± 216 pg/ml et faibles mais non nuls le jour, de 71 ± 8 pg/ml. Les augmentations de début de nuit et les diminutions de fin de nuit sont synchrones dans le sang et le LCR (Skinner & Malpaux, 1999).

L'origine de la mélatonine du liquide céphalo-rachidien a longtemps été l'objet de controverse. Plusieurs hypothèses ont été avancées : la première proposait une captation active de la MLT du sang périphérique dans le LCR, la seconde, une libération par les plexus choroïdes après transport rétrograde depuis la veine de Galien, la troisième, une libération depuis la glande pinéale *via* le récessus pinéalien, évagination du troisième ventricule dans la glande pinéale (Wood, 1982 ; Malpaux *et al.* 2002).

Les résultats obtenus chez le mouton (Tricoire *et al.* 2002) ont permis de démontrer que la MLT était libérée dans le LCR directement depuis la glande pinéale dans le troisième ventricule par l'intermédiaire du récessus pinéalien. En effet, le prélèvement simultané de LCR par deux canules guides implantées dans le troisième ventricule (**figure 1**), soit au niveau du récessus pinéalien, au sommet du troisième ventricule, soit dans sa partie plus basale, montre que les taux de mélatonine à la sortie du récessus pinéalien sont beaucoup plus élevés que dans le reste du troisième ventricule (**figure 2**). Dans les mêmes conditions, la vitesse de prélèvement par la canule placée dans le récessus pinéalien influence fortement les taux de MLT mesurés dans les

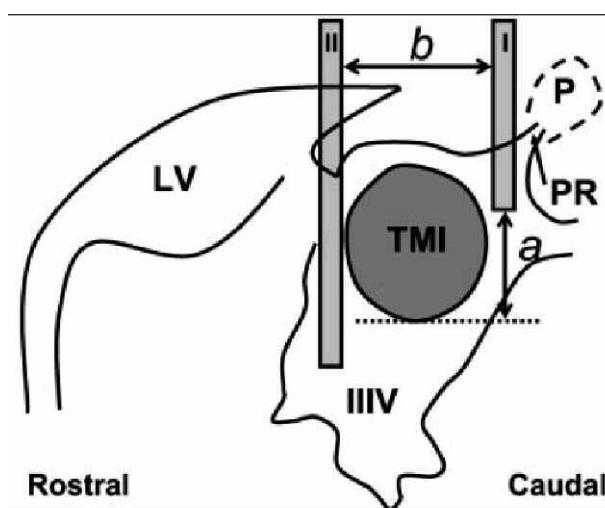


Figure 1 : Représentation schématique du système ventriculaire ovin et du site d'implantation des canules dans l'expérience de prélèvement de LCR en deux sites du 3^e ventricule (IIIIV). La canule I est implantée dans le récessus pinéalien (PR) et la canule II, dans la partie ventrale du 3^e ventricule. (LV, ventricules latéraux ; P, la glande pinéale ; TMI, masse thalamique intermédiaire). D'après Tricoire *et al.* 2002)

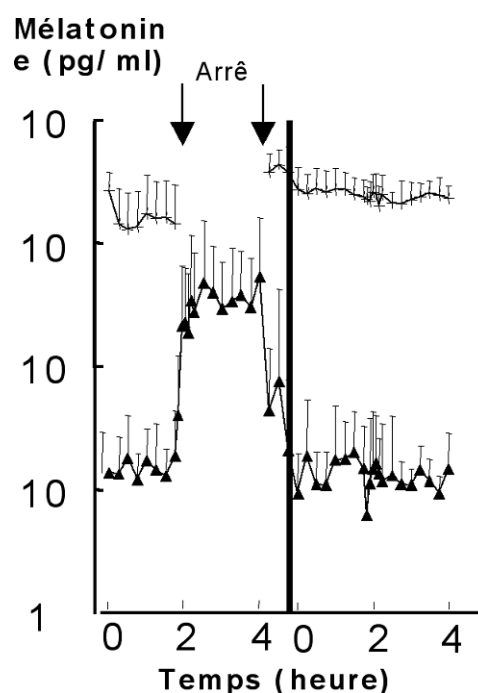


Figure 2 : Concentrations moyennes (\pm SEM) de mélatonine (MLT) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) collecté dans le récessus pinéalien (+, ligne supérieure) et/ou dans la partie ventrale du 3^e ventricule (?). Dans la partie gauche du graphe, du temps 0h au temps 2h, le LCR est collecté simultanément par les deux canules : les taux de mélatonine dans le LCR du récessus pinéalien sont très supérieurs à ceux de la partie ventrale du 3^e ventricule. Entre 2h et 4h, la collecte de LCR dans le récessus pinéalien est arrêtée et le LCR n'est prélevé que dans la partie ventrale du 3^e ventricule, on observe une augmentation des taux dans celui-ci. Cette augmentation cesse dès qu'on reprend les prélèvements simultanés dans les deux territoires (partie droite du graphique). D'après Tricoire *et al.* 2002.

prélèvements effectués par l'autre canule, suggérant que la récupération rapide de LCR à la source de la mélatonine (récessus pinéalien) l'empêche de parvenir dans le reste du système ventriculaire. Cette hypothèse est confirmée par l'obturation du récessus pinéalien à l'aide d'une colle biologique, qui entraîne une chute de 80 %, du taux de mélatonine du LCR, passant de 6500pg/ml chez les animaux témoins à environ 1000pg/ml chez ceux dont le recessus a été occlus.

La mélatonine du LCR est donc, au moins pour sa majeure partie, libérée directement dans le LCR dans le troisième ventricule par les pinéaloctes localisés en bordure de la glande pinéale ou à partir du liquide interstitiel de la glande pinéale, enrichi en MLT par les pinéaloctes plus profonds (Tricoire *et al.*, 2003a). Ce mécanisme spécifique de libération de la mélatonine dans le LCR permet aussi d'expliquer l'absence de corrélation entre individus entre les concentrations dans le sang et le LCR. En effet, dans le sang, les concentrations de mélatonine sont proportionnelles à la masse de la glande pinéale (et au nombre de pinéaloctes qu'elle contient), alors que dans le LCR, elles sont probablement en relation avec la surface de contact entre glande pinéale et recessus pinéalien.

LA MLT DU LCR A-T-ELLE UNE FONCTION PHYSIOLOGIQUE SPÉCIFIQUE PAR RAPPORT À CELLE DU SANG ?

La mélatonine agissant sur des structures cérébrales, souvent localisées à proximité des ventricules, pour induire la plupart de ses effets physiologiques, sa présence dans le LCR pourrait-elle constituer le signal premier pour ces différentes actions, parmi lesquelles figure le contrôle des différentes stratégies de reproduction ? Chez les ovins, animaux dits de « jours courts », la mélatonine stimule l'activité de reproduction si sa présence quotidienne dans le sang est de longue durée. Cet effet est observé plusieurs semaines après la modification de la durée de sécrétion de la mélatonine, c'est-à-dire après le passage en jours courts. À l'inverse, elle exerce un effet inhibiteur si la durée de sa présence est courte (Malpaux, 2006). Chez les ovins, la structure cible de la mélatonine, intervenant dans le contrôle de l'activité de reproduction, est l'hypothalamus pré-mamillaire (HPM), une structure bilatérale située à la base de l'encéphale, de part et d'autre du troisième ventricule. L'HPM est limité en avant par le récessus infundibulaire, en arrière par les corps mamillaires, dorsalement par les colonnes du fornix et ventralement par la base du cerveau (**figure 3**) (Malpaux *et al.* 1998). Cette région contient des récepteurs de la mélatonine (**figure 3**)

(Malpaux *et al.* 1998), de type 1 ou récepteurs oMT₁ (Mailliet *et al.* 2004; Migaud *et al.* 2005). Des micro-implants de MLT localisés dans cette région hypothalamique stimulent la sécrétion de LH, de la même manière que des implants périphériques libérant 200 fois plus de mélatonine. Un tel effet n'est observé dans aucune autre région hypothalamique (Malpaux *et al.* 1998). Chez le hamster Syrien, un rôle équivalent a été attribué à l'hypothalamus médio-basal, sur la base d'études de lésions et d'identification de récepteurs de la mélatonine dans cette région (Maywood & Hastings, 1995; Maywood *et al.*, 1996).

L'hypothalamus pré-mamillaire, s'étendant sur 3 à 4 mm de part et d'autre troisième ventricule, présente la particularité d'être en étroite relation avec lui. Du fait de son faible poids moléculaire (232g/mol) et de son hydrophobicité, la MLT pénétrerait facilement dans les tissus et les cellules. À la suite d'injections de mélatonine radiomarquée dans le LCR, celle-ci est retrouvée dans le tissu cérébral, ce qui suggère le passage de la

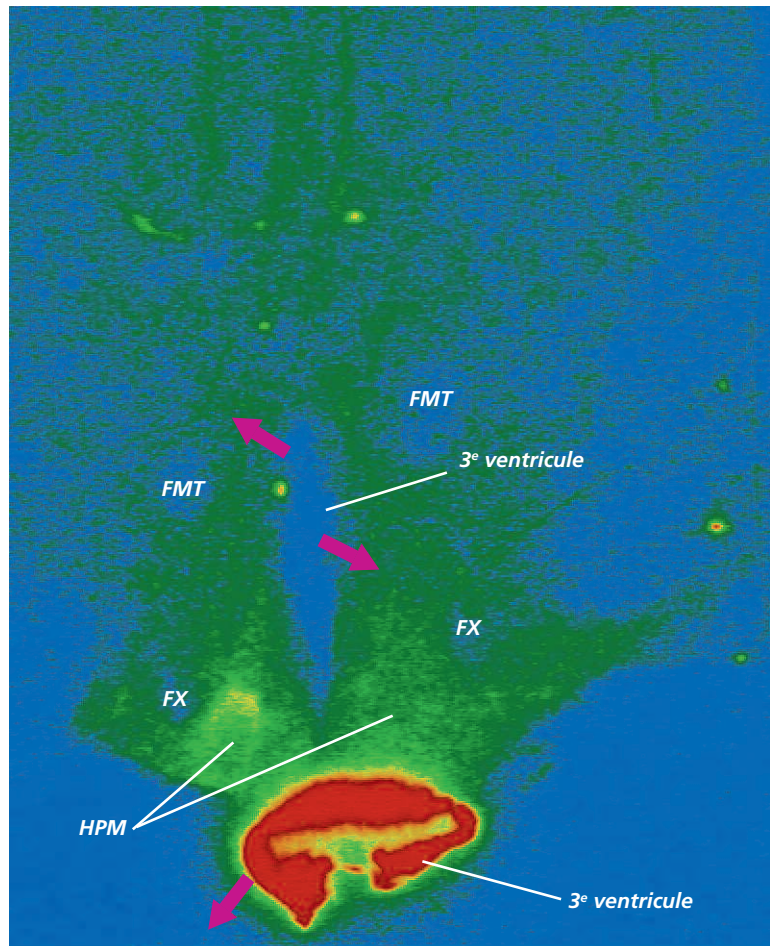


Figure 3 : Autoradiographie de coupes frontale d'hypothalamus ovin, incubées avec de la 2-¹²⁵I-MLT.

La liaison de 2-125I-MLT est retrouvée majoritairement dans la Pars tuberalis et l'HPM (hypothalamus pré-mamillaire). Du fait de l'étroite relation entre l'HPM et le 3^e ventricule et des propriétés de la MLT, la MLT pourrait pénétrer dans l'HPM à partir du LCR. (Fx, colonnes du fornix; FMT, faisceau mamillo-thalamique;

➡ : passage de la MLT du LCR vers l'HPM.

MLT native du LCR vers le tissu. (Anton-Tay & Wurtman, 1969; Anton-Tay *et al.* 1988; Vitte *et al.* 1988). La MLT est aussi capable de diffuser sur environ 800µm autour de micro-implants de MLT dans le cerveau et d'induire une réponse physiologique lorsque ces implants sont situés dans le troisième ventricule (Malpoux *et al.* 1998). Ce phénomène de diffusion simple de la MLT doit être cependant relativisé car ces implants contiennent des quantités très importantes de MLT.

L'ensemble de ces données suggère toutefois que la mélatonine est capable de pénétrer dans l'HPM à partir du liquide céphalo-rachidien. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié les concentrations tissulaires de MLT dans différentes situations physiologiques. Dans un premier temps, nous avons réalisé des dosages tissulaires de mélatonine chez des animaux abattus en fin de nuit, au moment où la libération de mélatonine est la plus élevée et en milieu de journée lorsque sa libération est la plus basse. Nous avons montré l'existence d'un gradient de concentrations de MLT avec des taux plus élevés dans les structures périventriculaires dont l'hypothalamus pré-mamillaire et plus faibles dans celles plus éloignées des ventricules, à la fois en fin de nuit et en milieu de jour. Ce gradient résulte bien de la diffusion de la MLT du LCR car, lorsque l'apport de mélatonine vers le cerveau se fait exclusivement par la voie sanguine, par exemple par perfusion de mélatonine dans le sang d'animaux exposés à la lumière, ce gradient n'est pas observé. De plus, les concentrations de mélatonine dans le tissu cérébral, mesurées chez les animaux abattus en fin de nuit, sont supérieures à celles observées à la suite de la perfusion par de la mélatonine exogène en milieu de journée. Ces résultats montrent donc que la mélatonine du LCR contribue de manière importante à l'augmentation des concentrations tissulaires de MLT, tout au moins dans les régions périventriculaires (Legros *et al.* 2005). Ces données ont récemment été complétées par des études de scintigraphie *in vivo* qui montrent un passage rapide, en quelques minutes, de la mélatonine marquée à l'iode 123 du LCR vers les tissus cérébraux.

La MLT du sang est suffisante pour induire une réponse à la photopériode mais celle du LCR semble indispensable pour que cette réponse se produise au moment attendu. Par exemple, lorsque

des brebis sont soumises en permanence à des jours longs inhibiteurs, elles extériorisent une activité sexuelle spontanée après environ 180 jours, devenant photoréfractaires. Des brebis dont les niveaux de MLT dans le LCR ont été réduits de 80 %, en obturant le récessus pinéalien (Tricoire *et al.* 2003b), expriment bien toujours l'ancestrus des jours longs mais l'apparition de l'état réfractaire est significativement retardé (216 vs 185 jours chez les témoins). Bien que les rôles respectifs de la mélatonine du sang et du LCR restent à analyser en détail, ces résultats suggèrent que la présence des taux élevés de MLT dans le LCR est nécessaire à l'obtention d'une réponse normale à la photopériode.

CONCLUSION

En conclusion, l'ensemble des données présentées dans cette revue suggère que le LCR peut constituer une voie de communication pour transporter la MLT de sa source vers ses cibles cérébrales. En effet, il existe un mécanisme spécifique de libération de la MLT dans le LCR, qui induit des concentrations de cette molécule beaucoup plus élevées que dans le sang. De plus, la MLT possède des cibles cérébrales, structures dans lesquelles l'augmentation nocturne des concentrations tissulaires dépend d'un apport de MLT par le LCR. Enfin, des études préliminaires suggèrent que la MLT du LCR est nécessaire pour obtenir une réponse normale à la photopériode. Le liquide céphalo-rachidien ne doit plus être considéré uniquement comme un simple moyen de protection du cerveau ou de véhicule pour les nutriments et les métabolites cérébraux, mais comme un réel moyen de communication qui permet la transmission de l'information entre plusieurs régions cérébrales pour induire une réponse physiologique. Considérer le LCR comme un compartiment liquidien de même importance que le sang revient à réévaluer toutes les données concernant les molécules circulant en parallèle dans ces deux circuits liquidien. En prenant l'exemple de la MLT, sur quelle concentration, celle du sang ou du LCR, doit-on se baser pour définir ce que l'on considère comme une dose physiologique et une dose pharmacologique ?

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N.J. 2004. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 45: 545–552.
- Anton-Tay, F., Forray, C., Ortega-Corona, B.G. 1988. Subneuronal fate of intracerebroventricularly injected ³H-melatonin. *J Pineal Res.* 5: 125–133.
- Anton-Tay, F. and Wurtman, R.J. 1969. Regional Uptake of 3H-Melatonin from Blood or Cerebrospinal Fluid by Rat Brain. *nature* 221: 474–475.
- Coon, S.L., Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Ravault, J.P., Bodin, L., Voisin, P., Weller, J.L., Klein, D.C., Chemineau, P. 1999. Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. *Am J Physiol.* 277: E792–797.
- Evans, C.A., Reynolds, J.M., Reynolds, M.L., Saunders, N.R., Segal, M.B. 1974. The development of a blood-brain barrier mechanism in foetal sheep. *J Physiol.* 238: 371–386.
- Hoistad, M., Samskog, J., Jacobsen, K.X., Olsson, A., Hansson, H.A., Brodin, E., Fuxe, K. 2005. Detection of beta-endorphin in the cerebrospinal fluid after intrastriatal microinjection into the rat brain. *Brain Res.* 1041: 167–180.
- Jakoubek, B. 1976. Topographical differences of RNA labelling in rat brain after intraventricular administration of labelled RNA precursors. *Cell Tissue Res.* 166: 125–133.
- Kanematsu, N., Mori, Y., Hayashi, S., Hoshino, K. 1989. Presence of a distinct 24-hour melatonin rhythm in the ventricular cerebrospinal fluid of the goat. *J Pineal Res.* 7: 143–152.
- Legros, C., Bernard, S., Chesneau, D., Malpoux, B. 2005. Melatonin Diffusion from the Cerebrospinal Fluid into the Cerebral Tissue. In *Proceedings of the Xth Congress of the EPBRS*, 1–5 septembre 2005, Frankfurt/Main. Abstract poster n°60.
- Longatti, P., Perin, A., Rizzo, V., Comai, S., Bertazzo, A., Allegri, G. 2004. Endoscopic selective sampling of human ventricular CSF: a new perspective. *Minim Invasive Neurosurg.* 47: 350–354.
- Mailliet, F., Audinot, V., Malpoux, B., Bonnaud, A., Delagrangé, P., Migaud, M., Barrett, P., Viaud-Massuard, M.C., Lesieur, D., Lefoulon, F., Renard, P., Boutin, J.A. 2004. Molecular pharmacology of the ovine melatonin receptor: comparison with recombinant human MT1 and MT2 receptors. *Biochem Pharmacol.* 67: 667–677.
- Malpoux, B., 2006. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In *Knobil & Neill's physiology of reproduction*, 3rd Ed, (ed. J.D. Neill), Chapter 41, pp.:2231–2281, Elsevier.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., Chemineau, P. 1998. Evidence that melatonin acts in the pre-mammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139: 1508–1516.
- Malpoux, B., Tricoire, H., Mailliet, F., Daveau, A., Migaud, M., Skinner, D.C., Pelletier, J., Chemineau, P. 2002. Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. *Reprod. Suppl.* 59: 167–79.
- Maurizi, C.P. 2003. The puzzle of where cerebrospinal fluid is absorbed: new pieces. *Med Hypotheses* 60: 102–103.
- Maywood, E.S., Bittman, E.L., Hastings, M.H. 1996. Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod.* 54: 470–477.
- Maywood, E.S., Hastings, M.H. 1995. Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 136: 144–153.
- Migaud, M., Daveau, A., Malpoux, B. 2005. MTRN1A Melatonin Receptors in the Ovine Pre-Mammillary Hypothalamus: Day-Night Variation in the Expression of the Transcripts. *Biol Reprod.* 72: 393–398.
- Nilsson, C., Lindvall-Axelsson, M., Owman, C. 1992. Neuroendocrine regulatory mechanisms in the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Brain Res Brain Res Rev.* 17: 109–138.
- Perlow, M.J., Reppert, S.M., Boyar, R.M., Klein, D.C. 1981. Daily rhythms in cortisol and melatonin in primate cerebrospinal fluid. Effects of constant light and dark. *Neuroendocrinology* 32: 193–196.
- Proescholdt, M.G., Hutto, B., Brady, L.S., Herkenham, M. 2000. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [¹⁴C]inulin in rat. *Neuroscience* 95: 577–592.
- Rollag, M.D., Morgan, R.J., Niswender, G.D. 1978. Route of melatonin secretion in sheep. *Endocrinology* 102:1–8.
- Skinner, D.C., Malpoux, B. 1999. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140: 4399–4405.
- Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., Malpoux, B. 2002. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143: 84–90.
- Tricoire, H., Malpoux, B., Moller, M. 2003a. Cellular lining of the sheep pineal recess studied by light-, transmission-, and scanning electron microscopy: morphologic indications for a direct secretion of melatonin from the pineal gland to the cerebrospinal fluid. *J Comp Neurol.* 456: 39–47.
- Tricoire, H., Moller, M., Chemineau, P., Malpoux, B. 2003b. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod. Suppl.* 61: 311–321.
- Vitte, P.A., Harthe, C., Lestage, P., Claustrat, B., Bobillier, P. 1988. Plasma, cerebrospinal fluid, and brain distribution of ¹⁴C-melatonin in rat: a biochemical and autoradiographic study. *J Pineal Res.* 5: 437–543.
- Withyachumarnkul, B., Knigge, K.M. 1980. Melatonin concentration in cerebrospinal fluid, peripheral plasma and plasma of the confluens sinuum of the rat. *Neuroendocrinology* 30: 382–388.
- Wood, J.H. 1982. Neuroendocrinology of cerebrospinal fluid: peptides, steroids, and other hormones. *Neurosurgery* 11: 293–305.
- Yuan, X., Desiderio, D.M. 2005. Proteomics analysis of pre-fractionated human lumbar cerebrospinal fluid. *Proteomics* 5: 541–550.
- Zarazaga, L.A., Malpoux, B., Bodin, L., Chemineau, P. 1998. The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *Am J Physiol.* 274: E607–610.