

# Les mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne

**Nicolas Cermakian  
Paolo Sassone-Corsi**

N. Cermakian, P. Sassone-Corsi : Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Cnrs, Inserm ULP, BP 163, 67404 Illkirch-Strasbourg, France.

► Tout être vivant possède une horloge circadienne, nécessaire à la régulation d'une multitude de systèmes physiologiques. L'horloge centrale des mammifères est située dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus antérieur. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'établissement et au maintien des rythmes biologiques commencent depuis peu à être élucidés. Chez tous les organismes étudiés, ces mécanismes reposent sur des boucles d'autorégulation négative et impliquent l'expression de facteurs de l'horloge, qui répriment leur propre transcription lorsqu'ils atteignent des taux d'expression critiques. En outre, de nouveaux travaux concernent l'étude d'horloges périphériques qui semblent exister dans divers tissus, voire diverses cellules indépendantes, ainsi que la recherche des photorécepteurs impliqués dans la réception des signaux provenant de l'environnement. ◀

**N**otre horloge biologique, bien que discrète, fonctionne en permanence et affecte mille et un aspects de notre physiologie et de notre vie quotidienne. Ainsi, le décalage horaire ressenti après un long voyage, le médicament dont la prise est prescrite le matin, le réveil matinal qui intervient même si l'heure du coucher est tardive, ou les troubles chroniques de sommeil, sont des manifestations de cette horloge omniprésente dans nos vies. Cependant, l'étude des rythmes biologiques chez les animaux et chez l'homme ne date que de la deuxième moitié de ce siècle, avec les travaux des pionniers Jurgen Aschoff et Colin Pittendrigh, qui ont permis de jeter les bases de la chronobiologie. Auparavant, seuls les botanistes s'étaient consacrés à l'étude des rythmes biologiques. Ainsi en 1729, l'astronome français d'Ortous de Mairan remarquait que les feuilles d'une héliotrope s'ouvraient et se fermaient en suivant le rythme du jour et de la nuit. Cent ans plus tard, Augustin de Candolle montrait que ces rythmes circadiens (de *circa diem*, « environ un jour » en latin) persistaient en obscurité constante et sont donc indépendants de l'alternance jour-nuit [1].

## Les horloges centrales

Chez les bactéries, les champignons et les animaux, une multitude de phénomènes dépendent également des rythmes circadiens. Chez l'animal, l'horloge est localisée dans des régions spécifiques du système nerveux central. Chez les oiseaux, les reptiles et les poissons, l'épiphyse (ou glande pinéale), une petite glande située au sommet du cerveau, reçoit directement la lumière, produit des rythmes circadiens et sécrète des hormones de façon rythmique. Il s'agit donc du fameux « troisième œil », puisque chez ces animaux, la réception de la lumière n'est pas l'apanage des yeux. Il y a plus de trois siècles et demi, René Descartes avait déjà réalisé l'importance de l'épiphyse dans les rythmes biologiques, et voyait en elle un lien entre les signaux lumineux reçus par les yeux et les divers phénomènes physiologiques influencés par ces signaux. Descartes postulait que cet organe est le point de contact, ou l'intermédiaire entre la pensée et le corps.

Chez les mammifères, la situation est un peu plus complexe. La glande pinéale synthétise l'hormone mélatonine de façon rythmique, mais ne constitue pas elle-même une horloge, puisqu'elle dépend d'autres structures

pour produire ces oscillations [2]. L'horloge centrale est localisée dans le noyau suprachiasmatique (NSC) qui se trouve dans la partie antérieure de l'hypothalamus (figure 1) [3]. Le NSC produit plusieurs neuropeptides de manière circadienne et envoie des signaux oscillants à la glande pinéale.

Ces horloges physiologiques fonctionnent également en conditions constantes [1]. Ainsi, même si un individu est maintenu dans un environnement dépourvu d'indications temporelles et sans changement de lumière, ses rythmes physiologiques seront maintenus. Le NSC constitue

une horloge autonome et peut remplir son rôle sans apports extérieurs, ce qui explique la persistance des rythmes biologiques. Différents synchroniseurs, dont l'alternance jour-nuit chez la plupart des animaux et des facteurs de nature socio-écologique chez l'homme, pourront cependant influencer l'horloge du NSC, en ajustant sa période exactement à la longueur du jour ou en changeant sa phase pour la synchroniser avec un nouvel environnement, par exemple en cas de décalage horaire (pour une définition de la période ainsi que d'autres caractéristiques des rythmes, se référer à l'encadré ci-contre) [1].

Le rôle central du NSC dans la production des rythmes circadiens [4] a pu être défini grâce à plusieurs approches expérimentales. Après une ablation chirurgicale du NSC, des hamsters perdent leurs rythmes d'activité locomotrice, mesurés grâce à un système de cages avec roue, dont le mouvement est suivi par ordinateur (on obtient ainsi un schéma appelé « actogramme » ; figure 2). Ces animaux n'arrivent pas à appréhender le passage du temps et courent sur leur roue de façon arythmique. Ce traitement affecte aussi d'autres rythmes physiologiques circadiens, tels que ceux de l'absorption de nourriture, de la température corporelle et de la sécrétion de diverses hormones. La seule façon de rétablir une rythmicité chez ces animaux est de leur greffer un NSC. Dans ce cas, les rythmes ainsi acquis ont les propriétés du donneur de la greffe, et non celles du receveur. Par ailleurs, chez le rat, une stimulation électrique ou pharmacologique du NSC provoque un changement dans la phase des rythmes de ces animaux.

Le NSC est composé d'un groupe compact de quelques milliers de neurones. Lorsque ces cellules sont dispersées en culture, elles retiennent leur capacité de produire des rythmes circadiens, qui déterminent par exemple la synthèse rythmique de neurotrophines et l'utilisation du glucose [5]. Des observations similaires ont été faites sur des cellules d'horloge de poulet et de *Bulla* (un escargot marin utilisé en neurophysiologie), ainsi que chez des organismes unicellulaires possédant une horloge, tels que le champignon *Neurospora crassa* et certaines bactéries. Cette

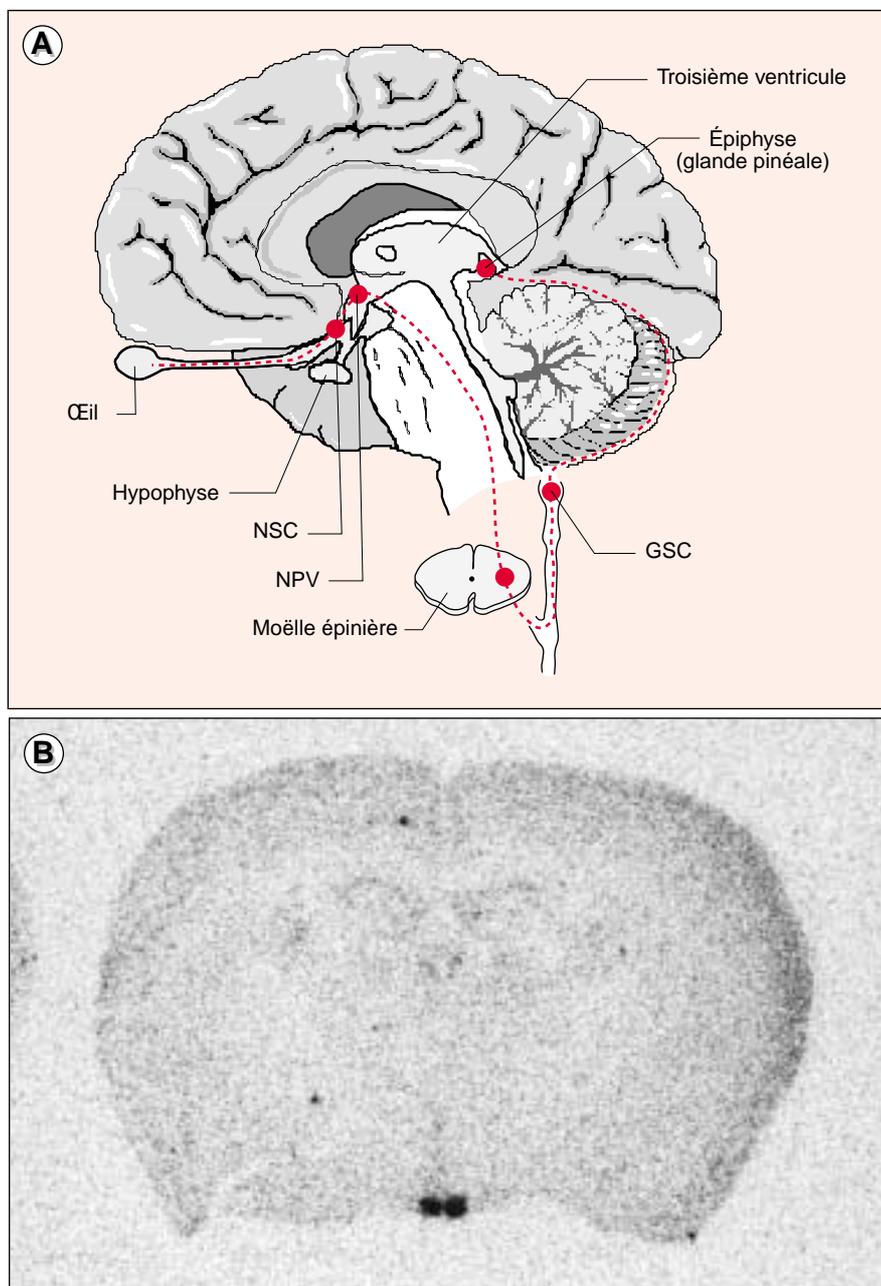
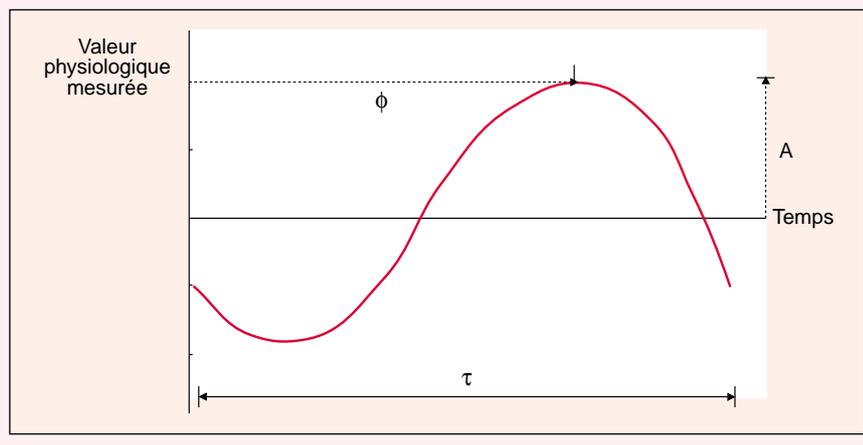


Figure 1. **Le système circadien.** **A.** Schéma anatomique montrant la position du noyau suprachiasmatique (NSC) dans l'hypothalamus et le cerveau, ainsi que de l'axe rétino-hypothalamique et la glande pinéale. **B.** Analyse de l'expression du gène codant pour le peptide VIP sur une coupe de cerveau de souris. Dans le cerveau, VIP est exprimé spécifiquement au niveau du NSC et peut donc servir de marqueur pour cette structure. NPV: noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; GSC: ganglion cervical supérieur.

### Quelques caractéristiques fondamentales des rythmes biologiques

Différents termes sont utilisés pour décrire précisément certaines caractéristiques des rythmes biologiques. La **période** ( $\tau$ ) est la durée d'un cycle, c'est-à-dire le temps écoulé pour que les paramètres mesurés reviennent à leur point de départ (par exemple entre deux maximums). Ainsi, la période des rythmes circadiens est d'environ 24 heures. Il existe aussi des rythmes physiologiques de période plus courte, dits *ultradiens* (retrouvés par exemple chez les nourrissons et au cours de divers phénomènes rythmiques dans le cerveau), et des rythmes dont la période est au-delà de 24 heures, dits *infra-diens* (ainsi les rythmes *circannuels*, de la longueur d'une année). La **phase** ( $\Phi$ ) du rythme indique sa relation dans le temps avec un phénomène ou un autre cycle. Ainsi, lors d'un décalage horaire consécutif à un voyage, la phase de notre horloge et de nos rythmes internes n'est plus la même que la phase des phénomènes de notre environnement. Les rythmes internes et externes sont décalés. Enfin, l'**amplitude** (**A**) du rythme correspond aux variations par rapport au niveau moyen.



observation est essentielle, puisqu'elle démontre que la qualité d'horloge est intrinsèque à ces cellules. Par conséquent, il est clair que tous les éléments nécessaires au fonctionnement d'une horloge biologique circadienne peuvent être contenus dans une seule cellule, et que ces horloges sont donc composées de molécules. Les rythmes sont produits par l'expression de certains gènes ainsi que par l'abondance et l'activité de certaines protéines dont la présence varie dans ces cellules. Quels sont donc ces gènes, véritables engrenages des horloges moléculaires, et comment permettent-ils l'établissement des rythmes ?

#### **Les gènes de l'horloge**

La nature des mécanismes moléculaires impliqués dans le fonctionnement des horloges fut d'abord explorée par la recherche de mutants génétiques. Un exemple classique est

celui du mutant *tau* chez le hamster, isolé dans le laboratoire de Michael Menaker [6]. Les animaux hétérozygotes pour cette mutation présentent des rythmes d'activité ayant une période de seulement 22 heures, alors que les homozygotes ont une période de 20 heures. Malheureusement, par rapport à la souris ou à l'homme, les études génétiques et génomiques demeurent peu développées chez le hamster, et ces limitations n'ont pas permis une analyse moléculaire approfondie de ce mutant. Les organismes unicellulaires se prêtent plus facilement aux études génétiques. Ainsi, chez *Neurospora*, l'horloge endogène est responsable de la synchronisation circadienne des cycles de sporulation asexuée (conidiation) [7]. L'isolement de champignons chez lesquels le rythme de conidiation est supprimé a permis la découverte de la mutation du gène *frequency* (*frq*). Ce dernier est essen-

tiel pour le maintien des rythmes biologiques de *Neurospora*. La transcription du gène *frq* a lieu de façon rythmique, sous le contrôle de la protéine WC-2 (codée par le gène *white-collar-2* ou *wc-2*). La protéine FRQ exerce un rétrocontrôle sur la transcription du gène *frq* par un mécanisme inconnu, refermant ainsi une boucle qui permet l'établissement des rythmes circadiens du champignon. Ces rythmes sont sensibles à la température et à la lumière. La protéine WC-1, semblable à WC-2, semble nécessaire pour réagir à la lumière et affecter l'horloge. Nous allons voir que, chez les animaux, si les acteurs qui régissent l'horloge sont différents, le scénario est similaire.

Les premières recherches concernant l'horloge moléculaire ont été réalisées chez la drosophile. Le premier gène de l'horloge isolé a été appelé *period* (*per*) [8], pour lequel différentes mutations ont été identifiées. Certaines provoquent un raccourcissement ou une elongation de la période des rythmes de l'animal, tandis que d'autres, plus sévères, abolissent la rythmicité. Le gène *per* est exprimé de façon cyclique: au cours d'un cycle de 12 heures de lumière et de 12 heures d'obscurité, les mouches produisent très peu d'ARN messager de *per* au début de la période claire, puis cet ARN est à de très hauts niveaux au début de la nuit. PER, la protéine codée par le gène *per*, contient un domaine appelé PAS, qui a été mis en évidence chez différentes protéines. Cette région semble importante pour la liaison entre deux protéines [9].

Quelques années plus tard, toujours chez la drosophile, le gène *timeless* (*tim*) a été identifié [10, 11]. L'expression de *tim* oscille de manière similaire à celle de *per*. L'absence de protéine TIM abolit les rythmes de *per*, et *vice versa*. La protéine TIM ne possède pas de domaine PAS. Cependant, lorsque l'expression de PER et de TIM est suffisamment élevée dans le cytoplasme, ces deux protéines s'associent et sont alors transférées dans le noyau, où elles inhibent l'expression de leurs propres gènes. Cette boucle d'autorégulation négative est le fondement des rythmes d'expression de ces gènes et des rythmes physiologiques chez la drosophile (*figure 3*): la transcription des

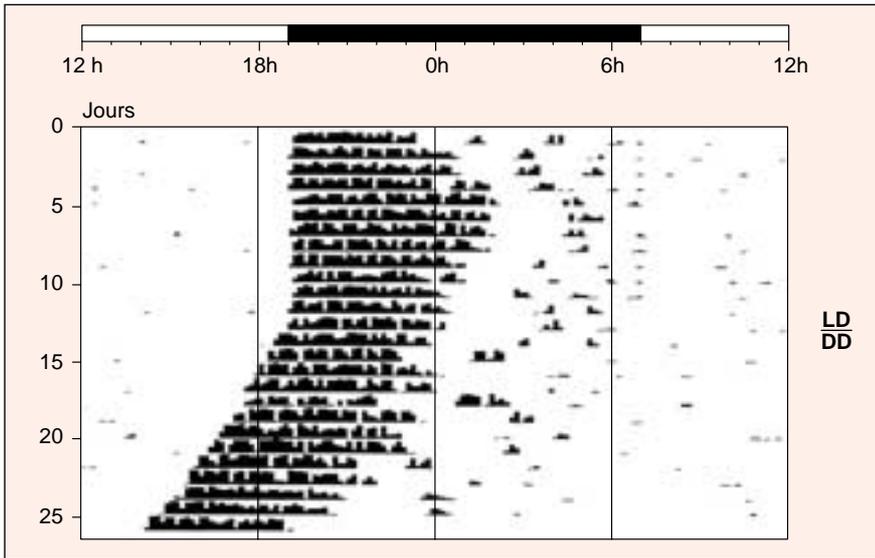


Figure 2. **Exemple d'actogramme d'une souris normale.** En haut, les parties noire et blanches de la barre représentent respectivement les périodes de lumière et d'obscurité. Les tracés noirs sont les moments d'activité. Chaque ligne symbolise un jour. La souris est d'abord entraînée par un cycle lumière-obscurité 12h-12h (LD) pendant 10 jours (les lumières s'allumant à 7 heures et s'éteignant à 19 heures). Puis elle est plongée dans l'obscurité constante (DD). La période n'est alors plus tout à fait de 24 heures (période en libre cours), et la période d'activité avance donc de quelques minutes chaque jour, ce qui explique que le tracé dévie vers la gauche (la période en libre cours de cette souris-ci est de 23h40). Il est à noter que les souris ou les hamsters étant des animaux nocturnes, ils sont actifs pendant la période obscure. L'actogramme d'une souris mutante pour un gène de l'horloge présenterait une période différente en DD (donc le tracé dévierait plus vers la droite ou alors vers la gauche) ou même une arythmicité (donc un tracé incohérent, sans période évidente).

gènes *per* et *tim* conduit à une augmentation de l'expression des protéines PER et TIM, qui contribue à son tour à la diminution de l'expression de leurs gènes. L'association de PER et de TIM ainsi que leur entrée dans le noyau sont influencées par la lumière. Il existe donc un lien entre l'horloge moléculaire et les stimulus extérieurs. L'action concertée de protéines sur l'expression génique est au cœur de la notion d'horloges biologiques [12], comme nous y reviendrons plus loin.

L'isolement de mutants est une approche assez directe et efficace chez les champignons ou la drosophile, mais il en va tout autrement chez la souris, où un criblage génétique se révèle un travail de longue haleine. Cette approche ne s'est révélée fructueuse que dans un seul cas, celui du gène appelé tout simplement *Clock*, isolé et séquencé par le groupe de Joseph Takahashi [13]. Les animaux portant la mutation *clock*

présentent un actogramme anormal. En effet, lorsque les souris sont plongées dans l'obscurité constante, l'alternance de leurs moments de repos et d'activité perd rapidement toute rythmicité. L'analyse de la protéine CLOCK correspondante a révélé qu'elle possédait, tout comme PER, un domaine PAS. De plus, elle contient un domaine basique et un domaine hélice-boucle-hélice (bHLH, pour *basic helix-loop-helix*), capable de se lier à l'ADN. Cette particularité, ainsi que d'autres considérations structurales, ont permis de suggérer que CLOCK est un facteur de transcription. Les gènes équivalents à *Clock* ont pu être identifiés chez d'autres organismes, en particulier chez la drosophile [14], à partir de la séquence du gène *Clock* de la souris. De façon réciproque, des homologues des gènes *per* et *tim* de la drosophile ont été identifiés chez la souris [15-18] (il existe en fait chez la souris non pas un, mais trois gènes *per*, appelés *Per1*, 2 et 3 [19]). Par la suite, des travaux réalisés en parallèle chez ces deux organismes ont montré que CLOCK stimule l'expression du gène *per*, en reconnaissant une séquence dans la région du promoteur [20], de manière analogue à l'action de WC-2 sur le gène de *frq* chez *Neurospora* (voir plus haut).

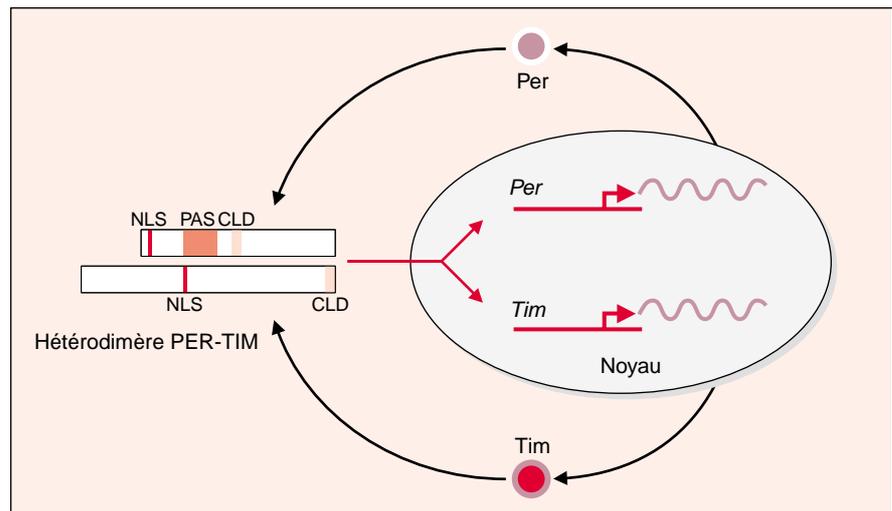


Figure 3. **La régulation interdépendante de PER et TIM chez la drosophile.** Ces deux protéines sont co-exprimées dans les neurones et elles interagissent ensemble. Cette association leur permet d'entrer dans le noyau où elles inhibent de concert la transcription de leur propre gène, ce qui fait chuter la quantité de ces protéines dans la cellule. Il est à noter que ce schéma est une simplification de la situation réelle. Les éléments s'ajoutant à cette boucle simple seront décrits plus loin dans le texte.

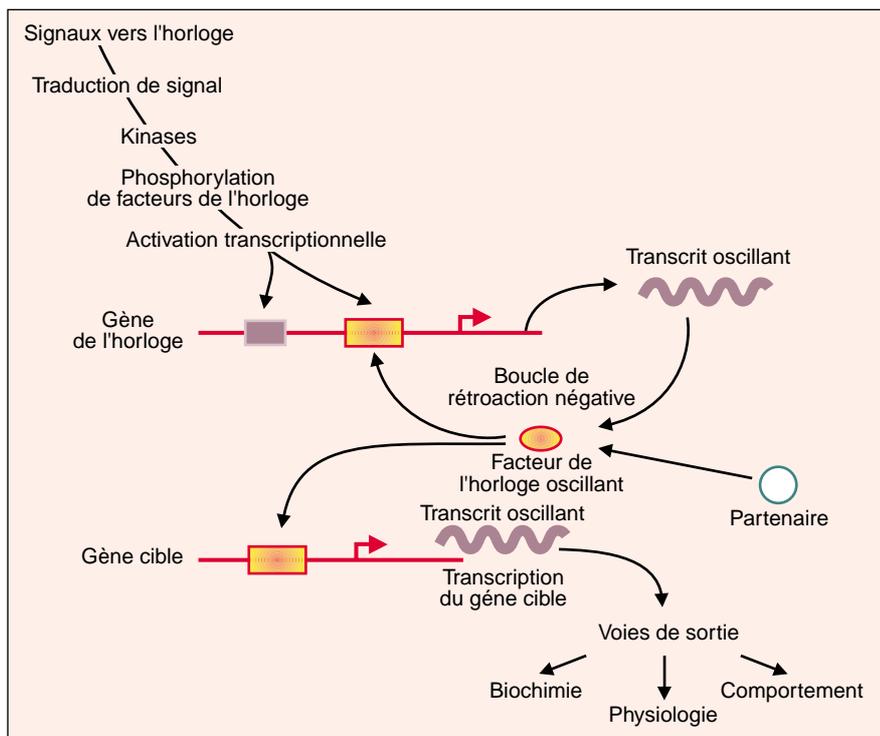


Figure 4. **Les boucles autorégulatrices sont un thème récurrent dans les horloges moléculaires de différents organismes vivants.** Des facteurs de l'horloge se lient au promoteur de leur gène (ou influencent la liaison d'autres protéines à leur promoteur) refermant ainsi une boucle de régulation négative en réprimant leur transcription. Le même facteur de l'horloge peut aussi moduler le promoteur d'autres gènes, appelés gènes cibles, permettant l'expression rythmique des protéines correspondantes. D'autres protéines peuvent être impliquées dans cette boucle, dans l'interprétation des signaux extérieurs (voies d'entrée dans l'horloge) et dans la régulation des gènes cibles et des phénomènes dirigés par l'horloge (voies de sortie).

Chez le mutant du gène *Clock*, le taux d'expression de *per* reste très faible [21]. Il n'est pas encore clairement établi si les protéines PER et TIM fonctionnent de la même façon chez la souris et chez la drosophile. Selon certains auteurs, les interactions entre les trois PER murins ont le même rôle que l'interaction PER-TIM chez la drosophile [17], alors que, selon d'autres travaux, le TIM murin est impliqué dans la boucle de rétroaction négative de l'horloge, d'une façon similaire à son homologue chez la drosophile [18]. Par ailleurs, CLOCK n'exerce pas seul son rôle d'activateur de la transcription. Ainsi que la présence de son domaine PAS le suggère, il peut (et doit) se lier à un autre facteur, appelé BMAL1, une protéine possédant également des domaines bHLH-PAS. Le dimère CLOCK-BMAL1 se lie au gène *per*

ainsi qu'à d'autres gènes dont l'expression oscille [20]. Ainsi, PER et TIM exerceraient leur effet négatif sur le dimère CLOCK-BMAL1, en se liant à ces activateurs et en diminuant ainsi leur liaison à l'ADN [22]. De plus, certaines études chez la drosophile suggèrent que PER et TIM ont un effet positif sur l'expression du gène *Clock*, ajoutant donc une boucle supplémentaire au mécanisme moléculaire de l'horloge [23, 24]. Ce survol du fonctionnement des horloges moléculaires chez différents organismes fait clairement apparaître des points communs [12] (figure 4). Tout d'abord, plusieurs des gènes de l'horloge codent pour des facteurs de transcription. Cette particularité n'est pas étonnante. En effet, la bonne marche de ces oscillateurs reposant sur l'expression rythmique de gènes, celle-ci doit être produite et modulée

par des facteurs qui influent sur la transcription. En deuxième lieu, plusieurs protéines impliquées dans ces horloges possèdent un domaine PAS, souvent proche d'un domaine bHLH, qui permettent à ces protéines d'interagir et de se lier à l'ADN de façon forte et spécifique. Enfin et surtout, retenons que les rythmes produits par les horloges circadiennes sont dus à des boucles d'autorégulation négatives: des protéines sont exprimées et viennent réprimer la transcription de leur propre gène lorsqu'elles atteignent un certain seuil d'expression dans la cellule. Les oscillateurs centraux (par exemple celui du NSC) ne sont pas les seuls à reposer sur de telles boucles. Des études menées dans notre laboratoire ont démontré la participation du facteur de transcription CREM dans la production rythmique de l'hormone mélatonine par la glande pinéale [2]. Une forme tronquée de CREM, appelée ICER (*inducible cAMP early repressor*), est impliquée dans ce processus. Le facteur ICER est un puissant inhibiteur de la transcription. Il est exprimé dans la glande pinéale et inhibe l'expression de son propre gène lorsque le taux d'expression dans la cellule est élevé. De plus, ICER module l'expression du gène codant pour l'arylalkylamine N-acétyltransférase ou NAT, l'enzyme limitante dans la voie de synthèse de la mélatonine [25]. Les horloges circadiennes regroupent en fait trois composantes conceptuelles [12] (figure 5): (1) l'oscillateur proprement dit, qui peut fonctionner de façon autonome; (2) des voies d'entrée qui relient l'oscillateur à l'environnement (par exemple le cycle jour-nuit via l'axe rétino-hypothalamique; figure 1A); (3) des voies de sortie, par lesquelles l'oscillateur dirige le fonctionnement circadien de diverses fonctions physiologiques (un exemple est la glande pinéale, dont les rythmes de synthèse de mélatonine sont gouvernés en premier lieu par le NSC).

## Directions futures

### De nouveaux gènes de l'horloge ?

Il y a à peine un ou deux ans, il était tentant d'avancer que toutes les composantes de l'horloge circadienne étaient connues, et que l'existence

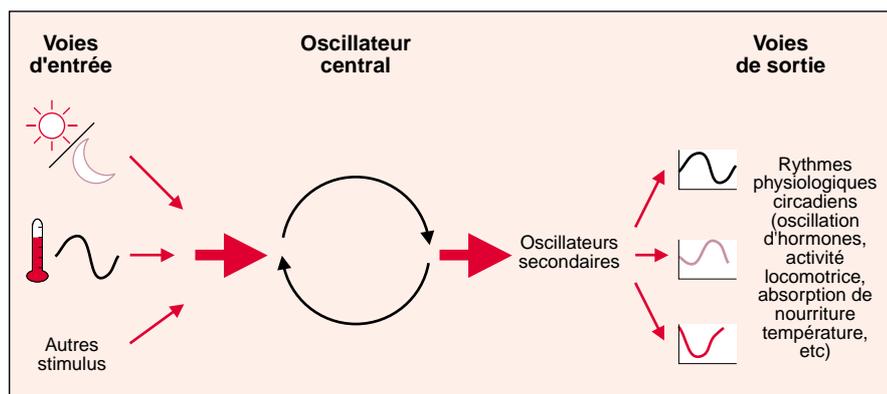


Figure 5. **Les composantes conceptuelles de base des horloges moléculaires.** L'oscillateur (l'horloge proprement dite, qui peut fonctionner de façon autonome) reçoit des signaux des voies d'entrée, ce qui lui permet de réagir aux conditions extérieures. En contrepartie, l'oscillateur dirige divers phénomènes physiologiques via les voies de sortie.

d'une boucle autorégulatrice pouvait assez bien expliquer le phénomène. Cependant, une question importante demeurait. En effet, un mécanisme moléculaire fondé sur l'existence de boucles autorégulatrices et l'expression oscillante de gènes ne peut pas expliquer à lui seul comment les horloges peuvent fonctionner selon une période d'environ 24 heures. Comment l'organisme arrive-t-il à moduler ce facteur temps ? Un premier mécanisme consiste à apporter des modifications chimiques aux acteurs en présence, et à affecter ainsi leur stabilité ou leur activité. Une autre alternative est de faire varier la disponibilité de ces molécules. L'existence de ces deux mécanismes, mettant en jeu un ou plusieurs nouveaux gènes de l'horloge ont été récemment mis en évidence.

Tout d'abord, l'isolement d'un nouveau mutant de la drosophile a permis d'identifier une nouvelle kinase, similaire à la caséine kinase chez les mammifères [26]. Cette enzyme de la drosophile, appelée *doubletime* (DBT), peut phosphoryler la protéine PER et diminuer ainsi sa stabilité (*m/s* 1998, n°10, p. 1117). En effet, chez les mouches dont le gène de DBT est inactivé, les taux d'expression de PER sont très élevés et la protéine est peu phosphorylée.

La deuxième illustration des mécanismes proposés concerne le cas des cryptochromes. Ces molécules ressemblent à d'autres protéines photoréceptrices. Les cryptochromes ont initialement été décrits comme des récepteurs de la lumière pour l'hor-

loge circadienne. Or, il apparaît que ces protéines ont un autre rôle et font partie intégrante de la boucle autorégulatrice impliquant PER et TIM. Ce sont donc des constituants à part entière de l'horloge du moins chez la souris [27]. Cependant, de manière surprenante, leur rôle semble différent, voire opposé, chez la drosophile et chez la souris. Chez la première, la protéine CRY séquestre TIM (de façon dépendante de la lumière), et empêche donc cette protéine de refermer la boucle en compagnie de PER [28]. Chez les mammifères, il existe deux cryptochromes, CRY1 et CRY2, qui aideraient les PER à pénétrer dans le noyau des cellules de l'horloge, facilitant ainsi l'action négative de ces protéines sur leur propre expression, probablement *via* une interaction à la fois avec les PER et les activateurs CLOCK et BMAL1 [29].

Par ailleurs, de nouveaux gènes se voient attribuer des rôles dans les voies de sorties de l'horloge centrale. Une étude récente rapporte l'isolement d'un mutant pour le neuropeptide PDF (*pigment-dispersing factor*) de la drosophile et démontre l'importance de ce peptide pour le signal circadien émanant des neurones servant d'horloge centrale à ces insectes [30]. Un autre groupe a pour sa part isolé un gène contrôlé par l'horloge, *vriille*, dont le produit est un facteur de transcription. A leur grande surprise, cependant, *vriille* n'est pas seulement important pour des fonctions en aval de l'horloge, mais affecte également la fonction de l'horloge elle-même [31].

Il y a fort à parier que d'autres composantes de l'horloge seront découvertes dans les années à venir. Il est probable que ces molécules soient découvertes grâce à des criblages génétiques, bien sûr, mais aussi par d'autres techniques moléculaires comme le système double hybride dans la levure (pour isoler des partenaires de protéines de l'horloge déjà connues).

### Autant d'horloges que de cellules ?

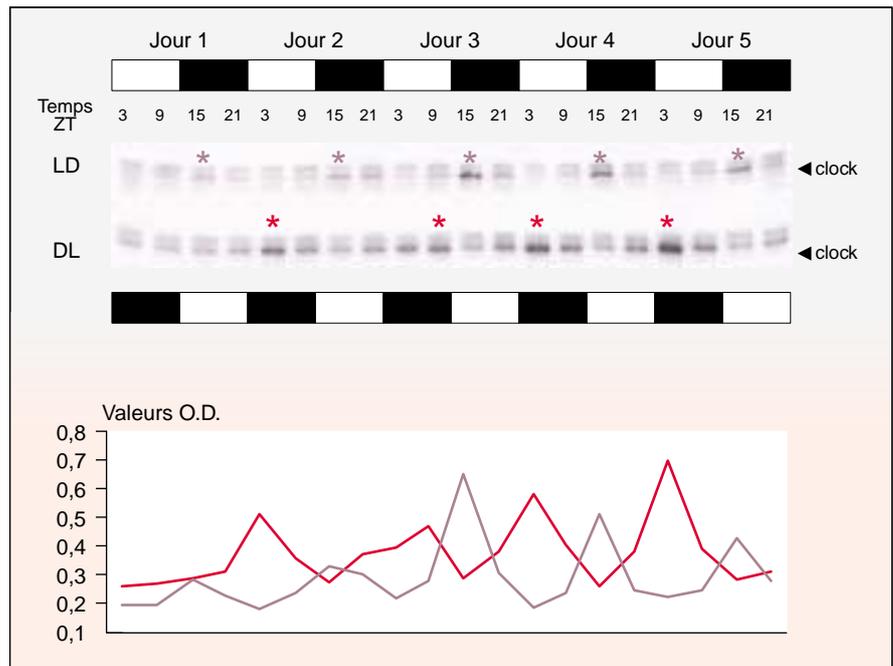
D'autres découvertes sont prévisibles, si l'on en croit le débat inattendu qui a débuté tout récemment. Comme nous l'avons vu, il était généralement admis qu'une ou au plus quelques horloges centrales, situées dans le système nerveux central de l'animal, étaient à l'origine des rythmes circadiens et dirigeaient tous les phénomènes rythmiques de l'organisme. Or, cette vision fut remise en question en 1997 lorsque des chercheurs ont créé une lignée de drosophiles transgéniques exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur du gène *period* [32]. Ces mouches « fluorescentes » émettent de la lumière, et cette émission oscille de façon circadienne. Or, cette oscillation persiste dans des tissus tels que les antennes, les pattes ou les ailes, même lorsque ceux-ci sont mis en culture, séparés du reste du corps de l'insecte ! Ces résultats démontrent donc que différents tissus peuvent agir indépendamment comme des horloges à part entière. En 1998, notre groupe montrait que ces caractéristiques sont également observables chez les vertébrés. En effet, chez les poissons-zèbres, l'expression du gène homologue au gène *Clock* de la souris oscille de façon circadienne, et ce dans presque tous les tissus. Mais il y a plus étonnant : lorsque certains organes comme le cœur et le rein sont mis en culture, séparés du reste du corps, ils continuent à entretenir des rythmes circadiens pendant plusieurs jours, même en conditions constantes [33] ! Ces observations ont depuis été étendues à de simples cellules en culture [34], ramenant ainsi le concept même d'horloge au niveau cellulaire, selon un processus décrit pour les neurones du NSC. Ces résultats sont d'ailleurs étayés par des travaux plus récents démontrant que deux partenaires de CLOCK chez le

poisson-zèbre, BMAL1 et BMAL2, oscillent de façon différente d'un tissu à l'autre: des oscillateurs indépendants semblent donc exister dans différents tissus, et seraient réglés de façon différentielle [30]. Certains indices laissent penser qu'il en va de même chez les mammifères, bien que le phénomène n'ait pas été démontré. Les gènes de l'horloge sont exprimés en dehors du NSC, parfois de façon rythmique ainsi que dans des fibroblastes en culture, à la suite d'un choc avec du sérum [36]. De plus, la destruction du NSC de rats n'entraîne pas l'abolition de tous les rythmes circadiens. Par ailleurs, en dehors du système nerveux, il est établi que la rétine fonctionne comme une horloge [37].

Quelle est l'importance physiologique de ces horloges périphériques? Ont-elles un rôle dans l'organisme, autrement dit fonctionnent-elles vraiment indépendamment des horloges dites centrales? A l'inverse, fonctionnent-elles comme de simples oscillateurs coordonnés et dirigés par ces horloges centrales? A l'heure actuelle, le débat reste ouvert, et il est probable que la réponse soit intermédiaire: ces horloges jouent un rôle dans des phénomènes propres à ces tissus périphériques, mais sont intégrées à l'ensemble de la physiologie via des signaux venant d'oscillateurs centraux. Leur rôle essentiel a très récemment été démontré dans le cas du système olfactif de la drosophile. En effet, les mouches répondent différemment aux odeurs selon l'heure de la journée. Or, chez les drosophiles mutantes ne possédant qu'une horloge centrale en état de marche (et pas d'horloges dans les autres tissus), les capacités olfactives ne présentent plus d'oscillation [38].

### Le photorécepteur de l'horloge

La recherche actuelle en biologie des rythmes circadiens s'oriente également vers la quête des photorécepteurs de l'horloge. Nous avons vu que les cryptochromes (Cry) avaient été pressentis pour jouer ce rôle. Dans le cas de la drosophile, l'action de dCry (le cryptochrome de la drosophile) est bel et bien réglée par la lumière: son association avec Tim et donc l'inhibition de l'effet négatif du dimère Per-Tim nécessite ce stimulus [28].



**Figure 6. Les organes du poisson-zèbre contiennent des horloges indépendantes.** Oscillation de l'expression du gène Clock du poisson-zèbre dans des cœurs en culture ex vivo (essai de protection contre la ribonucléase, permettant de doser l'ARN messager étudié). Tous les poissons ont été entraînés selon le même cycle lumière-obscurité, puis leur cœur a été mis en culture avec soit le même cycle (LD) soit un cycle inversé (DL). Les boîtes blanches et noires représentent respectivement les périodes de lumière et d'obscurité. Les astérisques signalent le pic d'expression quotidien. Le pic observé in vivo est à ZT15 (le temps ZT indique le temps écoulé depuis le début de la période lumineuse). On note ici que ce pic demeure à ZT15 dans les cœurs maintenus sous le même cycle, mais est rapidement décalé de 12 heures chez ceux dont le cycle a été inversé. Le bas de la figure est une quantification des données. (Adaptée d'après [34].)

Cependant, chez la souris, l'implication de la lumière dans le fonctionnement de ces protéines semble beaucoup moins certaine. La lumière n'a pas d'influence sur l'action inhibitrice de mCRY1 et mCRY2, ni sur l'expression de gènes activés par CLOCK et BMAL1, lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules en culture [39]. mCRY1 et 2 sont capables d'interagir avec plusieurs autres protéines de l'horloge, selon des mécanismes indépendants de la lumière. De plus, certains événements moléculaires qui surviennent dans le NSC à la suite d'une stimulation lumineuse ne sont pas affectés chez des souris ne possédant ni mCRY1 ni mCRY2 [40, 41]. Le photorécepteur responsable de l'effet de la lumière sur l'horloge biologique reste donc à identifier. S'agit-il d'une opsine, similaire aux protéines chargées de recevoir la lumière dans les processus de vision, mais

distincte de celles-ci? Dans quelle cellule de la rétine se trouve ce photorécepteur? Est-il aussi présent ailleurs que dans la rétine? C'est ce que semblent indiquer les résultats obtenus dans notre laboratoire sur les poissons-zèbres. Nous avons mentionné plus haut que l'expression du gène Clock oscillait dans des organes ex vivo [33] ou même des cellules en culture [34]. Dans ces deux cas, les rythmes circadiens peuvent être directement entraînés par la lumière: si la phase du cycle lumière-obscurité est modifiée, le pic d'expression de Clock se déplacera en conséquence [34] (figure 6)! Ces résultats suggèrent donc non seulement que des horloges indépendantes sont présentes dans des organes périphériques de ces poissons, mais que ces organes possèdent également des photorécepteurs. Une situation similaire existe chez la drosophile [32]. Il

n'est pas exclu que ces photorécepteurs soient des cryptochromes, puisque ces protéines sont exprimées dans plusieurs tissus chez les insectes et chez les vertébrés. Il pourrait également s'agir de toute autre protéine pouvant recevoir la lumière et influencer la machinerie moléculaire de l'horloge dans un même cellule.

### Le rôle des acteurs déjà connus

De nombreuses questions demeurent concernant le rôle des composants de l'horloge déjà découverts. En effet, chez la souris, le rôle des gènes de l'horloge a été proposé en raison de la similitude avec des gènes homologues identifiés chez la drosophile, mais les démonstrations n'ont pas été apportées sur le plan génétique. L'utilisation de modèles de souris KO (*knock-out*) et transgéniques se révéleront essentiels pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués. Au-delà de l'inactivation de gènes par recombinaison homologue des gènes de l'horloge, des mutants conditionnels (par exemple restreints à des tissus particuliers) permettront d'établir le rôle de l'expression d'un gène de l'horloge dans un tissu donné (c'est-à-dire périphérique versus NSC). De plus, des informations précieuses pourront être obtenues en faisant varier les taux d'expression des différents participants à l'horloge, *via* la surexpression ou l'expression ectopique de l'une de ces molécules, qu'il s'agisse d'un mutant ou non. Enfin, les mécanismes impliqués dans les horloges, en particulier les voies de signalisation intracellulaires, pourront être analysées en utilisant des modèles de cultures cellulaires présentant des caractéristiques circadiennes *in vitro*. Ces modèles peuvent provenir de cellules de poissons-zèbres [34], de lignées stables de cellules de NSC [5], de fibroblastes [36] ou d'autres cellules immortalisées.

### Pourquoi étudier les horloges biologiques ?

L'implication d'un dysfonctionnement de l'horloge circadienne dans certaines maladies ou syndromes (comme les troubles du sommeil) ne fait aucun doute. Chez l'homme, les phénotypes comportementaux sont

difficiles à mettre en évidence, et peuvent être partiellement masqués par les contraintes sociales. Cependant, il est très probable que des mutations dans des gènes de l'horloge sont responsables de certains problèmes de santé [1]. Un exemple anodin mais symbolique permet d'illustrer ce point. Selon une étude récente, un nucléotide du gène *Clock* humain varie d'un individu à l'autre. Or, ce polymorphisme a pu être corrélié avec la tendance individuelle à se lever et se coucher plus ou moins tôt [42]. Si une modification minime d'un gène de l'horloge peut influencer la phase du cycle d'activité-repos, d'autres pourraient bien avoir des conséquences fâcheuses. On peut également citer l'efficacité et la toxicité de nombreux médicaments, qui varient selon l'heure d'absorption [1]. De plus, une meilleure connaissance des bases moléculaires de l'horloge permettrait de mieux faire face aux problèmes liés au travail posté ou aux emplois nécessitant des changements d'horaires [1].

On ignore probablement encore certains rôles insoupçonnés de PER, CLOCK et d'autres constituants de l'horloge. Des résultats récents montrent cependant que les gènes de l'horloge sont importants pour la réponse à la cocaïne chez la drosophile [43] ! Il y a fort à parier que l'étude des horloges biologiques réserve de nombreuses surprises au cours des années à venir ■

### Remerciements

Nous souhaitons remercier N. Foulkes, D. Whitmore, C. Crosio, Z. Travnickova, M. Pando, E. Heitz, M. Rastegar et tous les membres du laboratoire de P. Sassone-Corsi pour leur aide précieuse de fructueuses discussions. N. Cermakian est boursier du *Human Frontier Science Program*.

### RÉFÉRENCES

1. Reinberg A. *Les rythmes biologiques*. Paris: PUF, 1997: 128 p.
2. Sassone-Corsi P. Le gène *CREM* et les bases moléculaires de l'horloge biologique. *Med Sci* 1993; 9: 1153-5.
3. Iбата Y, Okamura H, Tanaka M, et al. Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol* 1999; 20: 241-68.

4. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 1990; 247: 975-8.

5. Earnest DJ, Liang FQ, Ratcliff M, Cassone VM. Immortal time: circadian clock properties of rat suprachiasmatic cell lines. *Science* 1999; 283: 693-5.

6. Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 1998; 241: 1225-7.

7. Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. Neurospora *wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* 1997; 276: 763-9.

8. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2112-6.

9. Huang ZJ, Edey I, Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 1993; 364: 259-62.

10. Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown, et al. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant *PERL*. *Science* 1995; 270: 811-5.

11. Sehgal A, Price JL, Man B, Young MW. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 1994; 263: 1603-6.

12. Sassone-Corsi P. Molecular clocks: mastering time by gene regulation. *Nature* 1998; 362: 871-4.

13. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 1997; 89: 641-53.

14. Allada R, White NE, So WV, Hall JC, Rosbash M. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 1998; 93: 791-804.

15. Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y. Circadian oscillation of a mammalian homolog of the *Drosophila* period gene. *Nature* 1997; 389: 512-6.

16. Sun ZS, Albrecht U, Zhuchenko O, Bailey J, Eichele G, Lee CC. *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* 1997; 90: 1003-11.

17. Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin X, Weaver DR, Reppert SM. Molecular analysis of mammalian *Timeless*. *Neuron* 1998; 21: 1115-22.

18. Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, et al. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron* 1998; 21: 1101-13.

19. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 1998; 20: 1103-10.

**RÉFÉRENCES**

20. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, *et al.* Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280: 1564-9.

21. Jin X, Shearman LP, Weaver DR, Zylka MJ, de Vries GJ, Reppert SM. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 1999; 96: 57-68.

22. Lee C, Bae K, Edery I. PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5316-25.

23. Bae K, Lee C, Sidote D, Chuang KY, Edery I. Circadian regulation of a *Drosophila* homolog of the mammalian *Clock* gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 6142-51.

24. Glossop NRJ, Lyons LC, Hardin PE. Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 1999; 286: 766-8.

25. Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH, Sassone-Corsi P. Transcriptional control of circadian hormone synthesis via the CREM feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14140-5.

26. Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 1998; 94: 83-95.

27. van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, *et al.* Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999; 398: 627-30.

28. Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, *et al.* Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 1999; 285: 553-6.

29. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, *et al.* mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 1999; 98: 193-205.

30. Renn SCP, Park JH, Rosbash M, Hall JC, Taghert PH. A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell* 1999; 99: 791-802.

31. Blau J, Young MW. Cycling *vriille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell* 1999; 99: 661-71.

32. Plautz JD, Kaneko M, Hall JC, Kay SA. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 1997; 278: 1632-5.

33. Whitmore D, Foulkes NS, Strähle U, Sassone-Corsi P. Zebrafish *Clock* rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci* 1998; 1: 701-7.

34. Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. *Nature* 2000; 404: 87-91.

35. Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 (sous presse).

36. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998; 93: 929-37.

37. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* 1996; 272: 419-21.

38. Krishnan B, Dryer SE, Hardin PE. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 1999; 400: 375-8.

39. Griffin EA, Staknis D, Weitz CJ. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 1999; 286: 768-71.

40. Okamura H, Miyake S, Sumi Y, *et al.* Photic induction of *mPer1* and *mPer2* in *cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 1999; 286: 2531-4.

41. Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, *et al.* Differential regulation of mammalian *period* genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12114-9.

42. Katzenberg D, Young T, Finn L, *et al.* A CLOCK polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* 1998; 21: 569-76.

43. Andretic R, Chaney S, Hirsh, J. Requirement of circadian genes for cocaine sensitization in *Drosophila*. *Science* 1999; 285: 1066-8.

**Summary**

**The molecular mechanisms of the circadian clock**

All living organisms have an endogenous clock which is essential to a circadian regulation of various physiological processes. A dysfunction of this clock can lead to a variety of diseases or syndromes including sleep disorders. In mammals, the central pacemaker is located in the suprachiasmatic nucleus of the anterior hypothalamus. Our understanding of the molecular mechanisms underlying the circadian clock have greatly increased over the past few years. In all the organisms which have been studied, the establishment and the perpetuation of the rhythms rely on negative feedback loops, in which clock factors accumulate to a certain level, then repress the transcription of their own gene, and of other genes. Recent studies are focusing (1) on the identification of new clock genes and on defining their respective roles; (2) on peripheral clocks which appear to be intrinsic to many tissues or cultured cells and on the search for the photoreceptors involved in receiving signals from the environment.

**TIRÉS À PART**

P. Sassone-Corsi.