

# Rythme circadien : des horloges dans les organes périphériques et dans des fibroblastes en culture

Depuis l'apparition de la vie, la rotation de la terre soumet la plupart des organismes au cycle jour/nuît et les oblige à anticiper les variations des paramètres de l'environnement qui en résultent. Cette adaptation se traduit par la régulation d'un grand nombre de fonctions physiologiques et comportementales selon un rythme circadien contrôlé par une horloge biologique interne. Cette horloge circadienne est entraînée et synchronisée par la lumière et il est généralement admis que, chez les mammifères, elle réside dans le noyau suprachiasmatique, situé à la base de l'hypothalamus. Plusieurs gènes-clés contrôlant ce processus ont récemment été clonés chez la souris et l'homme et l'on commence à comprendre comment ils interagissent et engendrent le rythme circadien. D'autres travaux récents montrent également qu'il y aurait chez les mammifères des horloges circadiennes en dehors du noyau suprachiasmatique utilisant les mêmes mécanismes moléculaires mais synchronisées par des signaux différents. Même des lignées cellulaires en culture depuis plusieurs années possèdent leur propre horloge circadienne !

## Les gènes de l'horloge circadienne

Les travaux réalisés chez la drosophile ont montré que les gènes *Period* (*Per*) et *Timeless* (*Tim*) jouent un rôle essentiel dans le maintien des rythmes circadiens. L'expression de *Per* et *Tim* suit un rythme circadien en conditions constantes : elle est induite par la lumière et elle est réprimée par les protéines PER et TIM (pour revue voir [1]). Il existe

au moins trois protéines homologues de PER chez les mammifères, PER1, PER2 et PER3, et la synthèse des deux premières est aussi réglée par la lumière dans le noyau suprachiasmatique [2-4] (Tableau I). La boucle d'autorégulation négative de *Per* et *Tim* est maintenant considérée comme le mécanisme moléculaire permettant d'engendrer le rythme circadien. Ce modèle implique, d'une part, que l'expression de *Per* et *Tim* est activée par des facteurs positifs afin que le cycle soit entretenu et, d'autre part, qu'il existe un mécanisme par lequel les protéines PER et TIM répriment leurs gènes. Il est en

effet difficile d'imaginer comment les protéines PER et TIM peuvent réprimer directement la transcription puisqu'elles ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN. Des facteurs intermédiaires restaient donc à découvrir.

L'identification du gène *Clock* chez la souris et la drosophile par les groupes de J. Takahashi (Evanston, IL) et S. Kay (La Jolla, CA) aux États-Unis constitue une étape majeure dans l'élucidation de ce mécanisme [5, 6]. Le gène *Clock* code pour une protéine à domaine PAS de la famille bHLH (*basic helix loop helix*). Le domaine PAS a initialement été iden-

Tableau I

LES PRINCIPAUX GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA MISE EN PLACE DU RYTHME CIRCADIEN CHEZ LES MAMMIFÈRES ET LA DROSOPHILE

Drosophile	Mammifère	Expression oscillante	Remarques
<i>Per</i>	<i>Per1 (Rigui)</i> <i>Per2</i> <i>Per3</i>	Oui	Tous contiennent un domaine PAS mais seul le gène <i>PER1</i> de mammifère contient aussi un domaine bHLH
<i>Tim</i>	?	Oui	Pas de domaine conservé connu
<i>Clk (dclock)</i>	<i>Clock</i>	Non	bHLH/PAS
<i>Cycle (dbmal1)</i>	<i>BMAL1</i>	Non	bHLH/PAS
??	<i>DBP</i> <i>TEF</i>	Oui	bZIP et domaine riche en proline et en acides aminés
<i>E75</i>	<i>Rev-erbα</i> <i>Rev-erbβ</i>	Oui	Récepteurs nucléaires orphelins L'implication de <i>Rev-erbβ</i> et de <i>E75</i> dans l'établissement du cycle n'est pas démontrée

tifié dans les protéines PER, ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) et SIM (*single-minded*) et il est responsable des interactions protéine-protéine entre les différents membres de la famille bHLH/PAS. Cette propriété a amené ces chercheurs à rechercher des partenaires potentiels pour CLOCK en utilisant la technique de double hybride. Cette approche leur a permis d'identifier un autre gène du rythme circadien appelé *Bmal1* qui code aussi pour une protéine bHLH/PAS [7]. De nombreuses protéines bHLH/PAS sont des facteurs de transcription qui règlent leurs gènes cibles *via* des éléments d'ADN spécifiques, appelés boîtes E, dont la séquence consensus est CACGTG. Cette séquence a été identifiée dans un fragment du promoteur *Per* de drosophile qui est nécessaire pour la transcription circadienne de ce gène [8]. Lorsque des cellules S2 de drosophile sont cotransfectées avec un gène rapporteur *luciférase* fusionné à cet élément et un vecteur d'expression pour *Clock*, une très forte activation du promoteur *Per* est observée [6]. Le même résultat a été obtenu avec le promoteur du gène *Tim* qui contient lui aussi une séquence de boîte E. Chez la souris le promoteur du gène *Per1*, contenant trois séquences de boîte E, répond de la même manière à CLOCK. Dans ce système, CLOCK a besoin d'un partenaire, BMAL1, pour activer la transcription du gène *Per1* [7]. En fait, il existe aussi chez la drosophile un analogue de BMAL1, appelé CYCLE, qui est probablement en quantité suffisante dans les cellules S2 pour que CLOCK soit actif [9]. L'expérience décisive consistant à tester l'effet de PER sur l'activité transcriptionnelle de *Clock* a été réalisée avec le système drosophile et les résultats montrent que PER associé à TIM inhibe 80 % de cette activité. TIM semble ne pas exister chez les mammifères mais il est très probable que, comme PER, les facteurs PER1, PER2 et PER3 soient aussi impliqués dans la répression de l'activité de l'hétérodimère CLOCK-BMAL1. La boucle est donc bouclée et l'on connaît maintenant le jeu minimal de facteurs de transcription nécessaires à la constitution

d'une horloge circadienne primaire : un hétérodimère (PER-TIM chez la drosophile par exemple) qui inhibe l'activation de ses propres gènes par un autre hétérodimère (CLOCK-BMAL1 chez l'homme par exemple). Il reste maintenant à comprendre comment les facteurs PER et TIM chez la drosophile ou PER1, PER2 et PER3 chez les mammifères bloquent l'hétérodimère CLOCK-BMAL1 et comment cette horloge circadienne primaire contrôle les autres gènes circadiens.

### Les mammifères ont aussi plusieurs horloges circadiennes

Pendant très longtemps, le noyau suprachiasmatique a été considéré comme la principale structure anatomique contenant l'horloge circadienne des mammifères. Il comprend environ 10 000 neurones dont l'activité électrique est entraînée et synchronisée par la lumière *via* l'axe rétino-hypothalamique et qui communiquent avec les organes périphériques par la voie neurohormonale. Curieusement les gènes essentiels du rythme circadien tels que *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2* et *Per3* sont tous, sans exception, exprimés dans de nombreux tissus autres que le noyau suprachiasmatique chez la souris et l'homme [3-5]. Cela peut signifier qu'ils ont d'autres rôles dans ces tissus ou bien que des horloges circadiennes existent aussi dans les tissus périphériques (*m/s* 1998, n° 4, p. 490). Les résultats obtenus par le groupe de S. Reppert (Boston, MA) aux États-Unis sont largement en faveur de la deuxième possibilité puisqu'ils montrent que les trois gènes *Per1*, *Per2* et *Per3* sont exprimés chez la souris selon un rythme circadien dans le foie, le muscle squelettique et le testicule [5]. Les mêmes résultats ont été obtenus par le groupe d'Ueli Schibler (Genève) en Suisse avec les gènes *Per1* et *Per2* dans le foie de rat. En corollaire, ces auteurs rapportent que des gènes dont l'expression circadienne a d'abord été observée dans le foie, tels que le facteur de transcription DBP (*D-box binding protein*) et le récepteur nucléaire orphelin Rev-erb $\alpha$ , sont exprimés selon le même rythme dans le noyau supra-

chiasmatique. Le rôle exact des facteurs DBP et Rev-erb $\alpha$  dans le rythme circadien est encore largement inconnu mais ils pourraient constituer des relais transcriptionnels de l'horloge primaire constituée par l'ensemble CLOCK/BMAL1-PER (*figure 1*). Les mammifères semblent donc bien posséder, en dehors du noyau suprachiasmatique, de multiples horloges circadiennes qui utilisent probablement les mêmes mécanismes moléculaires. C'est aussi ce qui a été démontré chez la drosophile dont les différents organes peuvent être synchronisés de manière autonome par la lumière grâce à leurs photorécepteurs [10, 11]. L'existence d'un décalage de phase d'environ 4 heures entre le noyau suprachiasmatique et les organes périphériques chez les mammifères indique en revanche que des signaux différents doivent synchroniser les différentes horloges.

### Un choc de sérum induit une expression circadienne *in vitro*

La plupart des gènes inductibles par la lumière dans le noyau suprachiasmatique tels que les gènes codant pour le facteur de transcription c-Fos et le récepteur nucléaire orphelin Nur77 (NGFI-B) appartiennent au groupe des gènes immédiats précoces [12]. L'expression des gènes *Per1* et *Per2* est aussi fortement induite chez la souris par une courte exposition lumineuse selon une cinétique similaire à celle des gènes immédiats précoces [3, 13]. Les gènes immédiats précoces sont surtout connus pour être rapidement induits par le sérum. A partir de cette analogie entre les réponses à la lumière et au sérum, le groupe d'Ueli Schibler a décidé de soumettre des cultures cellulaires à un choc de sérum et de suivre l'expression de différents gènes circadiens au cours du temps. Cette expérience, réalisée avec des fibroblastes Rat-1 a donné un résultat aussi inattendu que spectaculaire : après incubation des cellules dans un milieu de culture contenant 50 % de sérum pendant deux heures, l'expression des gènes *Per1*, *Per2*, *Rev-erb $\alpha$*  et *DBP* commence à osciller avec une période

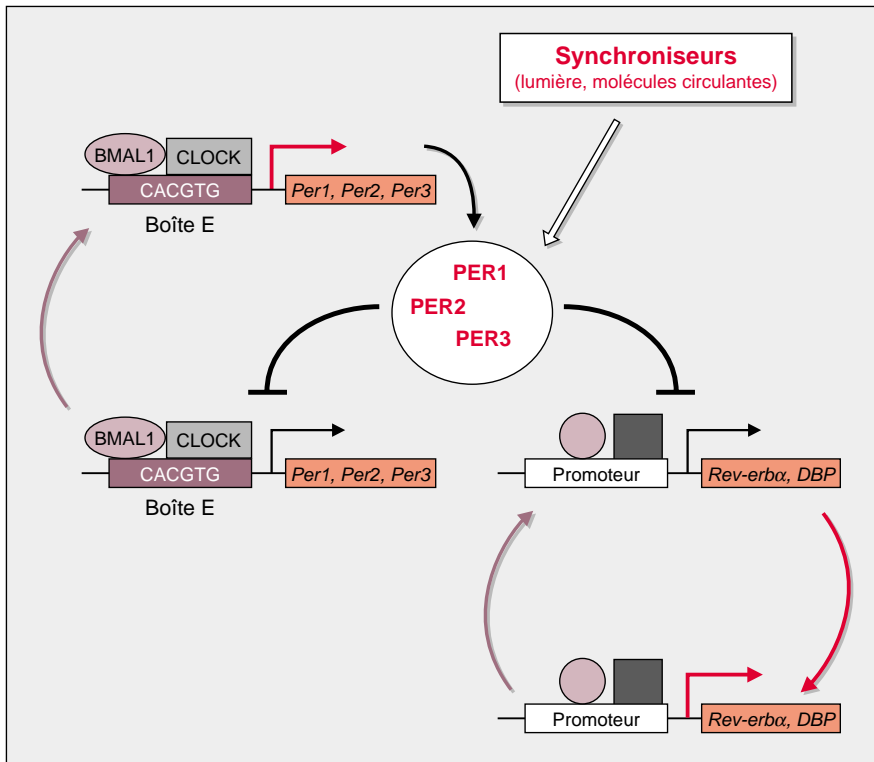


Figure 1. **Modèle d'interaction entre les différents gènes intervenant dans le contrôle du rythme circadien chez les mammifères.** L'hétérodimère BMAL1-CLOCK active l'expression des gènes *Per1*, *Per2* et *Per3*. Les produits des gènes *Per* répriment leur activation par BMAL1-CLOCK, d'une façon encore mal comprise. Il en résulte donc une expression oscillante de ces gènes. BMAL1-CLOCK pourraient également régler l'expression de gènes situés plus en aval dans la cascade, comme *DBP* ou *Rev-erba*. Les protéines *PER* pourraient, de la même façon, réprimer cette activation ce qui, là encore, engendre un rythme oscillant. La lumière (ou le choc par le sérum dans le cas des cellules en culture) induit l'expression des gènes *Per* et donc l'inhibition de l'expression de *Rev-erba* et de *DBP* ce qui entraîne une synchronisation du système.

d'environ 22,5 heures. Cette expression rythmique quasiment circadienne a pu être observée pendant trois cycles consécutifs et n'est pas spécifique des fibroblastes Rat-1 puisqu'elle a aussi été observée dans les lignées cellulaires issues d'hépatomes de rat H35. Cet effet est indépendant de la source de sérum, le même résultat ayant été obtenu quelle que soit l'espèce animale de laquelle il provient. Le suivi précis du profil d'expression des différents gènes après l'exposition des cellules au sérum montre que *Per1* et *Per2* sont d'abord fortement et transitoirement induits ce qui confirme bien qu'il s'agit de gènes immédiats précoces. Après ce pic d'expression ini-

tial on observe alors la chute de *Rev-erba* et de *DBP*; *Per1* et *Per2* se comportent donc comme des répresseurs de ces deux gènes. Lorsque *Per1* et *Per2* sont à leur minimum, l'expression de *Rev-erba* reprend avant celle de *DBP*, *Rev-erba* pourrait alors être un régulateur situé en amont de *dbp*. Ces résultats démontrent pour la première fois que des lignées cellulaires de mammifères ont leur propre horloge circadienne et que celle-ci peut être entraînée et synchronisée par un signal qui n'est pas la lumière. La nature du signal contenu dans le sérum n'est pas encore connue mais il est probable qu'il s'agit d'une molécule circulante ayant une structure très conservée chez les mammi-

fères. Ce signal peut avoir deux effets possibles: l'induction du rythme circadien dans des cellules rythmiques ou bien la synchronisation de cellules ayant des rythmes asynchrones. Un suivi de l'expression à l'échelle d'une cellule au moyen du gène rapporteur *GFP* (*green fluorescent protein*) couplé à des promoteurs de gènes circadiens devrait apporter la réponse. L'expression cyclique des gènes fondamentaux du rythme circadien *Per1* et *Per2* observée dans les fibroblastes en culture renforce l'idée selon laquelle le mécanisme moléculaire d'horloge circadienne serait le même dans tous les types cellulaires. L'invalidation conditionnelle de ces gènes fournira sans doute prochainement une réponse définitive.

#### Comment les différentes horloges peuvent-elles interagir ?

La mise en évidence d'horloges circadiennes dans les organes périphériques et même dans des cellules en culture, d'une part, et de signaux de synchronisation autres que la lumière, d'autre part, pose maintenant la question de savoir comment ces horloges interagissent avec celle du noyau suprachiasmatique. La lumière est incontestablement le principal synchroniseur des neurones du noyau suprachiasmatique alors que ce sont des molécules circulantes qui synchronisent les horloges périphériques. On peut alors imaginer que les signaux émis par le noyau suprachiasmatique en réponse aux stimulus lumineux ne contrôlent pas directement les différents rythmes circadiens de l'organisme mais serviraient plutôt, à leur tour, de synchroniseurs pour les horloges circadiennes situées dans les organes périphériques. Un tel système de synchronisation à plusieurs étages pourrait, en outre, expliquer pourquoi les rythmes circadiens se maintiennent très longtemps en absence de cycle jour/nuit. Bien que ce modèle soit fondé sur un contrôle décentralisé du rythme circadien, il ne remet pas en cause l'importance du noyau suprachiasmatique dans cette fonction. La première question qui se pose maintenant est celle de l'identité des molécules circulantes. En

deuxième lieu il sera important de comprendre comment des signaux aussi différents que la lumière et des molécules circulantes peuvent activer un même mécanisme moléculaire d'horloge circadienne. On connaît déjà de telles situations comme, par exemple, la voie de signalisation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B qui peut être activée par des agents aussi variés que les cytokines, les lipopolysaccharides et les rayons ultraviolets. L'existence d'un système *in vitro* facile à manipuler sera très certainement un outil de choix pour répondre à ces questions et continuer le démontage des horloges circadiennes biologiques.

F.D.  
V.L.

1. Couderc JL. Mécanismes moléculaires du fonctionnement et de la remise à l'heure de l'horloge biologique. *Med Sci* 1996; 12: 798-801.
2. Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell* 1997; 91: 1056-64.
3. Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski Jr LF, Reppert SM. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 1997; 19: 1261-9.
4. 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.
5. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, et al. Positional cloning of the mouse circadian *Clock* gene. *Cell* 1997; 89: 641-53.
6. Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TDL, Weitz CJ, Takahashi J, Kay SA. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 1998; 280: 1599-603.
7. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC,

- Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280: 1564-9.
8. Hao H, Allen DL, Hardin PE. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3687-93.
  9. Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Robash M, Hall JC. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell* 1998; 93: 805-14.
  10. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 1998; 93: 929-37.
  11. Rouyer F. Chez la drosophile, les horloges circadiennes ont leurs propres yeux. *Med Sci* 1998; 14: 448-50.
  12. Morris ME, Viswanathan N, Kuhlman S, David FC, Weitz CJ. A screen for genes in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* 1998; 279: 1544-7.
  13. Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, et al. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 1997; 91: 1043-53.

## ■■■ BRÈVES ■■■

■■■ **Le gène circadien *double time* code pour une kinase.** Les gènes *period* (*per*) et *timeless* (*tim*) sont des composants majeurs de l'horloge biologique de la drosophile et leur expression circadienne est le résultat d'une boucle d'autorégulation négative par un hétérodimère constitué des protéines PER et TIM elles-mêmes. Bien que l'on sache depuis un certain temps que les protéines PER et TIM sont phosphorylées au cours du rythme circadien, l'importance fonctionnelle de cette phosphorylation et l'existence des kinases correspondantes sont restées hypothétiques. L'identification et le clonage d'un nouveau gène circadien chez la drosophile appelé *double-time*, par l'équipe de M. Young (New York, NY) aux USA vient d'apporter la première confirma-

tion à ces hypothèses [1, 2]. En effet *double-time* code pour une protéine kinase ayant une forte homologie avec la caséine kinase I $\epsilon$  humaine. Le gène *double-time* est exprimé dans les mêmes cellules que *per* et *tim* mais son expression n'oscille pas. Les auteurs démontrent que la protéine DOUBLE-TIME interagit *in vitro* et *in vivo* avec PER dont la région amino-terminale possède de nombreux sites consensus de phosphorylation par la caséine kinase I. Les drosophiles mutantes pour le gène *double-time* présentent, soit une altération de la période du rythme circadien, soit une létalité au stade nymphal avec accumulation constitutive de la forme hypophosphorylée de PER. Ce gène joue donc un rôle essentiel dans le développement et le contrôle du rythme circa-

dien. Selon les auteurs, le rôle de DOUBLE-TIME serait de phosphoryler les monomères PER dans le cytoplasme et de contribuer ainsi à leur dégradation, avec pour résultat la formation retardée des hétérodimères PER-TIM. Ce modèle permet d'expliquer comment les phases d'accumulation des ARN *per* et *tim*, d'une part, et des protéines correspondantes, d'autre part, sont décalées. En effet, pour que l'horloge circadienne fonctionne, il est important que *per* et *tim* atteignent un niveau suffisant d'expression avant qu'ils ne soient réprimés par leurs propres produits.

[1. Price JL, et al. *Cell* 1998; 94: 83-95.]

[2. Kloss B, et al. *Cell* 1998; 94: 97-107.]



### L'Institut pour la Recherche sur la Moelle Épinière (IRME)

organise à Deauville, les 14-15-16 octobre 1998, son 4<sup>e</sup> Symposium International sur les

#### Lésions traumatiques de la moelle épinière

5 thèmes seront abordés :

- Neuroprotection • Modèles animaux • Activité de la moelle sous-lésionnelle • Imagerie des lésions traumatiques de la moelle épinière • Régénération

Une exposition permanente de posters se tiendra pendant ces journées.

#### Comité Scientifique

Président : Pr Michel Hurth

Renseignements : IRME - 45, rue Vineuse 75116 PARIS - Tél. : 01 44 05 15 43 - Fax 01 44 05 15 22 - E-mail irme @ wanadoo.fr

#### Comité d'Organisation

Président : Pr Alain Privat