

Une horloge cellulaire et physiologique règle la vie du nématode *Caenorhabditis elegans*

Siegfried Hekimi

Le déroulement temporel de nombreuses étapes du développement et du comportement est réglé très précisément par des mécanismes appelés dans leur ensemble horloges biologiques. On a identifié chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* quatre gènes impliqués dans ce réglage de la chronobiologie. Les mutations du gène *clk-1*, minutieusement étudiées, allongent le temps moyen du développement embryonnaire et postembryonnaire, la période des cycles cellulaires et la durée de vie. Elles modifient aussi les périodes de cycles comportementaux, tels que la défécation, la nage, les cycles de pompage. Ces résultats suggèrent que des gènes tels que *clk-1* pourraient participer à la régulation centrale synchronisée d'une grande diversité de rythmes biologiques de l'organisme.

Une des caractéristiques du vivant est que le déroulement temporel de beaucoup d'aspects de la vie des organismes est réglé très précisément. Cette organisation temporelle se manifeste souvent sous la forme de rythmes réguliers que l'on appelle fréquemment « horloges biologiques ». Dans le monde de la technologie humaine les horloges sont des machines qui mesurent la durée. Dans quelle mesure cela est-il le cas des horloges biologiques ? Apparemment, la plupart des organismes possèdent une horloge circadienne, c'est-à-dire un mécanisme interne qui leur permet d'anticiper, et donc de se maintenir en synchronie avec les phénomènes du monde extérieur, tels que l'alternance du jour et de la nuit ou des saisons.

L'existence de rythmes libres, indépendants de stimulus externes, par exemple dans l'activité locomotrice, est une des preuves les plus importantes de l'existence de telles horloges. En effet, on peut démontrer, chez les vertébrés aussi bien que chez les invertébrés, que des variations de l'activité apparaissent de façon prévisible et à intervalles réguliers même quand des animaux sont maintenus sous une lumière constante ou dans une perpétuelle obscurité. Notre compréhension de l'horloge circadienne a été grandement renforcée par la recherche en génétique [1]. En effet, des mutations qui peuvent modifier la périodicité des rythmes libres ont été identifiées dans plusieurs espèces comme la mouche *Drosophila melanogaster* [2], la moisissure *Neurospora crassa* [3], le

ADRESSE

S. Hekimi: *assistant professor*. Department of biology, McGill University, Montréal, Québec, H3A 1B1 Canada.

RÉFÉRENCES

1. Dunlap JC. Genetic analysis of circadian clocks. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 683-728.
2. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 2112-6.
3. Feldman JF, Hoyle MN. Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* 1973; 118: 75-86.
4. Ralph MR, Menaker M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 1988; 241: 1225-7.
5. Vitaterna MH, King DP, Chang AM, Kornhauser PL, Lowrey, et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behaviour. *Science* 1994; 264: 719-25.
6. Glass L, Mackey MC. *From clocks to chaos, the rhythms of life*. Princeton, NJ: Princeton Paperbacks, 1988.
7. Cohen AH, Rossignol S, Grillner S. *Neural control of rhythmic movements in vertebrates*. New York: Wiley-Interscience, 1988.
8. Kyriacou CP, Hall JC. Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 6729-33.
9. Thomas JH. Genetic analysis of defecation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1990; 124: 855-72.
10. Liu DWC, Thomas JH. Regulation of a periodic motor program in *C. elegans*. *J Neurosci* 1994; 14: 1953-62.
11. Iwasaki K, Liu DWC, Thomas JH. Genes that control a temperature-compensated ultradian clock in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10317-21.
12. Gilbert SF. *Developmental biology*. Sunderland MA: Sinauer Associates, Inc., 1991.
13. Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II Control of the onset of transcription. *Cell* 1982; 30: 687-96.
14. Newport J, Kirschner M. A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. I Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 1982; 30: 675-86.
15. Edgar BA, Kiehle CP, Schubiger G. Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic transition in early *Drosophila* development. *Cell* 1986; 44: 365-72.
16. Kimelman D, Kirschner M, Scherson T. The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. *Cell* 1987; 48: 399-407.

hamster [4] et la souris [5]. De plus, on observe que les cycles circadiens libres de ces organismes sont allongés par certaines mutations alors qu'ils sont raccourcis par d'autres. L'horloge circadienne dont nous venons de parler détermine à quels moments du cycle nyctéméral un animal va être particulièrement actif ou montrer des comportements particuliers. Toutefois, beaucoup de comportements sont périodiques dans un tout autre sens: ils consistent en activations réitérées d'un programme moteur. La marche, la respiration, le péristaltisme ou les battements du cœur sont autant d'exemples de rythmes ultradiens que nous pouvons observer sur nous-mêmes, et qui existent en grand nombre chez tous les organismes [6]. Ici aussi on parle d'horloge biologique mais, dans ce cas, d'horloges neuronales [7]. On pense que ces horloges neuronales correspondent à des circuits nerveux ayant des propriétés oscillatoires et l'on étudie ces mécanismes tant au niveau physiologique qu'au niveau génétique. On a trouvé, par exemple, que le chant nuptial de la drosophile, qui montre plusieurs rythmes complexes, est affecté chez les mutants *per* (*m/s n° 4, vol. 2, p. 223*) [8]. Plus récemment, des mutations ont été identifiées qui affectent la longueur du cycle de défécation chez le nématode *Caenorhabditis elegans* [9, 10]. Chez ce ver, le cycle de défécation consiste en la contraction successive de trois groupes musculaires, ces trois contractions se répétant à intervalles très réguliers. Plusieurs gènes qui affectent le déroulement temporel de ce cycle comportemental ont été identifiés, certains mutants ayant un cycle plus long, et d'autres un cycle plus court que normal [11]. L'ontogenèse des organismes multicellulaires est une séquence extraordinairement complexe d'événements qui, très probablement, doit avoir recours à un mécanisme d'organisation temporelle pour pouvoir se dérouler de façon coordonnée. D'ailleurs, une partie importante de la recherche en biologie du développement consiste à déterminer exactement quels sont les patrons d'activation, dans l'espace et dans le temps, des gènes du développement. Toutefois, malgré l'extraordinaire précision qui semble exister dans la régu-

lation temporelle des étapes du développement, aucun mécanisme général de contrôle n'a été mis en évidence à ce jour [12].

Chez les organismes multicellulaires, le développement est accompagné d'une augmentation du nombre de cellules qui composent l'organisme. Il semble donc que la longueur du cycle cellulaire doit jouer un rôle déterminant dans l'organisation temporelle du développement. En effet, dans certains cas, on a pu démontrer que la longueur du cycle cellulaire est utilisée pour activer des événements du développement. Par exemple, chez de nombreux organismes, on observe une augmentation soudaine de la longueur des cycles cellulaires au milieu du stade embryonnaire de blastula et cette transition s'accompagne de plusieurs événements importants [13, 14]. Il apparaît que c'est un changement dans le rapport nucléo-cytoplasmique qui déclenche cette augmentation soudaine de la longueur du cycle. En effet, le rapport nucléo-cytoplasmique augmente régulièrement durant les premières phases du développement étant donné que le volume cytoplasmique des cellules diminue régulièrement au cours des clivages embryonnaires [15, 16]. Dans ce cas, il semble bien que la durée du cycle cellulaire soit utilisée comme une sorte d'horloge du développement.

La division cellulaire joue certainement un rôle très important dans tous les cycles de vie [17] et, par conséquent, les mécanismes responsables de ses aspects cycliques ont été étudiés en détail: en particulier les interactions entre des kinases, des phosphatases, leurs inhibiteurs et les cyclines. Les cyclines sont des protéines instables qui sont produites et s'accumulent pendant certaines des phases du cycle cellulaire. Leur destruction soudaine s'accompagne du passage dans la phase suivante. Clairement, les cyclines fonctionnent comme des mécanismes temporels. Toutefois, la recherche sur ces molécules a surtout porté sur leurs rôles dans les mécanismes qui permettent aux différents événements du cycle de se succéder dans l'ordre correct [18] et moins sur la régulation de la longueur du cycle comme telle [19]. Pour la plupart des organismes, comme pour les humains, les phases

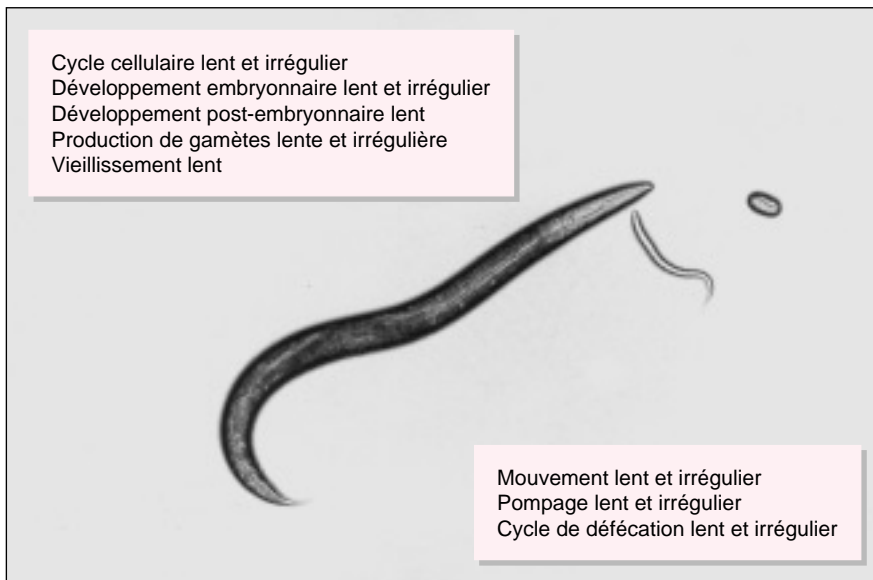


Figure 1. **Un ver nématode de l'espèce *Caenorhabditis elegans*. Il s'agit d'un ver portant la mutation *clk-1(e2519)* qui ralentit presque toutes les performances physiologiques de l'animal. Les traits physiologiques du développement altérés par la mutation sont inscrits en haut et à gauche de la figure, et les traits comportementaux en bas à droite. La photo montre aussi un œuf (à l'extrême droite) ainsi qu'un animal au premier stade larvaire. L'animal adulte à une longueur d'à peu près un millimètre.**

finales du développement sont la vieillesse et la mort. Il est frappant toutefois que chaque espèce ait une espérance de vie qui soit typique et il

est facile de prédire l'âge qu'un organisme ne peut dépasser. Qu'est-ce qui détermine l'espérance de vie et est-il possible qu'une horloge mesure

le temps qui nous reste à vivre? Les chercheurs qui s'intéressent à ces questions ont découvert que des éléments de l'environnement ainsi que

Phénotypes	Génotypes			
	Type sauvage	<i>e2519 m⁺z⁻</i> (secours maternel)	<i>e2519 m⁻z⁻</i>	<i>qm30</i>
Développement embryonnaire (heures)	13,3 ± 1,0 (n = 500)	13,6 ± 0,8 (n = 50)	17,1 ± 3,9 (n = 500)	22,8 ± 5,0 (n = 100)
Développement postembryonnaire (heures)	46,6 ± 3,0 (n = 500)	50,6 ± 3,1 (n = 100)	70,6 ± 4,8 (n = 500)	99,2 ± 6,2 (n = 100)
Taux de production d'œufs (œufs/heures)	6,0 ± 1,2 (n = 200)	3,8 ± 0,9 (n = 25)	27 ± 1,0 (n = 200)	0,9 ± 0,1 (n = 200)
Nombre de descendants par autofécondation	302,4 ± 30,5 (n = 20)	340,9 ± 77,2 (n = 20)	191,1 ± 33,0 (n = 20)	87,2 ± 37,2 (n = 10)
Durée de vie (jours)	18,6 ± 5,2 (n = 50) (max. : 27)	19,9 ± 5,3 (n = 50) (max. : 33)	26,0 ± 9,0 (n = 50) (max. : 45)	22,8 ± 9,8 (n = 50) (max. : 46)
Cycle de défécation (moyenne de cinq cycles, en secondes)	50,8 ± 5,6 (n = 100)	54,7 ± 8,4 (n = 11)	69,4 ± 9,9 (n = 100)	92,4 ± 15,0 (n = 25)
Pompage (cycles/minute)	259,0 ± 23,7 (n = 25)	232,3 ± 26,7 (n = 11)	156,0 ± 29,0 (n = 25)	170,3 ± 26,9 (n = 25)
Nage (cycles/minute)	120,7 ± 6,5 (n = 25)	120,3 ± 13,2 (n = 11)	91,7 ± 5,7 (n = 25)	75,6 ± 4,9 (n = 25)

Les mutants *e2519* et *qm30* sont deux mutants différents du même gène *clk1*.

Le cycle cellulaire des mutants *clk-1*

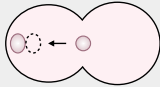
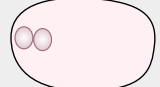
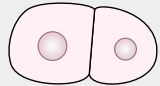
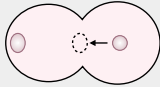

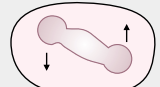

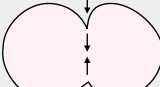
Événements ralentis	Type sauvage (n = 9)	<i>clk-1</i> (<i>e2519</i>) (n = 9)	
Migration pronucléaire rapide	18,75 ±5,43 µm/min	11,25 ±4,5 µm/min	
Pause pronucléaire	31 ±14 secondes	107 ±50 secondes	
Toutes les interphases ex. : interphase de la cellule P1	729 ±43 secondes	1143 ±219 secondes	
Événements inchangés			
Migration pronucléaire lente	3,6 ±1,05 µm/min	4,1 ±1,9 µm/min	
Rotation nucléaire	28 ±10 deg/min	25 ±9 deg/min	
Oscillation du fuseau	32 ±6 s/cycle	33 ±7 s/cycle	
Toutes les mitoses ex. : mitose de la cellule P0	171 ±38 secondes	184 ±31 secondes	
Toutes les cytokinèses ex. : cytokinèse de la cellule P0	256 ±53 secondes	262 ±54 secondes	

Figure 2. La durée des différentes phases des premiers cycles cellulaires d'embryons mutants et sauvages. Des embryons très jeunes sont obtenus par dissection et leur développement est suivi par microscopie vidéo. Les dessins schématiques illustrent les événements observés. Après la fécondation, le pronoyau de l'ovocyte, qui se forme toujours à l'opposé du point d'entrée du spermatozoïde, migre à travers l'embryon pour s'attacher au pronoyau du spermatozoïde. Pendant cette migration il se forme une constriction au milieu de l'embryon qu'on appelle le sillon de pseudo-clivage. La migration pronucléaire se fait en deux temps, d'abord le pronoyau migre lentement jusqu'au niveau du sillon, puis, beaucoup plus vite, jusqu'au pronoyau male. Seulement la phase rapide de cette migration est ralentie par la mutation de *clk-1*. Après s'être attachés l'un à l'autre, les deux pronoyaux restent immobiles, puis migrent ensemble jusqu'au milieu de l'embryon. Cette pause pronucléaire avant la reprise de la migration est beaucoup plus longue chez les embryons mutants. Quand les deux pronoyaux attachés ont atteint le milieu de l'embryon, ils exécutent une rotation de 90°, puis fusionnent et la mitose commence. Quand le fuseau a atteint sa longueur maximale il oscille énergiquement plusieurs fois, puis la mitose continue. Nous avons mesuré la longueur de toutes ces phases. Nous avons considéré que la mitose commence quand l'enveloppe nucléaire devient indistincte et qu'elle se termine (pour le soin de la mesure) quand commence la cytokinèse. De même,

nous avons considéré que les interphases commencent dès que s'interrompent les cytokinèses. Seuls un petit nombre d'événements du cycle sont ralentis par la mutation, sans qu'apparaisse clairement ce qu'ils pourraient avoir en commun.

des éléments génétiques contribuent à déterminer l'espérance de vie typique de chaque espèce [20, 21]. Chez le nématode *C. elegans*, ces deux champs de recherche sont activement explorés. En particulier, des recherches génétiques ont porté sur les gènes *daf* dont l'action règle la formation d'une larve dormante, la larve « dauer » (*m/s n° 11, vol. 12, p. 1261*) [22-24].

Les caractéristiques temporelles des processus biologiques que j'ai men-

tionnées jusqu'ici sont très différentes les unes des autres. Par exemple, les différences entre les périodes moyennes de ces rythmes s'étendent sur plusieurs ordres de magnitude. De plus, quand les mécanismes qui sont à la base de leur régularité sont connus, ils semblent n'avoir aucun point commun. Ce fut donc une surprise de taille que les résultats de recherches effectuées sur le nématode *Caenorhabditis elegans* [25-27] puissent suggérer l'existence

d'une horloge physiologique centrale exerçant une influence sur la plupart des caractéristiques temporelles du ver (*m/s n° 11, vol. 12, p. 1261*).

Le phénotype des mutants *clk-1* du nématode *C. elegans*

Des mutations dans quatre gènes du nématode *C. elegans* produisent des effets phénotypiques semblables. Ce sont les gènes *clk-1*, *clk-2*, *clk-3* et *gro-1*.

RÉFÉRENCES

17. Norbury C, Nurse P. Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 441-70.

18. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 246: 629-34.

19. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993; 73: 1059-65.

20. Comfort A. *The biology of senescence*. Edinburgh and London: Churchill Livingstone, 1979.

21. Finch CE. *Longevity, senescence and the genome*. Chicago: Chicago University Press, 1990.

22. Kenyon CJ, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; 366: 461-4.

23. Malone EA, Inoue T, Thomas JH. Genetic analysis of the roles of *daf-28* and *age-1* in regulating *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Genetics* 1996; 143: 1193-205.

24. Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 139: 1567-83.

25. Hekimi S, Boutis P, Lakowski B. Viable maternal-effect mutations that affect the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 141: 1351-64.

26. Wong A, Boutis P, Hekimi S. Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 1995; 139: 1247-59.

27. Lakowski B, Hekimi S. Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 1996; 272: 1010-3.

28. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7124-8.

29. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994; 263: 1128-30.

30. Flemming JE, Reveillaud, Niedzwiecki A. Role of oxidative stress in *Drosophila* aging. *Mutat Res* 1992; 275: 267-79.

31. Larsen PL. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8905-9.

32. Vanfleteren JR. Oxidative stress and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 1993; 292: 605-8.

33. Pearl R. *The rate of living*. New York: Knopf, 1928.

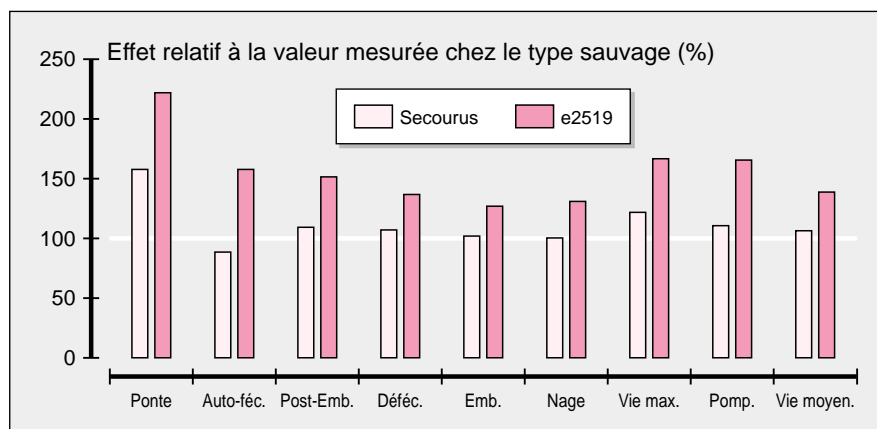


Figure 3. **L'effet phénotypique de la mutation *clk-1(e2519)* et du secours maternel, exprimé relativement à la valeur mesurée chez le type sauvage (indiqué par la ligne horizontale à 100 %).** La mutation secourue est *e2519*. Les mesures absolues utilisées sont celles du Tableau I. Les abréviations sont: autoféc. pour le nombre de descendants par autofécondation; post-emb. pour le développement postembryonnaire; emb. pour le développement embryonnaire; vie max. pour la durée de vie maximale; pomp. pour la fréquence de pompage; vie moyen. pour la durée de vie moyenne.

Nous les appelons collectivement les gènes *clk*. Toutefois, nous allons surtout parler du gène *clk-1*, et en particulier des mutations *e2519* et *qm30* de ce gène (la notation formelle est *clk-1(e2519)* et *clk-1(qm30)*). Nous ne nous préoccupons des trois autres gènes que dans le contexte de leurs effets sur le vieillissement. Les mutations dans le gène *clk-1* ont de nombreux effets phénotypiques (figure 1 et Tableau I). Les phénotypes sont aussi bien développementaux que comportementaux. Cela inclut la longueur de certains moments du cycle cellulaire (figure 2), la durée du développement embryonnaire et postembryonnaire, le taux de production d'œufs, le nombre de descendants par autofécondation (ce qui chez ces hermaphrodites est une mesure de la quantité de sperme produit avant le passage à la production d'ovocytes), la durée de vie, et la périodicité de comportements rythmiques comme la défécation, le pompage et la nage. Pour tous ces événements, on observe un ralentissement moyen de leur déroulement, donc une diminution de la fréquence des événements périodiques et une augmentation de la durée des événements dont nous mesurons la durée totale. Chez les mutants, ce ralentissement moyen est

presque toujours accompagné d'une variabilité plus grande que chez les vers du type sauvage, dans la longueur des périodes et des durées. Dans le Tableau I, qui résume ces données, cette augmentation de la variabilité se manifeste par un écart-type plus grand pour les mesures effectuées sur les mutants que pour celles effectuées sur des vers de type sauvage.

Les différentes mutations du gène *clk-1* produisent toutes la même série d'effets mais à des degrés divers. Par exemple, la caractérisation de deux de ces mutations, qui est illustrée dans le Tableau I, montre clairement que la mutation *qm30* produit des effets plus marqués que la mutation *e2519*. Cependant, malgré ces effets multiples, les mutants *clk-1* n'apparaissent pas, à première vue, particulièrement anormaux ou malades et ne sont pas différents du type sauvage sur le plan anatomique. Voilà donc la première caractéristique étonnante des mutations du gène *clk-1*: elles affectent des phénomènes qui n'ont apparemment aucun lien mécanique ou causal entre eux. Quel rapport peut-il y avoir entre la longueur du cycle de défécation et la longueur du cycle cellulaire dans l'embryon, ou entre

ce dernier et le vieillissement? Comment expliquer qu'une mutation dans un gène unique puisse affecter tous ces traits physiologiques disparates de façon similaire? Nous avons émis l'hypothèse que le phénotype de ces mutants révèle l'existence d'une horloge physiologique qui mesure le temps cellulaire et que le produit du gène *clk-1* est nécessaire à son fonctionnement. Dans les sections qui suivent, nous décrirons certaines des observations et des expériences plus complexes qui ont contribué à la formulation de notre hypothèse.

La mutation *e2519* affecte tous les phénotypes au même degré

C'est la mutation *e2519* que nous avons étudiée le plus en détail et dont la caractéristique la plus étonnante est qu'elle affecte presque exactement au même degré tout l'éventail des traits physiologiques étudiés (*figure 3*). Rappelons que ces traits physiologiques sont qualitativement très différents, mais le sont aussi quantitativement et se déroulent à des échelles temporelles complètement différentes: le pompage se mesure en centaines de cycles par seconde alors que la durée de vie se mesure en semaines. Imaginons que les effets physiologiques de la mutation *e2519* consistent, par exemple, à réduire la capacité métabolique, et que cela serait la source de la pléiotropie observée, étant donné que tout mécanisme physiologique requiert de l'énergie. Avec un tel modèle on voit mal comment l'uniformité de l'effet de *e2519* serait possible. Cela supposerait que tous les phénomènes affectés, qui seraient par ailleurs complètement indépendants, aient presque exactement le même degré de dépendance par rapport à la capacité métabolique. Par exemple, il faudrait supposer que l'augmentation rapide de la masse corporelle durant le développement postembryonnaire requière les mêmes quantités d'énergie par unité de temps que les faibles contractions musculaires du cycle de défécation. Ou encore, que le cycle cellulaire embryonnaire ait exactement les mêmes besoins que la nage. Un effet aussi uniforme d'une déficience

métabolique non spécifique nous semble bien difficile à imaginer. Malheureusement, bien que des études soient en cours dans plusieurs laboratoires, nous n'avons pas encore d'information sur le métabolisme cellulaire chez les mutants *clk-1*.

Dans ce contexte, nos observations sur le cycle cellulaire sont particulièrement pertinentes car nous avons montré (*figure 2*) que la plupart des événements du cycle, comme la mitose ou la cytokinèse, ne sont pas ralentis par les mutations, alors qu'ils requièrent probablement beaucoup d'énergie.

L'effet maternel

Les quatre gènes *clk* et en particulier *clk-1* montrent un effet de secours (encore appelé sauvetage) maternel. C'est-à-dire que des mutants homozygotes (*clk-1/clk-1*) descendant d'un parent autofécondant hétérozygote (*clk-1/+*) montrent un phénotype presque entièrement de type sauvage (*Tableau I* et *figure 3*). Le modèle le plus classique et le plus simple pour expliquer un effet maternel de ce type, suppose que, pendant le développement de l'ovocyte, la mère y dépose une certaine quantité de produit (ARN messager ou protéine) provenant du gène *clk-1* sauvage qu'elle porte, et que cette quantité est suffisante pour remplir entièrement la fonction normale du gène. En particulier, ce type d'hérédité est souvent associé aux mutations qui affectent le développement embryonnaire. Après tout, l'embryon n'est pas plus gros que l'ovocyte et donc, si le messager ou la protéine sont relativement stables, on peut voir comment le secours maternel est possible. Dans le cas des gènes *clk*, en revanche, ce modèle semble plus difficilement applicable, car le secours maternel s'étend ici à des phénotypes qui se mesurent chez un adulte 500 fois plus volumineux que l'œuf, et s'étend même au vieillissement (*Tableau I*). Il est peu probable que la quantité de produit du gène *clk-1* déposée dans l'ovocyte par la mère puisse suffire à l'adulte et durer assez pour affecter le vieillissement. Il faut donc imaginer que le produit est effectivement absent chez l'adulte. Le secours maternel que nous observons doit donc résulter d'un méca-

nisme développemental. Dans le contexte de notre hypothèse d'horloge biologique, il faut supposer que le fonctionnement de l'horloge peut être réglé par le produit de *clk-1* durant le développement embryonnaire, et que cette horloge, une fois réglée correctement, peut continuer à fonctionner avec ce réglage, même en l'absence du produit de *clk-1*.

Corrélations entre phénotypes mutants

Comme je l'ai mentionné plus haut, pour la plupart des phénotypes, le ralentissement moyen des périodes et des durées mesurées s'accompagne d'une augmentation considérable de leur variabilité (*Tableau I*). Par exemple, le développement embryonnaire des vers mutants *e2519* n'est, en moyenne, que 1,3 fois plus lent que chez le type sauvage, en revanche la variabilité est 4 fois plus grande. Par conséquent, certains embryons mutants se développent aussi rapidement que les embryons sauvages les plus rapides, alors que d'autres sont plus de deux fois plus lents. Ces différences entre embryons n'ont pas de base génétique car nous avons montré qu'elles ne sont pas héréditaires [26]. Une telle augmentation de la variabilité est aussi observée pour la plupart des autres phénotypes. Nous nous sommes donc posé la question de savoir si il y avait une corrélation parmi ces variations. Par exemple, les vers au développement particulièrement lent ont-ils des comportements particulièrement lents? C'est ainsi que nous avons étudié des groupes de vers mutants et de type sauvage que nous avons suivis individuellement du début du développement embryonnaire jusqu'au stade adulte (*Tableau II*). Pour chaque génotype, nous avons choisi deux groupes d'embryons: des embryons au développement rapide et des embryons au développement lent. Évidemment, on peut obtenir des différences bien plus grandes pour les embryons *clk-1* dont le développement est variable que pour ceux du type sauvage dont le développement est régulier (*Tableau II*). En suivant ces quatre groupes de vers nous avons eu la surprise de trouver que le développement postembryonnaire des vers lents est rapide, et que celui

Tableau II				
CORRÉLATION ENTRE PHÉNOTYPES MUTANTS				
Phénotype	Embryons à développement rapide		Embryons à développement lent	
	Type sauvage	<i>clk-1(e2519)</i>	Type sauvage	<i>clk-1(e2519)</i>
Développement embryonnaire (heures)	12,1 ± 0,7 (n = 29)	11,7 ± 0,7 (n = 29)	14,4 ± 0,5 (n = 29)	22,8 ± 0,7 (n = 29)
Développement postembryonnaire (heures)	49,5 ± 1,7 (n = 25)	74,9 ± 4,0 (n = 25)	47,2 ± 2,0 (n = 25)	64,3 ± 4,1 (n = 25)
Développement total	61,6	86,6	61,6	87,1
Période du cycle de défécation (secondes)	52,7 ± 5,0 (n = 29)	71,6 ± 12,0 (n = 29)	50,2 ± 3,8 (n = 29)	57,3 ± 6,5 (n = 29)

des vers rapides est lent. De même, la période du cycle de défécation des vers lents est rapide et celle de vers rapides est lente. Cela est vrai pour les vers sauvages aussi bien que pour les vers mutants, mais les différences sont beaucoup plus marquées chez les mutants (Tableau II). Ces observations montrent que des vers dont on peut mesurer la différence au début de leur vie restent différents durant leur vie ultérieure. De plus, l'étrange corrélation inverse entre le développement embryonnaire et nos deux autres mesures semble indiquer que notre hypothétique horloge n'est pas utilisée exactement de la même façon par différents mécanismes physiologiques.

Nos observations sur l'effet maternel nous avaient déjà suggéré que l'horloge pouvait se régler. Dans le cas du secours maternel, elle était réglée correctement par la présence au bon moment du produit normal de *clk-1*. Ces observations sur les corrélations entre les phénotypes de l'embryon et de l'adulte suggèrent que, même en l'absence complète de *clk-1*, un réglage de l'horloge s'effectue toujours, mais que la façon dont elle est réglée est maintenant déterminée de façon aléatoire. C'est seulement quand le produit de *clk-1* est présent que le réglage est plus ou moins le même pour tous les animaux : c'est le réglage de type sauvage. Ce modèle suggère aussi que les vers mutants ne sont pas ralentis par les mutations de *clk-1*, mais qu'un ralentissement moyen serait le résultat

d'un choix aléatoire de réglage d'horloge. En effet, l'horloge peut fonctionner à un nombre infini de valeurs plus lentes, mais seulement à un petit nombre de valeurs plus rapides. Après tout, il serait impossible d'avoir un développement embryonnaire instantané, ou même complété en deux heures au lieu de la valeur normale de treize heures.

La durée du développement embryonnaire des mutants dépend de la température durant l'ovogenèse

Les vers sont capables de vivre et de se développer normalement à des températures allant de 15 °C à 25 °C. Lors d'observations que nous ne décrivons pas en détail ici, nous nous étions aperçus que le développement embryonnaire des vers *clk-1* était proportionnellement beaucoup plus lent que celui des vers du type sauvage à 15 °C qu'il ne l'était à 25 °C. Nous en avons conclu que la perception de la température ambiante était altérée chez les mutants. De plus, grâce aux observations de l'effet maternel, nous savions que l'horloge pouvait être réglée. Nous nous sommes donc demandé si nous pouvions la régler en utilisant la température. Les résultats de ces expériences sont présentés de façon schématique dans la figure 4. Pour chacun des génotypes, nous avons déterminé la durée du développement embryonnaire à

20 °C de groupes d'embryons dont les parents avaient été élevés à des températures différentes, à 15 °C, 20 °C et 25 °C. Toute l'embryogenèse se passe donc à 20 °C, mais les embryons sont le résultat de la fécondation d'ovocytes qui ont été produits à trois températures différentes. Dans le cas du type sauvage, l'histoire thermique des ovocytes ne change pas la durée de l'embryogenèse à 20 °C pour les trois groupes d'embryons. En revanche, chez les mutants, la durée de l'embryogenèse est apparemment déterminée par ce qui s'est passé durant l'ovogenèse. Les embryons dont l'ovogenèse s'est déroulée à 15 °C se développent plus lentement, et ceux dont l'ovogenèse s'est déroulée à 25 °C plus rapidement, que ceux dont l'ovogenèse s'est déroulée à 20 °C. Notre interprétation de ces résultats, est que les animaux sauvages s'ajustent immédiatement à la nouvelle température, au point que ce qui s'est passé auparavant n'influence pas la durée de leur embryogenèse. Les mutants, en revanche, prennent un certain temps avant de s'adapter. Ils s'adaptent néanmoins, car les durées de l'embryogenèse mesurées dans cette expérience sont respectivement plus rapides et plus lentes que quand l'ovogenèse et l'embryogenèse se sont passées entièrement à 15 °C ou à 25 °C. Ces résultats nous suggèrent que la température est sans doute un des paramètres selon lesquels l'horloge se règle, et que *clk-1* est nécessaire pour effectuer ce réglage rapidement.

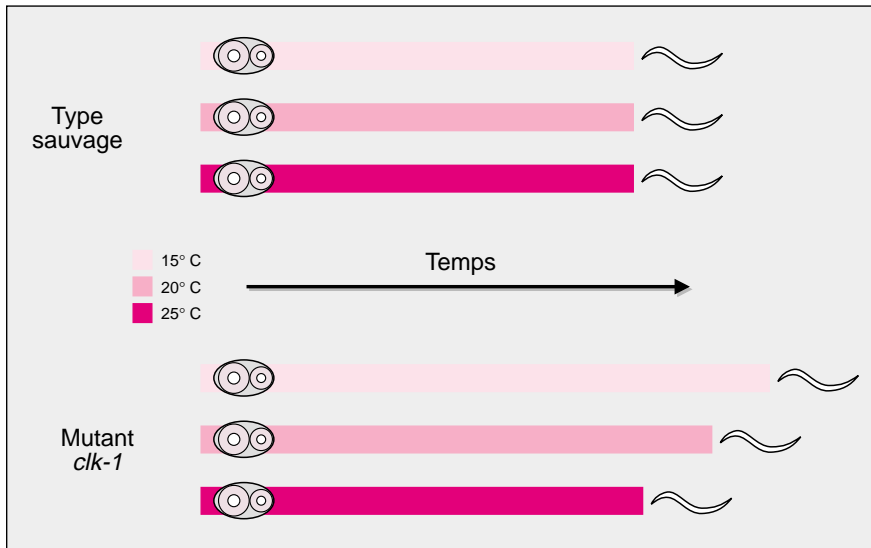


Figure 4. **Représentation schématique d'une expérience dans laquelle des embryons et leurs parents ont été élevés à trois températures différentes, 15 °C, 20 °C et 25 °C, puis tous les embryons ont été transférés à 20 °C pour le restant de l'embryogenèse et la durée jusqu'à l'éclosion mesurée.** Pour le type sauvage, ce traitement n'affecte pas la durée de l'embryogenèse. En revanche, la durée de l'embryogenèse des mutants dépend de la température d'élevage avant le transfert.

L'interaction entre les gènes *clk* et le vieillissement

Finalement, et c'est le cas de le dire, les mutants *clk-1*, ainsi que ceux des trois autres gènes *clk* (*clk-2*, *clk-3* et *gro-1*), vivent plus longtemps que les animaux sauvages, et cela, bien qu'il s'agisse d'animaux mutants, donc, dans un sens, génétiquement malades (Tableau 1). Pour étudier si ces gènes interagissent spécifiquement nous avons établi des souches portant des combinaisons de mutations de gènes *clk*. Nous avons trouvé que pour les gènes *clk-1*, *clk-2*, et *clk-3*, non seulement les mutants doubles vivent encore plus longtemps que les mutants simples, mais aussi que l'effet de deux mutations semble être plus qu'additif (figure 5). Une observation intéressante est que les animaux de certaines de ces souches, par exemple *clk-1(qm30) clk-3(qm38)*, apparaissent profondément malades : ils sont très léthargiques, produisent très peu d'œufs et parfois apparaissent anatomiquement anormaux. Malgré cela, ils vivent presque 3 fois plus longtemps que les animaux sauvages à 18 °C et bien qu'il ait été

montré que la fertilité ne joue pas de rôle dans le vieillissement du ver. Cela pourrait indiquer que le vieillissement n'est pas juste une accumulation d'états pathologiques mais qu'il a peut-être une cause unique qui est altérée par les mutations des gènes *clk*.

Quelle est cette cause, et comment interpréter l'augmentation de la durée de vie des mutants *clk*? Les théories sur le vieillissement se partagent globalement en deux camps. Un groupe de théories suggère que la durée de vie est déterminée par un mécanisme développemental comme l'est la puberté ou la ménopause [20]. Pour prolonger la vie il faudrait découvrir et manipuler ce mécanisme. L'autre groupe de théories suggère que, au long de son existence, l'organisme accumule peu à peu des dommages qui finissent par avoir raison de lui. La durée de vie résulterait d'un équilibre entre les processus dommageables et les mécanismes de réparation. Un certain nombre de données semble indiquer que les processus dommageables sont principalement le résultat du métabolisme énergétique de la cellule [28-33]. Dans ce cas, l'on voit mal

comment la durée de vie peut être altérée sans modifier presque tous les gènes de l'organisme. Nous pensons que nos résultats obtenus avec les mutants des gènes *clk* corroborent ce dernier groupe de théories. En effet, bien que nous pensons avoir découvert une horloge biologique, il nous semble que la mort ne se comporte pas comme un événement déterminé dans le temps. C'est la probabilité de mourir qui augmente avec le temps. La raison pour laquelle aucun ver de type sauvage ne peut vivre 50 jours, ou aucun être humain ne peut vivre 150 ans, c'est que cette probabilité n'augmente pas linéairement mais plus ou moins exponentiellement. Nous avons vu que les mutants des gènes *clk* vivent lentement à tout point de vue. Quelle que soit la source des dommages dont l'accumulation fini par entraîner la mort, il est probable que les mutants *clk* accumulent ces dommages plus lentement. Nous pensons donc que les mutations des gènes *clk* allongent la vie indirectement en la ralentissant (*m/s* n° 11, vol. 12, p. 1261).

Conclusion

Comment résumer tout cela? Notre interprétation générale des expériences que j'ai décrites, est que les mutations des gènes *clk*, révèlent

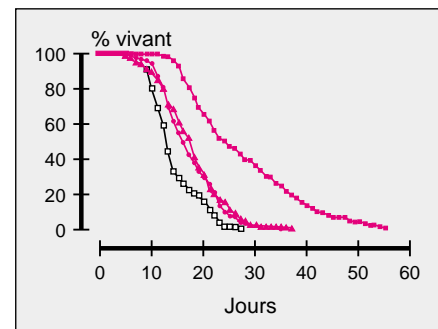


Figure 5. **Effet de mutations dans les gènes *clk* sur la durée de vie.** Les carrés blancs représentent les animaux du type sauvage, les points rouges les mutants *clk-1*(e2519), les triangles rouges les mutants *clk-2*(qm37), et les carrés rouges les mutants doubles *clk-1 clk-2*. Pour chaque génotype l'échantillon utilisé était de 100 animaux. Les lignes qui joignent les points sont sans autre signification que visuelle.

l'existence d'une horloge physiologique et cellulaire. La fonction de cette horloge serait de permettre la synchronisation et l'harmonisation des fonctions physiologiques. Nous ne savons pas encore s'il faut employer le terme comme une métaphore ou si une vraie comparaison de mécanismes peut être faite avec les horloges du monde de tous les jours. Les études moléculaires qui sont en cours, c'est-à-dire le clonage des gènes *clk*, nous permettront certainement d'en savoir plus dans le futur ■

Remerciements

Je remercie tous mes collaborateurs pour leurs idées et leur patience. Je remercie Claire Bénard et ma femme Michèle pour avoir corrigé mon français ainsi que Tom Barnes pour la figure 4 et, finalement, mon garçon Ilya pour m'avoir simplifié la vie avec des ordinateurs récalcitrants.

TIRÉS À PART

S. Hekimi.

Summary

A cellular and physiological clock sets the pace of the life of the nematode *Caenorhabditis elegans*

Many developmental and behavioral features of living organisms appear to be precisely timed by internal mechanisms which are referred to as « biological clocks ». In the nematode *Caenorhabditis elegans* four maternal-effect genes which appear to be required for the function of several distinct biological clocks have been identified. The consequences of mutations in the gene *clk-1* have been studied in most detail. These mutations result in a mean lengthening of embryonic and post-embryonic development, the cell cycle period and life span, as well as the periods of behavioral cycles such as the defecation, swimming and pumping cycles. This review focuses on the hypothesis that the phenotype of genes like *clk-1* reveals the existence of a central mechanism involved in synchronizing the activities of a variety of organismal features.

FONDATION FYSSSEN

194, RUE DE RIVOLI – 75001 PARIS, FRANCE
TÉL. : 33 01 42 97 53 16 - FAX : 33 01 42 60 17 95

PRIX INTERNATIONAL

Comme chaque année depuis sa création en 1979, la Fondation Fyssen décerne son **Prix International** - d'un montant de 200 000 francs - à une personnalité qui s'est distinguée par ses activités de recherches fondamentales dans le domaine des sciences cognitives.

**Le Prix International 1996
a été remis le vendredi 4 avril 1997
à Monsieur le Professeur Colin RENFREW**

Directeur de l'Institut McDonald pour la Recherche Archéologique à Cambridge, en l'honneur de ses travaux dans le domaine des sciences cognitives et de son prestige reconnu qui a profondément marqué, dans la façon même de s'interroger sur les symboles de notre passé, des générations de préhistoriens du XXe siècle.

SÉMINAIRE D'IMMUNO- DERMATOLOGIE

Lyon

Lundi 5 et Mardi 6 mai 1997

Organisé par le Groupe de Recherche
en Auto-immunité de Lyon (GRAAL)
Inserm Unité 80 et Faculté RTH Laennec

Les Séminaires d'Immuno-Dermatologie sont une mise au point régulière des progrès réalisés en immunologie fondamentale et clinique indispensables à la compréhension de la physiologie et de la pathologie dermatologique. Les Séminaires durent 2 jours et comportent une succession de cours sur des sujets modernes d'immunologie dermatologique qui associent des rappels de bases, des mises au point sur des notions plus récentes et des revues sur des maladies dermatologiques, des techniques diagnostiques ou des méthodes thérapeutiques. Les Séminaires d'Immuno-Dermatologie s'adressent aux médecins, scientifiques, internes de spécialité, étudiants du 3^e cycle ainsi qu'à toute personne qui s'intéresse à la physiologie de la peau, à l'immunologie ou à la dermatologie. Les conférences auront lieu tous les ans. Le Séminaire 1997 s'intéressera plus particulièrement à la physiologie du système immunitaire cutané et muqueux, aux phénomènes de tolérance immunologique cutanée, aux mécanismes de présentation d'haptènes et d'allergènes aux lymphocytes T, à la détection des cytokines dans les tissus et dans le sérum, aux techniques d'immunothérapie de contact et à l'intérêt des modèles animaux pour comprendre la physiopathologie des dermatoses inflammatoires et auto-immunes.

Organisation

Jean-François NICOLAS
Inserm U. 80 et Université Claude-Bernard Lyon 1

Adresse

**SÉMINAIRE
D'IMMUNODERMATOLOGIE/SIV**

Inserm U. 80, 7^e Étage, Faculté Laennec,
69372 Lyon Cedex, France.

Secrétariat

Mme Rose Doroumian

Renseignements

Tél. : +33 4 72 11 01 71 - Fax : +33 4 78
77 87 70

E-mail : jfnicola@cimac-res.univ-lyon.fr
Internet : http://laennec1.univ-lyon1.fr
(actualisation du programme)