

Horloges biologiques

Un rythme peut en cacher un autre

Michèle Teboul, Franck Delaunay

Université Côte d'Azur, CNRS, Inserm,
Institut de biologie Valrose (iBV),
06108 Nice Cedex, France.
teboulm@unice.fr

► La plupart des fonctions biologiques suit un rythme circadien, afin d'adapter l'organisme à l'alternance entre le jour et la nuit. Un rythme de douze heures ou rythme circatidal existe également chez les organismes marins qui sont soumis aux variations des marées. Curieusement, ce rythme de 12 h existe aussi chez les mammifères terrestres. Chez l'homme, la pression artérielle, les performances cognitives, les hormones circulantes, et même le cycle veille-sommeil présentent deux pics par jour [1, 2]. Des altérations de ce rythme ont été rapportées dans des pathologies humaines, suggérant qu'il est primordial pour maintenir l'homéostasie [3, 4]. Au niveau transcriptionnel, environ 200 gènes oscillant avec une période de 12 h ont été identifiés dans le foie de souris [5]. Ces résultats avaient été obtenus avec une méthode définissant *a priori* une période de 12 h et présentaient donc l'inconvénient de potentiellement sous-estimer le nombre de gènes concernés, leur transcription étant superposée avec une période de 24 h.

Une nouvelle méthode d'analyse de données temporelles permet d'identifier des rythmes d'une période de 12 h

Afin d'identifier des gènes dont l'expression oscille au cours du temps, l'équipe de Bert O'Malley a utilisé une approche mathématique non-biaisée, la méthode « *eigenvalue/pencil*¹ », qui permet l'identification d'oscillations périodiques de durées différentes et

superposées car elle ne prédéfinit pas de période *a priori* [6, 7]. Appliquée sur un jeu de données du transcriptome de foie de souris placées en isolement temporel (obscurité constante), avec une résolution d'une heure pendant 48 h, cette méthode a identifié, comme attendu, principalement des oscillations circadiennes mais également des oscillations avec une période harmonique du rythme circadien (12 h, 8 h, 4 h, etc.). Cette analyse s'est avérée très efficace puisqu'elle a permis, d'une part, l'identification d'un plus grand nombre de gènes circadiens qu'avec les méthodes classiques, et a révélé, d'autre part, une proportion importante de gènes dont la périodicité de 24 h est superposée avec une périodicité plus courte.

Les gènes présentant des rythmes d'expression de 12 h sont indépendants de l'oscillateur circadien

Devant l'abondance inattendue de gènes oscillant avec une rythmicité de 12 h, les auteurs ont restreint leur étude à ces derniers. Ils ont ainsi identifié 3 652 gènes hépatiques, dont un grand nombre est associée au réticulum endoplasmique (RE) et au métabolisme mitochondrial. Ils ont fait une observation surprenante : les phases de ces gènes sont situées exclusivement aux changements jour/nuit et nuit/jour, alors que les phases des gènes ayant une expression circadienne sont réparties tout au long de la période de 24 h. Concernant le mécanisme de cette rythmicité, deux hypothèses ont été envisagées : (1) ce rythme est généré par deux activateurs ou répresseurs circadiens agissant en antiphase, ou (2) ce rythme est indé-

pendant de l'oscillateur circadien, cette deuxième possibilité étant prédite par le modèle mathématique des auteurs. Confirmant cette prédiction, les rythmes de 12 h ont bien été observés chez les souris déficientes pour la protéine clé de l'horloge circadienne, BMAL1 (*brain and muscle arnt-like protein-1*). Cette observation suggère que l'oscillation qui régit cette rythmicité de 12 h est donc différente de l'oscillateur circadien.

Les rythmes de 12 h peuvent être générés *in vitro* par des signaux de stress cellulaire

Le rythme circadien peut être induit, *in vitro*, de diverses manières : un choc de sérum, un traitement avec de la dexaméthasone ou de la forskoline, etc. Les auteurs ont donc cherché à savoir si les rythmes de 12 h pouvaient également être générés *in vitro*, ou s'ils nécessitaient des signaux systémiques qui n'existent qu'*in vivo*. Il s'est avéré que la forskoline n'induisait pas d'oscillations de 12 h ; en revanche, un traitement de 2 heures par la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation classiquement utilisé pour induire un stress du RE, a généré des oscillations de 12 h, pendant 48 h dans des fibroblastes embryonnaires de souris et ce, sans induire de rythme circadien. Ce traitement induit des oscillations de 12 h dans des fibroblastes invalidés pour *Bmal1*, ce qui conforte le fait que les oscillations de 12 h sont bien indépendantes du système circadien. Les auteurs ont ensuite cherché à induire ces oscillations de 12 h par des signaux physiologiques provoquant un stress du RE ou un stress métabolique. Une privation de

¹ L'approche *eigenvalue/pencil* a été initialement développée pour l'analyse spectrale des signaux.



glucose, ou un traitement de 2 heures avec du 2-déoxy-D-glucose (analogue non-métabolisable du glucose), se sont avérés efficaces pour induire des oscillations de 12 h des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose et des acides gras, ainsi que d'un gène de la réponse UPR (*unfolded protein response*), *Eif2ak3* (*eukaryotic translation initiation factor-alpha kinase 3*). En construisant un gène rapporteur fluorescent sous le contrôle du promoteur de *Eif2ak3*, les auteurs ont ensuite montré que ces oscillations de 12 h étaient observables dans des cellules uniques indiquant leur autonomie à l'échelle cellulaire.

Les protéines rythment aussi avec une période de 12 h !

En analysant des données de protéomique, les auteurs de l'étude ont mis en évidence que l'expression de 15 % des protéines hépatiques présentait des oscillations de 12 h. Parmi les gènes présentant des oscillations d'ARN de 12 h, seuls 35 % d'entre eux étaient également associés à des oscillations protéiques. Ce faible chevauchement entre oscillation des ARN et des protéines correspondantes est également retrouvé avec la périodicité de 24 h [8] (→).

La catégorisation fonctionnelle des protéines ayant une rythmicité de 12 h montre un enrichissement dans les fonctions mitochondriales et dans celles du RE. Les auteurs ont proposé le terme CREMA (pour *coordinated rhythm of ER and mitochondria actions*), stipulant que ces 2 organites ont des actions rythmiques couplées pour maintenir l'homéostasie métabolique et la réponse au stress. Contrairement aux variations d'ARN, les protéines oscillant avec une période de 12 h ont des phases réparties tout au long du cycle. Les protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras, la phosphorylation oxydative et la néoglucogénèse présentent deux pics d'expression,

en début de matinée et en début de nuit, tandis que les protéines impliquées dans la glycolyse et la synthèse d'acides gras présentent des pics d'expression l'après-midi et en fin de nuit.

Le facteur de transcription XBP1 est responsable de la génération des oscillations de 12 h

Les auteurs ont effectué une analyse statistique d'un jeu de données métabolomiques et ont ainsi mis en évidence que 15 % des métabolites avaient un rythme de 12 h, dont plusieurs acides gras. Ils ont remarqué que le rythme des métabolites pouvait être corrélé au rythme des enzymes impliquées dans le métabolisme de ces composés. C'est le cas de l'enzyme LPCAT3 (*lysophosphatidylcholine acyltransferase 3*), dont la fonction est d'augmenter la fluidité de la membrane en favorisant l'incorporation d'acides gras polyinsaturés dans les phospholipides. Des études antérieures avaient montré que l'induction de l'expression de *Lpcat3* réduisait le stress du RE, en augmentant la fluidité de la membrane par l'incorporation préférentielle d'acides gras polyinsaturés dans les phospholipides [9]. Cette découverte montre que l'horloge hépatique de 12 h coordonne la réponse du stress du RE au métabolisme, pour maintenir l'homéostasie (Figure 1). Afin d'identifier le mécanisme permettant les oscillations de 12 h des transcrits, les auteurs ont recherché les facteurs de transcription présentant un rythme de 12 h dans des fibroblastes embryonnaires sauvages ou invalidés pour *Bmal1*, et synchronisés par la tunicamycine. Ils ont restreint leur étude à la protéine XBP1 (*X-Box binding protein 1*) de rythmicité robuste, persistant dans les fibroblastes invalidés pour *Bmal1*, et qui lie les promoteurs de plusieurs gènes dont *Eifak3* avec une périodicité de 12 h. L'extinction du gène *Xbp1* par un ARN interférant provoque une forte atténuation des oscillations des gènes du métabolisme et du stress du RE, confirmant ainsi le rôle crucial de XBP1 dans la génération du rythme de 12 h chez les mammifères.

La rythmicité de 12 h est influencée par le comportement alimentaire

Afin de savoir si d'autres tissus périphériques sont sous le contrôle de l'horloge de 12 h, les auteurs ont mesuré le quotient respiratoire de souris nourries *ad libitum* pendant plusieurs jours et ont mis en évidence à la fois un rythme circadien et un rythme de 12 h. Lorsque les souris sont soumises à une restriction temporelle d'accès à la nourriture, on observe un impact différent sur l'horloge de 12 h et l'horloge circadienne ; alors que les oscillations de 12 h présentent une diminution d'amplitude sans altération de la phase, l'amplitude des oscillations circadiennes est intacte mais un décalage de phase de 6 h est observé. Ces résultats soulignent l'indépendance de l'horloge de 12 h et de l'horloge circadienne au niveau systémique.

Une atténuation de la rythmicité de 12 h est corrélée à la progression de la stéatose hépatique chez l'homme

Afin de déterminer si l'horloge de 12 h est importante pour l'homéostasie métabolique chez l'homme, les auteurs ont analysé l'expression, aux niveaux ARN et protéique, de 143 et 138 gènes oscillant avec une rythmicité respective de 12 h et de 24 h, chez des patients atteints de stéatopathie métabolique (ou NAFLD pour *non-alcoholic fatty liver disease*). Les auteurs ont ainsi mis en évidence une forte corrélation entre la progression de la stéatose hépatique, une étape précoce et réversible de la pathologie se caractérisant par l'accumulation de triglycérides intra-hépatocytaires, et une diminution de l'expression des gènes ayant une rythmicité de 12 h. Une corrélation plus faible entre la diminution d'expression de ces gènes et la stéatohépatite, un stade plus avancé de la pathologie, a également été rapportée. En revanche, seule une faible corrélation a été observée entre la diminution d'expression des gènes circadiens et la stéatose, et aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la diminution d'expression de ces gènes avec la

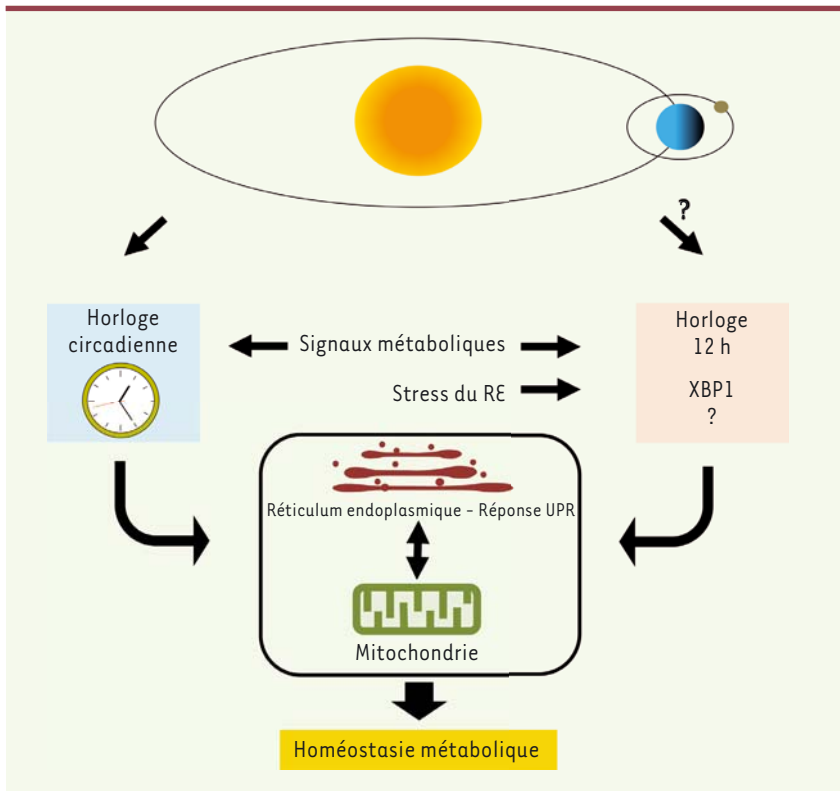


Figure 1. L'homéostasie métabolique de la cellule hépatique est contrôlée à la fois par l'horloge circadienne et l'horloge de 12 h. L'homéostasie métabolique de la cellule dépend de l'interaction entre les activités mitochondriales et du réticulum endoplasmique (RE). Les signaux métaboliques sont des synchroniseurs de l'horloge circadienne et de l'horloge de 12 h, elle-même synchronisée par des signaux de stress du RE. En retour, l'horloge circadienne et l'horloge de 12 h sont nécessaires pour assurer l'homéostasie métabolique via les mitochondries et le RE. UPR : *unfolded protein response*.

stéatohépatite. Ces résultats suggèrent que, chez l'homme aussi, l'horloge de 12 h est indépendante de l'horloge circadienne et joue un rôle dans le maintien de l'homéostasie hépatique.

L'horloge de 12 h est plus conservée que l'horloge circadienne

Des gènes oscillant avec une période de 12 h avaient déjà été identifiés chez les crustacés, et l'indépendance de l'horloge circadienne avec l'horloge circadienne avait été établie [10]. Il est frappant de constater que ce sont les mêmes gènes du métabolisme mitochondrial qui oscillent avec une période de 12 h chez les crustacés et la souris, suggérant une conservation au cours de l'évolution de ce rythme, indépendamment de l'adaptation aux marées. Afin

de savoir si le rythme d'expression des gènes associés au RE était aussi conservé au cours de l'évolution, et parce que ces gènes n'avaient pas été étudiés chez les crustacés, les auteurs ont analysé les données temporelles obtenues chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Un rythme de 12 h a bien été retrouvé dans l'expression des ARN des gènes mitochondriaux de la phosphorylation oxydative, ainsi que des gènes du métabolisme, du stress du RE, et de l'orthologue de *Xbp1*. Des orthologues des gènes de l'horloge existent chez *C. elegans* mais ils n'oscillent pas et ont, par contre, un rôle dans le développement. L'horloge de 12 h est donc conservée entre nématodes et mammifères, confirmant que les horloges de 12 h et de 24 h ont évolué de façon indépendante.

Conclusion

Cette découverte nous conduit à porter un regard nouveau sur les rythmes biologiques. La rythmicité circadienne a attiré l'essentiel des études précédentes, alors que les rythmes purs sont rares dans la nature. Les rythmes physiques sont des superpositions avec des résonances harmoniques dans la musique, la lumière ou le mouvement des planètes. À la lumière des travaux de cette étude, il apparaît que la résonance harmonique serait plus universelle dans la nature qu'on ne le pense, un concept qui avait déjà été proposé par Pythagore il y a 2 000 ans, baptisé « *Musica Universalis* ». Il ne fait nul doute que l'horloge (ou les oscillations) de 12 h sera prise en compte au même titre que l'horloge circadienne dans les futures études des rythmes cellulaires et physiologiques. ♦

Biological clocks: a rhythm can hide another one

REMERCIEMENTS

Les travaux de notre équipe sont soutenus par l'ANR « Investissement d'avenir » LABEX Signalife (ANR-11-LABX-0028-01) et le projet Chronomet. (ANR-2012-BLAN-014-01).

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Ayala DE, Hermida RC, Garcia L, et al. Multiple component analysis of plasma growth hormone in children with standard and short stature. *Chronobiol Int* 1990 ; 7 : 217-20.
2. Broughton R, Mullington J. Circasemidian sleep propensity and the phase-amplitude maintenance model of human sleep/wake regulation. *J Sleep Res* 1992 ; 1 : 93-8.
3. Haus E, Dumitriu L, Nicolau GY, et al. Circadian rhythms of basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), cortisol, and melatonin in women with breast cancer. *Chronobiol Int* 2001 ; 18 : 709-27.
4. Otsuka K, Cornélissen G, Halberg F. Circadian rhythmic fractal scaling of heart rate variability in health and coronary artery disease. *Clin Cardiol* 1997 ; 20 : 631-8.
5. Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, et al. Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet* 2009 ; 5 : e1000442.



RÉFÉRENCES

- Zhu B, Zhang Q, Pan Y, et al. A cell-autonomous mammalian 12 hr clock coordinates metabolic and stress rhythms. *Cell Metab* 2017 ; 25 : 1305-19.
- Keller M, Mazuch J, Abraham U, et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 21407-12.
- Mauvoisin D, Gachon F. Mise en évidence de la physiologie rythmique du foie par protéomique nucléaire. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 573-6.
- Rong X, Albert CJ, Hong C, et al. LXR_s regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metab* 2013 ; 18 : 685-7.
- Zhang L, Hastings MH, Green EW, et al. Dissociation of circadian and circatidal timekeeping in the marine crustacean *Eurydice pulchra*. *Curr Biol* 2013 ; 23 : 1863-73.

NOUVELLE

L'orientation spatiale chez le primate

Je vois, donc j'y suis

Sylvia Wirth¹, Pierre Baraduc²

¹Institut des sciences cognitives Marc Jeannerod, UMR 5229 CNRS, 67, boulevard Pinel, 69675 Bron Cedex, France.

²GIPSA, UMR 5216, Université Grenoble-Alpes, CNRS, Grenoble INP, 11, rue des Mathématiques, 38402 Saint Martin d'Hères, France.

sylvia.wirth@isc.cnrs.fr

► Où suis-je ? Où est-ce ? Et comment y arrive-t-on ? En visite dans un endroit peu familier, vous vous êtes souvent posé consciemment ces questions ; votre cerveau y répond toutefois quotidiennement sans que vous y prêtiez garde. Se repérer dans l'espace fait partie des capacités partagées par de nombreuses espèces et qui sont cruciales pour notre survie. S'il est aisé de se déplacer vers un but visible (par exemple, marcher jusqu'au bout du couloir), dès lors qu'il faut se déplacer vers un but invisible (comme par exemple, se rendre à un autre point de la ville), une navigation efficace doit reposer sur des processus complexes qui nous permettent, d'une part, de forger un schéma interne de notre environnement et, d'autre part, d'y représenter nos déplacements passés et futurs. Toutefois, en l'absence de boussole interne dont sont équipées certaines espèces migratoires, et du GPS dont sont pourvus nos téléphones et nos voitures, c'est un ensemble important de zones cérébrales qui effectuent ces calculs complexes et guident nos déplacements. Parmi ces aires cérébrales, on compte l'hippocampe, les cortex entorhinal et parahippocampique, et le cortex pariétal [1, 2]. Ces aires cérébrales sont mutuellement reliées en réseau, et chacune résoud, de manière complémentaire aux

autres, un des éléments nécessaires à la navigation. Les patients qui souffrent de lésions de l'une ou l'autre de ces aires cérébrales présentent ainsi des désorientations topographiques sévères, prouvant l'implication de ces aires dans l'orientation spatiale [3, 4]. Il est connu que la maladie d'Alzheimer, qui touche en particulier l'hippocampe et le cortex entorhinal, s'accompagne d'une grande désorientation spatiale ainsi que de troubles de la mémoire [5, 6]. La question qui nous intéresse ici est de comprendre précisément les mécanismes par lesquels les neurones de ces aires cérébrales nous permettent de nous orienter efficacement dans l'environnement.

Depuis plusieurs années, on en sait un peu plus grâce à de nombreuses études menées chez le rongeur [7-9] (→).

À l'aide d'électrodes placées dans l'hippocampe de rats, de nombreux chercheurs ont en effet étudié les variations de l'activité électrique en fonction de divers corrélats comportementaux pendant que l'animal se déplace dans un petit environnement. Ces études ont ainsi permis d'identifier certains neurones spécifiques, appelés *cellules de lieu*, comme étant des acteurs majeurs du système permettant la navigation.

Ces cellules augmentent leur activité électrique lorsque le rat est à un endroit particulier de l'environnement. Chaque cellule a ainsi un endroit préféré, différent de celui d'une autre cellule. L'environnement se trouve donc représenté par un ensemble de cellules qui sont activées en fonction des différents endroits visités par l'animal. Ces résultats ont fait l'objet de l'attribution du prix Nobel à leurs découvreurs, John O'Keefe, May-Britt Moser et Edvard Moser (en 2014) [10] (→). Ce prix témoigne

(→) Voir le Repère (Nobel) de L. Rondi-Reig, m/s n° 2, février 2015, page 203

de l'importance de la compréhension des mécanismes cellulaires ayant lieu dans les zones cérébrales essentielles à la mémoire et altérées, entre autres, par la maladie d'Alzheimer. Peut-on, toutefois, transposer directement ces résultats au primate et à l'homme ? Le rat et le primate ont des systèmes sensoriels très différents. Par exemple, contrairement au rat, le primate a une acuité visuelle très fine et une vision binoculaire en relief, grâce à des yeux placés frontalement sur le visage [11]. Inversement, le rat a une acuité visuelle médiocre mais un champ visuel très étendu (de 270 degrés environ), grâce à des yeux placés sur le côté de la tête. Ces différences ont des réper-