

Mutez un gène, et l'horloge ne tourne plus rond

Que se passe-t-il lorsqu'une composante de l'horloge biologique d'un organisme n'est pas fonctionnelle? Est-il possible de trouver des humains dont l'horloge est affectée au niveau génétique, et qui présentent des troubles du sommeil ou autres symptômes? Différents laboratoires étudiant l'horloge circadienne des mammifères ont cherché au cours des derniers mois – avec succès – une réponse à ces questions.

L'horloge circadienne principale des mammifères se trouve dans le noyau suprachiasmatique (NSC) de l'hypothalamus, et coordonne les rythmes d'environ 24 heures observés dans une multitude de processus physiologiques [1, 2]. L'horloge circadienne peut fonctionner de façon autonome, c'est-à-dire sans apport extérieur, mais a la capacité de s'adapter aux conditions environnementales et physiologiques. Par exemple, la lumière peut réajuster sa phase. La base de l'horloge est génétique, et c'est l'interaction d'un certain nombre de protéines et de gènes spécialisés qui est à l'origine de l'établissement des rythmes. Plusieurs de ces gènes ont été identifiés au cours des dernières années [1-3], et un modèle d'organisation fonctionnelle a été établi (figure 1). Ce modèle met en jeu des boucles de régulation transcriptionnelle [2]. La principale est une boucle d'autorégulation négative : les activateurs transcriptionnels CLOCK et BMAL1 augmentent ensemble l'expression de gènes comme *Cryptochrome (Cry)1* et *2* et *Period (Per)1*, *2* et *3*; les produits protéiques de ces gènes s'accumulent dans le cytoplasme, et forment des dimères qui entrent dans le noyau afin de réprimer leur propre transcription en interagissant directement avec CLOCK-BMAL1. De plus, une boucle positive fait intervenir la régulation positive de l'expression de *Bmal1* par PER2. En conséquence,

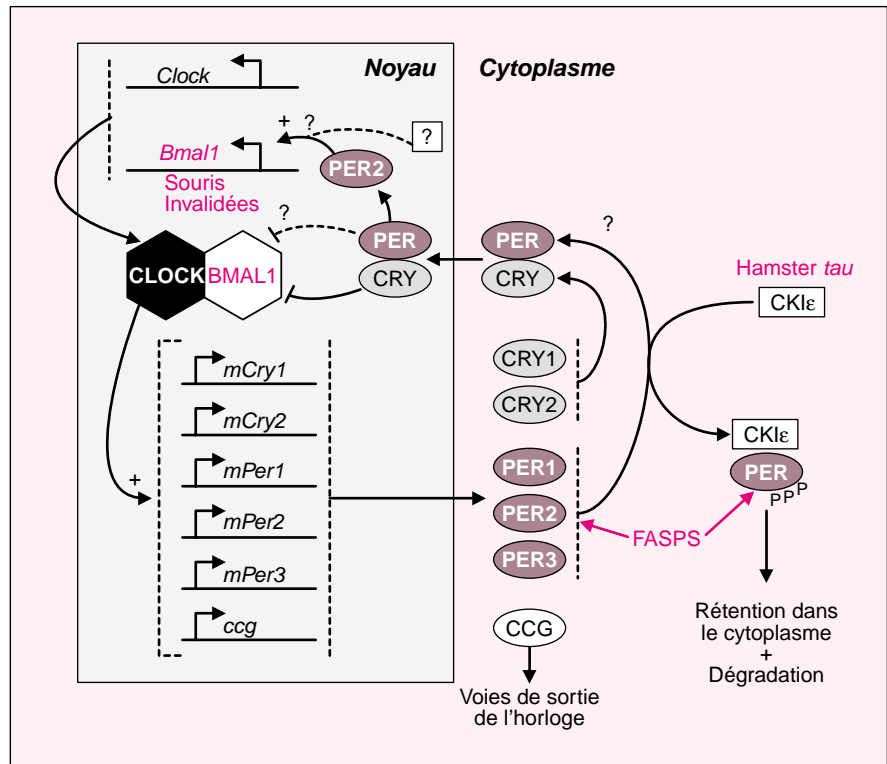


Figure 1. **Modèle moléculaire de l'horloge circadienne des mammifères.** Les activateurs transcriptionnels CLOCK et BMAL1 stimulent l'expression des gènes *Cry* et *Per*. Les produits protéiques de ces gènes s'associent dans le cytoplasme pour former des dimères qui entrent dans le noyau. Là, ils remplissent deux fonctions: premièrement, la répression de leur propre transcription, via l'inhibition de CLOCK-BMAL1; deuxièmement, l'activation du gène *Bmal1*, par un mécanisme qui reste encore à découvrir. Ces protéines constituent donc deux boucles régulatrices, l'une négative, l'autre positive. CLOCK et BMAL1 activent aussi ce que l'on appelle des clock-controlled genes (*ccg*) dont les produits transmettent les informations rythmiques au reste de l'organisme via les voies de sortie de l'horloge. Certaines protéines modulent la progression des boucles de régulation. Ainsi, la caséine kinase Iε (*CKIε*) peut phosphoryler les protéines PER, ce qui les déstabilise et empêche leur translocation dans le noyau. Le schéma souligne également les cibles des mutations décrites dans le texte (en rouge). FASP: familial advanced sleep phase.

plusieurs gènes de l'horloge sont transcrits de façon rythmique. CLOCK et BMAL1 activent aussi d'autres gènes dont la fonction est de transmettre les messages rythmiques à l'organisme [2, 3]. Il faut cependant noter que l'horloge n'est pas

constituée que de gènes, et que sa régulation peut se faire à plus d'un niveau [2]. Ceci est illustré par des études très récentes montrant des modifications de la chromatine en réponse à la lumière dans les cellules de l'horloge [4], et l'existence d'une

communication entre le NSC et d'autres oscillateurs circadiens présents ailleurs dans l'organisme ([5] et *m/s* 1998, n° 10, p. 1114).

Des souris sans BMAL1 sont arythmiques

A la question « Comment se comporte un animal dont un des gènes de l'horloge est muté? », on pourrait répondre tout simplement que son horloge est détraquée et qu'il ne présente plus de rythmes circadiens. La réalité est un peu plus complexe. Plusieurs lignées de souris dont un des gènes de l'horloge est muté ont été produites ou isolées au cours des dernières années [6-9]. Toutefois, jusqu'à tout récemment, aucun de ces animaux ne présentait une abolition complète des rythmes circadiens. Des mutants du gène *Clock* placés en obscurité constante sont arythmiques, mais seulement au bout de quelques jours [6]. Des souris invalidées pour les gènes *Per2* ou *Per3* présentent une période plus courte que des souris normales, mais restent toutefois rythmiques [7, 9]. Celles dont le gène *Cry1* ou *Cry2* est muté présentent aussi une période anormale; il a fallu combiner les mutations à la fois dans *Cry1* et *Cry2* pour avoir des animaux vraiment arythmiques en conditions constantes [8]. Une étude récente des groupes de Christopher Bradfield et Joseph Takahashi décrit le phénotype de souris dont le gène codant pour BMAL1 (ou MOP3) est inactivé, et démontre le rôle central et essentiel de cette protéine dans le système circadien [10]. Il s'agit en effet du premier exemple de souris invalidée pour un seul gène qui est totalement arythmique en conditions constantes, tant pour ce qui est de l'activité que de l'expression des gènes de l'horloge. Ces souris sans BMAL1 présentent aussi des problèmes d'entraînement de leur horloge par la lumière, et leur activité totale est réduite, deux autres phénotypes jamais encore trouvés chez des mutants de l'horloge [10].

Cette étude met également fin à certains doutes quant au rôle de BMAL1 dans l'horloge. En effet, un gène très semblable à *Bmal1*, appelée *Mop9*,

avait été découvert quelques mois plus tôt chez l'homme et chez les rongeurs [2, 10]. Ce gène étant lui aussi exprimé dans le NSC et la protéine pouvant s'associer à CLOCK, tout comme BMAL1, on pouvait se demander si ce n'était pas plutôt MOP9 qui était importante pour l'horloge, ou si les deux protéines ne se partageaient pas le travail. Les souris invalidées pour *Bmal1* démontrent que *Bmal1* est absolument nécessaire pour l'horloge, et présente toutes les caractéristiques d'un acteur fondamental de l'horloge; *Mop9*, toujours actif chez ces souris, ne peut suppléer à son homologue. *Mop9* pourrait cependant être lui aussi crucial, mais à un autre niveau dans le mécanisme de l'horloge; l'analyse de souris mutantes pour ce gène permettra de le savoir.

Des humains à l'horloge mutée

Si l'on peut trouver des mutants de l'horloge chez les rongeurs, pourquoi pas chez les humains? Certains syndromes incluant des troubles du sommeil ou des anomalies de l'oscillation circadienne de certains paramètres physiologiques sont de bons candidats pour présenter de telles mutations. Néanmoins, rien de tangible n'avait été publié jusqu'ici.

Un bon exemple d'anomalie du système circadien chez l'homme est le *Familial Advanced Sleep Phase Syndrome* (FASPS), décrit dans trois familles il y a deux ans [11]. Les individus atteints présentent une avance de quelques heures de leurs phases de sommeil et des rythmes de température et de mélatonine, ainsi qu'une période plus courte que la normale en conditions constantes. Les efforts conjoints de quelques laboratoires de l'Université de l'Utah à Salt Lake City ont mené tout récemment à la description du gène muté chez une de ces familles atteinte de FASPS [12]. Il s'agit du gène *Per2*. La mutation touche une sérine qui peut normalement être phosphorylée par la caséine kinase I ϵ (CKI ϵ) [11]. On sait, grâce à des études antérieures chez l'homme, les rongeurs et la drosophile, que CKI ϵ peut phosphoryler les protéines PER, ce qui diminue leur stabilité et inhibe leur transloca-

tion dans le noyau [2] (*figure 1*). Puisque PER1 et 2 ont probablement un rôle dans la boucle de régulation négative qui est au centre de l'horloge circadienne [2], on pouvait prédire qu'inhiber l'action de CKI ϵ accélère l'horloge. C'est en effet ce que l'on observe chez les patients FASPS. Les études moléculaires et génétiques ont donc convergé vers un modèle cohérent.

Cette étude est à rapprocher de résultats obtenus il y a moins d'un an chez le hamster [13]. On connaissait depuis plus d'une décennie un mutant naturel du hamster appelé le mutant *tau*. Ce mutant présente une période des rythmes d'activité qui est inférieure de quelques heures à celle des animaux normaux. Ce phénotype est en fait très proche de celui des patients FASPS, et le rapprochement était tentant [11]. Après des années d'efforts, le gène muté chez ces hamsters a enfin été dévoilé en avril 2000: il s'agit de CKI ϵ [13]! La protéine mutante présente une activité de phosphorylation de PER qui est grandement réduite. C'est donc la mutation réciproque de celle qui a été découverte chez les individus souffrant de FASPS, ce qui explique les phénotypes similaires.

Cette histoire constitue un argument de taille pour justifier les études de l'horloge circadienne sur des modèles animaux. Il y a fort à parier que les recherches sur les bases moléculaires de l'horloge, alliées aux études génétiques des syndromes circadiens humains, permettront de mettre le doigt sur les causes génétiques de ces troubles, ce qui pourrait aider la recherche de solutions pour alléger les problèmes des individus touchés.

**Nicolas Cermakian
Paolo Sassone-Corsi**

*Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, Cnrs, Inserm, Université Louis-Pasteur, 1, rue Laurent-Fries, 67404 Illkirch, Strasbourg, France.
E-mail: paolosc@igbmc.u-strasbg.fr*

1. Cermakian N, Sassone-Corsi P. Les mécanismes moléculaires de l'horloge circadienne. *Med Sci* 2000; 16: 504-12.
2. Cermakian N, Sassone-Corsi P. Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 2000; 1: 59-67.
3. Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; 96: 271-90.
4. Crosio C, Cermakian N, Allis CD, Sassone-Corsi P. Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature Neurosci* 2000; 3: 1241-7.
5. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 2000; 289: 2344-7.

6. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, et al. Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 1997; 89: 641-53.
7. Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, Weaver DR. Targeted disruption of the *mPer3* gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6269-75.
8. 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.
9. Zheng B, Larkin DW, Albrecht U, et al. The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* 1999; 400: 169-73.

10. Bunger MK, Wilsbacher LL, Moran SM, et al. *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000; 103: 1009-17.
11. Jones CR, Campbell SS, Zone SE, et al. Familial advanced sleep-phase syndrome: a short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med* 1999; 5: 1062-5.
12. Toh KL, Jones CR, He Y, et al. An *hPer2* phosphorylation site mutation in familial advanced sleep-phase syndrome. *Science* 2001; 291: 1040-3.
13. Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science* 2000; 288: 483-92.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Révolution culturelle chez les baleines australiennes.** Au large des côtes australiennes, du côté de l'océan Indien à l'Ouest, ou du côté de la Mer de Corail dans le Pacifique à l'Est, équipés de magnétophones étanches suspendus à des balises flottantes, des chercheurs enregistrent le chant des baleines à bosse (*Megaptera novaeangliae*). Pendant l'hiver austral et le printemps, les mâles chantent au moment de l'accouplement et du départ en migration. Cette démonstration est sans doute sexuelle, sans qu'on sache s'ils veulent dissuader leurs concurrents ou charmer les femelles. Le chant est toujours le même, avec de petits changements au cours du temps qui font évoluer le répertoire, comme on l'observe aussi chez les oiseaux chanteurs. Toutefois, chaque groupe a sa mélodie, et le chant des baleines qui s'accouplent à l'Ouest n'a rien à voir avec celui de l'Est, chanté par celles qui se regroupent au large des récifs de la Grande Barrière. Bien que les baleines migrent assez loin, il y a généralement peu d'échanges entre les différentes populations. Pourtant, vers 1995-1996, deux exogènes furent repérés (sur 81 chanteurs). Leur chant, très différent, rappelait celui de la côte Ouest. Rapidement, l'ensemble du groupe se mit à chanter indifféremment l'un ou l'autre chant, et certains mélangèrent même les thèmes de l'ancien et du nouveau chant. Puis, à partir de 1998, tous adoptèrent unanimement le chant nouveau. Il est

convenu d'appeler les petites modifications survenant habituellement et transmises aux jeunes générations une « évolution culturelle ». Ici, comme le suggèrent les chercheurs australiens, on peut donc parler d'une véritable « révolution culturelle ». Les chants du « Grand Bleu » ont sans doute encore beaucoup à nous apprendre.

[1. Noad MJ, et al. *Nature* 2000; 408: 537.]

■■■■ **La Livine empêche la cellule de mourir, bien sûr!** Un groupe d'Astra Zeneca vient de présenter [1] la dernière-née de la famille des IAP, protéines inhibitrices de l'apoptose [2]. Nommée Livine, elle a une expression très restreinte puisqu'elle n'est retrouvée que dans les tissus à croissance rapide: cerveau fœtal, placenta et plusieurs lignées cancéreuses. La Livine est même plus efficace que la Survivine pour inhiber, dans la lignée-type HeLa, l'apoptose induite par différents intermédiaires de la voie de signalisation du TNF α (*tumor necrosis factor*). En fait, la fixation de la Livine à la pro-caspase 9 bloque en grande partie le clivage protéolytique de cette pro-enzyme en une caspase 9 active. Le mécanisme d'action de la Livine semble toute-

fois plus complexe: *in vitro*, la Livine s'associe aussi à deux enzymes situées en aval du signal apoptotique, les caspases exécutrices 3 et 7. Si les auteurs ne mentionnent pas une éventuelle fixation aux pro-caspases correspondantes, ils indiquent en revanche les fonctions de deux portions de la protéine. Le rôle de l'une, le domaine BIR (*baculoviral IAP repeat*), est attendu: comme pour les autres IAP, il s'associe aux caspases et est responsable de l'inhibition de l'apoptose. L'autre est plus subtil: le domaine RING, décrit comme permettant la formation de complexes multi-protéiques [4], contrôle ici la localisation subcellulaire de la Livine. Les auteurs observent en outre que dans des cellules exprimant la Livine, la transfection d'ARN anti-sens de la Livine déclenche un programme apoptotique complet avec activation des caspases et fragmentation de l'ADN. La Livine pourrait ainsi devenir une cible prioritaire, au moins dans les cellules cancéreuses exprimant cette nouvelle IAP.

[1. Kasof GM, et al. *J Biol Chem* 2001; 276: 3238-46.]

[2. Ambrosini G, et al. *Nat Med* 1997; 3: 917-21.]

[3. Deveraux QL, et al. *EMBO J* 1998; 17: 2215-23.]

[4. Saurin AJ, et al. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 208-14.]