

Un mécanisme d'héritage de l'horloge circadienne chez le poisson-zèbre : la mère et son horloge

Tout organisme vivant doit s'adapter aux variations de son environnement et parmi celles-ci à l'alternance jour/nuit. Il doit pouvoir anticiper ces changements fondamentaux en modifiant à la fois sa physiologie et son comportement. Ceci s'effectue selon un rythme d'environ 24 h grâce à une horloge biologique interne synchronisée par le cycle jour/nuit. Toutes les horloges circadiennes connues dans le monde vivant sont constituées de trois grandes composantes qui sont interconnectées (revue dans [1, 2]) : (1) l'oscillateur circadien lui-même, composé d'un système de gènes « clock » qui codent pour des facteurs de transcription interagissant pour former une boucle oscillante d'autorégulation et qui induit un rythme d'environ 24 h ; (2) une voie d'entrée qui permet le réglage précis de l'horloge sur les paramètres environnementaux (par exemple la lumière) et grâce à laquelle se produit la mise à l'heure précise de l'horloge sur un rythme de exactement 24 h ; (3) une voie de sortie qui permet à l'oscillateur de contrôler les phénomènes physiologiques ou comportement circadien.

Une horloge circadienne chez l'embryon

Les travaux réalisés chez les mammifères suggèrent que l'horloge circadienne commence à fonctionner tardivement, juste avant la naissance, probablement *via* une interaction hormonale entre la mère et le fœtus [3]. Cependant, pour les organismes à développement externe, l'absence d'interaction entre la mère et l'embryon durant la vie fœtale sug-

gère l'existence d'un autre mécanisme de synchronisation.

Afin d'analyser le fonctionnement de l'horloge circadienne des vertébrés à développement externe nous avons utilisé le poisson-zèbre (*Danio rerio*), espèce chez laquelle l'étude de l'expression des gènes au cours du développement est facilitée par la transparence totale de ses embryons. Après avoir isolé un homologue du gène *Period* (*per3*) qui code pour une protéine essentielle de l'oscillateur circadien chez la *Drosophile* et chez les mammifères, nous avons analysé son expression par hybridation *in situ* sur embryon entier [4]. Les résultats obtenus montrent que chez le poisson zèbre, l'expression de *per3* oscille tout au long de l'embryogenèse suivant un cycle de 24 heures en particulier, dans le système nerveux central et la rétine (figure 1). Cette expression rythmique sur 24 h persiste même lorsque l'embryon est placé soit dans le noir complet, soit

en lumière constante, c'est-à-dire sans alternance jour/nuit. Ceci suggère qu'un oscillateur circadien fonctionne chez l'embryon de poisson zèbre. En revanche, en modifiant expérimentalement les conditions circadiennes, par exemple en réalisant des cycles de 16 h (8 h de jour/8 h de nuit) au lieu de 24 h, la variation cyclique de l'expression de *per3* passe alors sur un cycle de 16 h au lieu de 24 h. Ceci montre que la lumière peut également resynchroniser l'expression rythmique de *per3*. Contrairement à la difficulté d'adaptation des mammifères au décalage horaire, adaptation qui requiert plusieurs jours, celle-ci est immédiate chez l'embryon de poisson.

Ces données démontrant l'existence d'une horloge circadienne chez les embryons ont également permis de faire une observation extrêmement étonnante. Le poisson zèbre, qui est un animal à « sang froid », ne règle pas sa température. Ainsi, une dimi-

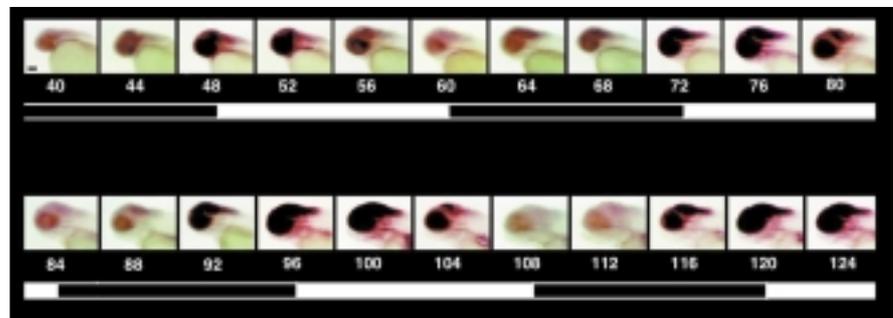


Figure 1. Expression du gène *per3* de poisson-zèbre au cours du développement embryonnaire. L'expression de *per3* au cours du développement a été analysée par hybridation *in situ* sur embryons entiers de poisson zèbre entre 40 heures et 124 heures de développement. Les traits noirs et blancs indiquent les périodes de jour (trait blanc) et de nuit (trait noir). L'expression de *per3* est maximale en fin de nuit et en début de journée et minimale en soirée.

nution de 5 °C de la température d'incubation conduit à un ralentissement du développement de 25 %, c'est-à-dire qu'après 4 jours de développement à 23 °C, les embryons sont au même stade de développement que des embryons de 3 jours se développant à 28 °C. Placés dans des conditions de lumière constante, les embryons se développant à 23 °C présentent un cycle de 24 heures en phase avec celui des embryons se développant à 28 °C. L'horloge circadienne moléculaire apparaît donc indépendante du développement embryonnaire.

Origine de l'horloge circadienne

L'une des questions majeures de cette étude est la suivante : d'où provient l'horloge qui contrôle cette expression génique cyclique chez l'embryon de poisson zèbre ?

Un premier élément de réponse nous est donné par l'observation de la présence des ARNm codant pour *Per3* dès les premières divisions cellulaires. A ces stades très précoces, le génome du zygote n'a pas encore commencé à s'exprimer et les ARNm présents dans l'embryon sont donc tous d'origine maternelle. Ceci indique que l'horloge embryonnaire pourrait provenir de la mère *via* l'accumulation de produits ARNm et protéines au cours de l'ovogenèse. Si tel est le cas, quel est donc le mécanisme par lequel cette horloge commence à fonctionner ? En d'autres termes, quel est le temps $t = 0$ du cycle circadien embryonnaire ? Par chance, le comportement sexuel du poisson zèbre est stéréotypé. L'accouplement n'a lieu qu'au lever du jour dans le milieu naturel ou lorsque la lumière de l'animalerie s'allume. Cependant dans environ 10 % des cas, l'accouplement peut avoir lieu en fin d'après-midi ou dans la soirée. En plaçant les œufs pondus le matin et ceux pondus le soir dans les mêmes conditions de lumière constante, nous avons analysé l'expression de *per3* au cours du temps. Si le temps $t = 0$ de l'horloge correspond au moment de la fécondation, alors les deux groupes d'embryons, ceux du matin et ceux du soir, devraient avoir un cycle en opposition de phase (puisque fécon-

dés à 12 heures d'intervalle). Au contraire, si l'horloge moléculaire est transmise par la mère, *via* une accumulation circadienne dans les ovocytes des produits moléculaires de cette horloge, alors les cycles des deux groupes d'embryons devraient être en phase. En d'autres termes, les embryons pondus le matin et ceux pondus le soir devraient présenter leur pic d'expression de *per3* au même moment et ce, même si leur développement embryonnaire est décalé de 12 heures. Nous avons observé que le cycle des deux groupes d'embryons, ceux du matin et ceux du soir, sont en phase. Ce n'est donc pas la fécondation qui détermine le temps $t = 0$ de l'horloge. En fait, tout se passe comme si la mère transmettait à l'embryon une horloge moléculaire, déjà réglée sur l'heure exacte, c'est-à-dire sur l'heure de sa propre horloge circadienne.

L'analyse au cours du temps de l'accumulation des ARNm codant pour *Per3* dans les ovaires et les ovocytes de la mère révèle que cette accumulation d'ARNm dans les ovocytes suit le rythme de l'horloge de la mère. Les œufs pondus le soir contiennent moins d'ARN *Per3* que ceux pondus le matin ce qui suggère bien que les embryons héritent d'une quantité différente d'ARN de *Per3* selon qu'ils sont pondus le matin ou le soir. L'ensemble de ces observations démontre l'existence d'une transmission héréditaire de la phase de l'horloge circadienne chez le poisson zèbre.

Horloge embryonnaire et horloge périphérique

Nos résultats qui prouvent l'existence d'une horloge circadienne chez les embryons sont à rapprocher de données récentes obtenues chez les mammifères, qui montrent l'existence d'horloges périphériques indépendantes dans les différents organes et même dans les cellules isolées. Les données classiques de la physiologie des mammifères indiquent qu'une horloge circadienne centrale existe dans le cerveau et que cette horloge coordonne les différentes activités circadiennes de l'organisme par voie hormonale. Cependant, de nom-

breux résultats obtenus ces dernières années montrent que le noyau supra-chiasmatic est loin d'être la seule structure possédant une horloge et que de nombreux autres organes possèdent également un oscillateur capable de fonctionner de manière indépendante. Le rôle du noyau supra-chiasmatic serait donc surtout d'assurer la synchronisation de ces différentes horloges.

Cette notion d'horloge périphérique autonome a encore été étendue par des données obtenues par l'équipe de Schibler à Genève [5]. En effet, cette équipe a montré que l'on pouvait obtenir une expression oscillante des gènes de l'oscillateur circadien (comme les gènes *period* des mammifères) dans des cellules en culture incubées transitoirement dans un milieu contenant de fortes concentrations de sérum. Ceci indique de façon tout à fait claire qu'une horloge circadienne existe dans ces cellules. On ne sait toujours pas si les effets de ce « choc au sérum » sont dus à la synchronisation brutale d'horloges qui existent déjà, mais avec des phases différentes dans chaque cellule, ou s'il y a mise en route *de novo* d'une horloge circadienne.

Toutes ces données indiquent que les cellules en culture tout comme les embryons précoces possèdent des mécanismes leur permettant de resynchroniser les horloges circadiennes qui fonctionnent dans leurs cellules. Il semble clair que la resynchronisation des horloges circadiennes périphériques, que ce soit celle des embryons par la lumière ou celle des fibroblastes en culture par le sérum, empruntent des voies similaires et se connectent à des effecteurs communs, conservés au cours de l'évolution, au niveau de l'oscillateur moléculaire.

Mais pourquoi un embryon de poisson zèbre aurait-il besoin d'un rythme circadien ? Il est difficile de répondre à cette question puisqu'il apparaît clairement que des embryons placés en lumière constante ou en obscurité constante ne présentent pas d'anomalies de développement notables. Une possibilité est que le rythme circadien en tant que tel ne soit pas utile à

