

Horloge et génétique moléculaire chez la drosophile

Brigitte Grima

Institut des Neurosciences Paris-Saclay, UMR 9197 CNRS/Université Paris Sud CNRS, Bât. 32/33, 1 Av. de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Auteur correspondant : Brigitte Grima, grima@inaf.cnrs-gif.fr

Reçu le 13 novembre 2014

Résumé – La plupart des êtres vivants possède une horloge circadienne (période de 24 h) qui leur permet de s'adapter aux conditions environnementales dictées par la rotation de la terre. Son étude chez la drosophile a permis de découvrir les premiers gènes d'horloge, *period* pour le premier d'entre eux puis *timeless*. Depuis, les méthodes génétiques utilisées chez cet insecte ont permis d'établir un modèle moléculaire qui repose sur des boucles de régulation transcriptionnelle négatives qui génèrent des oscillations d'ARNm des gènes d'horloge. Un délai entre l'accumulation des ARNm et celle des protéines assure le fonctionnement de la boucle de rétroaction. Ce délai est dû à des modifications post-traductionnelles telles que phosphorylations, ubiquitinations qui contrôlent la durée de vie des protéines et déterminent la période de leurs oscillations. Cette horloge est présente aussi bien dans le cerveau que dans de nombreux autres organes où elle se comporte de façon autonome. Sa synchronisation par la lumière repose sur la protéine photoréceptrice cryptochrome, présente dans toutes les cellules d'horloge. De plus, les cellules d'horloge du cerveau sont également synchronisées par les photorécepteurs de l'œil. L'horloge qui gouverne le rythme veille-sommeil est contrôlée par plusieurs groupes de neurones du cerveau. Chaque groupe a une fonction distincte dans la génération du rythme comportemental, fonction largement modulée par les conditions extérieures.

Mots clés : Horloge circadienne / rythme veille-sommeil / boucle de régulation transcriptionnelle / modifications post-traductionnelles / neurones d'horloge

Abstract – Clock and molecular genetics in *Drosophila*.

Most living organisms possess a circadian clock (24 h period) which allows them to adapt to environmental conditions. Numerous studies in *Drosophila* allowed to discover various key clock genes, such as *period* and *timeless*. The powerful tools of drosophila genetics have shown that the molecular clock relies on negative feedback loops that generate oscillations of the clock genes mRNA. A delay between the accumulation of mRNAs and proteins is required for the feedback loop. It is generated by post-translational modifications as phosphorylations and ubiquitinations, which control protein stability and determine the period of their oscillations. Clock cells are present in brain as well as in multiple peripheric tissues where they run autonomously. The synchronisation of clock cells by light relies on cryptochrome in both brain and peripheral tissues. In the brain, synchronisation also involves the eye photoreceptors. The clock that drives sleep-wake rhythms is controlled by different groups of neurons in the brain. Each group has a distinct function in the generation of the behavioral rhythm and this function is modulated by environmental conditions.

Key words: Circadian clock / sleep-wake rhythms / transcriptional feedback loop / post-translational modifications / clock neurons

Introduction

Les outils génétiques développés depuis le début du XX^e siècle chez l'insecte *Drosophila melanogaster* en ont fait un modèle phare de la chronobiologie moléculaire et cellulaire.

La drosophile a été largement utilisée comme organisme modèle en génétique. En effet le cycle biologique ne dure que dix jours et permet d'obtenir environ 200 descendants par couple.

Son génome est entièrement séquencé depuis 2000. Il comporte environ 15 000 gènes répartis sur 4 chromosomes dont plus de la moitié présentent des similitudes avec les gènes de mammifères dont l'Homme. Des mutants sont disponibles pour une grande partie d'entre eux et de nombreuses techniques permettent de modifier aisément le génome, en particulier pour cibler l'expression ou l'extinction de gènes dans des cellules particulières.

La drosophile a ainsi apporté de nombreux renseignements dans l'étude des rythmes circadiens. Dans les années 1960, l'idée d'un contrôle des rythmes circadiens par une horloge interne a été définitivement acceptée, en particulier grâce aux travaux de Colin Pittendrigh, aux États-Unis, sur l'éclosion des mouches drosophiles (Pittendrigh, 1993). Les caractéristiques majeures des horloges circadiennes étaient définies : période d'environ 24 h persistant en conditions environnementales constantes, période invariable quelle que soit la température extérieure, synchronisation de la phase de l'horloge sur les cycles jour/nuit *via* la perception des changements de lumière et de température associés (Dunlap *et al.*, 2004; Klarsfeld, 2009). Restaient à mettre en évidence les composants cellulaires et moléculaires impliqués.

Identification des gènes du rythme chez la drosophile

Le développement de la drosophile inclut différents stades larvaires suivis d'une métamorphose, et les jeunes adultes émergent une dizaine de jours après la ponte des œufs. Les émergences ont lieu au début de la journée en conditions jour/nuit artificielles (12 h de lumière/12 h obscurité), et ce rythme quotidien persiste en obscurité constante, ce qui en démontre le caractère circadien. Les premiers mutants isolés présentaient un rythme d'éclosion à période courte (toutes les 20 h environ), à période longue (toutes les 28 h environ) ou une absence complète de rythme (Konopka & Benzer, 1971). Lorsque des mouches adultes sauvages sont placées en obscurité constante, elles présentent une alternance activité/repos caractérisée par un pic d'activité qui revient toutes les 24 h. Les mutations qui altéraient le rythme

d'éclosion modifiaient de la même façon ce rythme activité/repos, indiquant qu'un même oscillateur circadien contrôle les deux rythmes. Ces mutations affectent le gène *period* (*per*). L'étude de la régulation de l'expression de ce dernier a montré qu'aussi bien les ARNm que les protéines PER oscillaient avec une période de 24 h (figure 1). Ces oscillations sont générées par un mécanisme retrouvé dans la plupart des oscillateurs circadiens, chez les mammifères notamment : le contrôle négatif exercé par la protéine PER sur la transcription de son propre gène (Hardin *et al.*, 1990; Hogenesch & Ueda, 2011). La génétique a permis d'isoler des composants impliqués dans ces régulations. Le modèle actuel de l'oscillateur circadien repose sur une double boucle de régulation transcriptionnelle, dont le déroulement temporel dépend de la régulation fine de la durée de vie et de l'activité des protéines qu'elles mettent en jeu (Allada & Chung, 2010; Weber *et al.*, 2011) (figure 1). Un complexe, constitué des facteurs de transcription CLOCK (CLK) et CYCLE (CYC), active l'expression des gènes *per* et *timeless* (*tim*) en fin de journée. Les protéines PER et TIM s'accumulent dans le cytoplasme de la cellule et forment des complexes au cours de la nuit, puis elles sont transférées dans le noyau, où a lieu la transcription. En fin de nuit, PER et TIM s'associent avec le complexe CLK/CYC pour en inhiber la fonction transcriptionnelle, donc l'activation des gènes *per* et *tim*. Le matin, les protéines PER et TIM sont dégradées, ce qui permet à CLK et CYC de démarrer un nouveau cycle de transcription.

Contrôles post-traductionnels

L'oscillation de l'expression des gènes *per* et *tim* n'est possible que si les étapes d'activation et de répression transcriptionnelles sont temporellement séparées, en l'occurrence, activation en fin de journée et répression en fin de nuit. Cette séparation est générée par un retard de l'accumulation nocturne des protéines PER et TIM, qui n'apparaissent que plusieurs heures après le pic de transcrit, ce qui suggère que des modifications post-traductionnelles contrôlent les niveaux de protéines. En outre, les oscillations de la protéine PER sont observées même chez des mutants chez lesquels les ARN n'oscillent pas (Blanchardon *et al.*, 2001; Yang & Sehgal, 2001). Après quarante années de recherches, une quinzaine de gènes dont l'altération modifie le fonctionnement de l'horloge ont été isolés chez la drosophile. Les protéines PER et TIM sont soumises à des phosphorylations qui les rendent instables. Ces phosphorylations sont contrôlées par un équilibre entre kinases, qui ajoutent les phosphates, et phosphatases, qui les enlèvent. Les protéines phosphorylées sont reconnues par d'autres enzymes qui

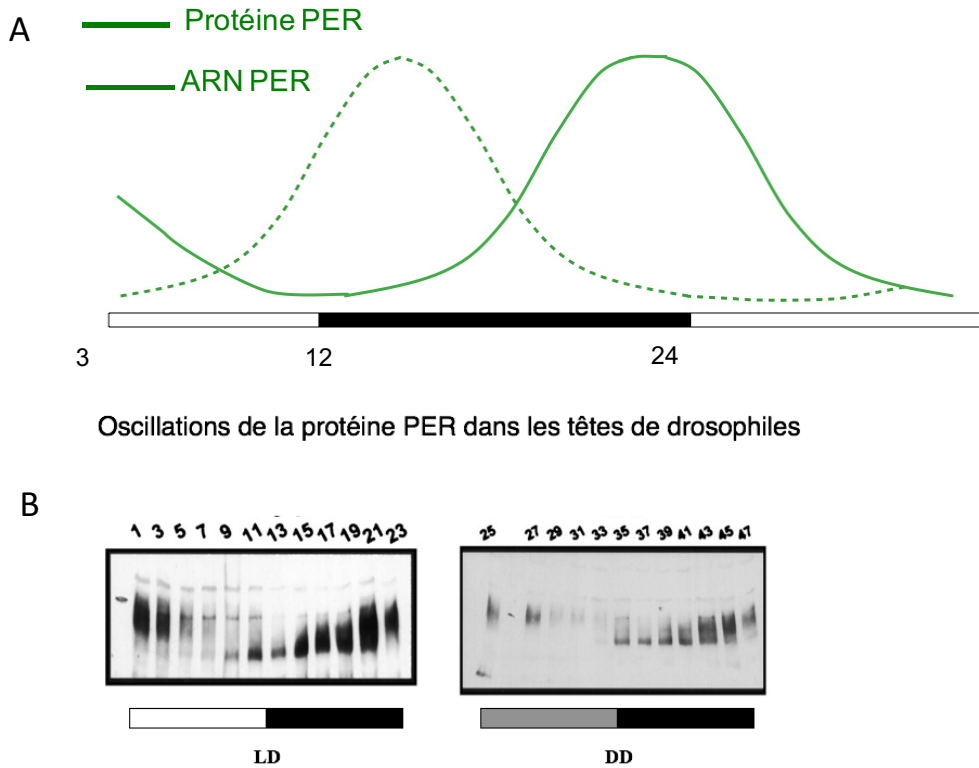


Fig. 1. A. Oscillations des ARN *per* et protéine PER : l'ARN est minimum quand la protéine est maximum. Les phases des oscillations sont décalées de 6 h. B. Oscillations des protéines PER : Western blots d'extraits de protéines de têtes révélés avec un anticorps anti-PER en condition jour/nuit (LD) et obscurité constante (DD). Les quantités et le niveau de phosphorylation de PER oscillent.

ajoutent des chaînes d'ubiquitine, une petite molécule dont la présence sur PER et TIM constitue un signal de reconnaissance par une machinerie de dégradation des protéines, le protéasome. La compétition entre synthèse et dégradation définit la vitesse d'accumulation nocturne de PER et TIM. Par ailleurs, certaines phosphorylations contrôlent l'entrée de PER et TIM dans le noyau de la cellule, puis leur capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle du complexe CLK/CYC. Enfin, la fin du cycle est définie par la dégradation complète des protéines PER et TIM hautement phosphorylées par la voie ubiquitine-protéasome (figure 2).

Synchronisation de l'horloge par la lumière

Bien qu'il ait une période intrinsèque d'environ 24 h, l'oscillateur circadien n'est pas aussi stable qu'un métronome, et doit donc se synchroniser sur les cycles jour/nuit imposés par la rotation de la terre. En laboratoire, si on soumet des drosophiles à un changement de phase du cycle jour/nuit, comme celui que l'on subit lorsqu'on fait un voyage transatlantique, les mouches se synchronisent en l'espace d'une journée sur la nouvelle phase (Dubruille &

Emery, 2008). Cette efficacité enviable repose sur l'utilisation conjointe du système visuel et d'une molécule photoréceptrice présente dans la plupart des cellules de l'organisme. Contrairement aux mammifères, chez lesquels la perte de la connexion entre l'œil et le cerveau rend l'horloge aveugle, des drosophiles mutantes, qui ne développent pas d'yeux, synchronisent toujours leur cycle veille/sommeil avec les cycles jour/nuit. L'isolement d'un gène codant pour la protéine cryptochrome (CRY), un photo-récepteur à la lumière bleue également utilisé par les plantes, a permis de comprendre pourquoi (Stanewsky *et al.*, 1998). Les mouches mutantes dépourvues à la fois du système visuel et du cryptochrome s'avèrent incapables de se synchroniser sur les cycles jour/nuit. Les rôles respectifs de la protéine CRY et du système visuel ne sont pas très clairs, mais on a observé que les mouches dépourvues de l'un ou de l'autre mettent plusieurs jours à recaler leur rythme veille/sommeil. La façon dont le système visuel recale l'oscillateur moléculaire n'est pas connue. En revanche, le mécanisme faisant appel au cryptochrome a été en partie élucidé. La cuticule qui constitue l'exosquelette de la drosophile est translucide, ce qui permet à la lumière d'atteindre les cellules des différents organes. Dans les cellules,

Boucle de régulation de l'horloge

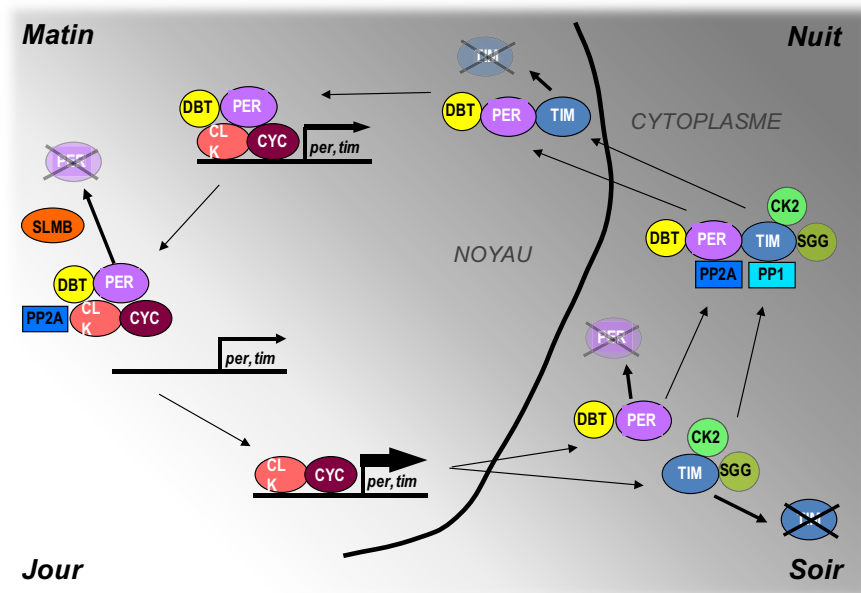


Fig. 2. Oscillateur moléculaire : une boucle de régulation transcriptionnelle couplée au contrôle de la stabilité des protéines PER et TIM génère des oscillations moléculaires d'une période de 24 h. Le soir, les facteurs de transcription CLK et CYC induisent l'expression des gènes *per* et *tim*. Au cours de la nuit, les protéines PER et TIM s'accumulent et subissent des modifications post-traductionnelles qui contrôlent leur stabilité et leur activité. En fin de nuit, elles entrent dans le noyau pour réprimer leur gène.

la capture d'un photon par la protéine CRY induit la formation d'un complexe avec la protéine TIM. Ce complexe éphémère recrute plusieurs enzymes qui provoquent la phosphorylation puis l'ubiquitination de TIM, induisant sa dégradation par le protéasome. La disparition brutale de TIM sous l'action de la lumière modifie l'état de l'oscillateur moléculaire, dont la vitesse de reconstitution du réservoir de protéine TIM déterminerait le sens du changement de phase, avance ou retard.

L'expression des gènes d'horloge dans l'organisme révèle que la quasi-totalité des cellules possèdent une horloge circadienne. Si le rôle de certains neurones dans le contrôle des rythmes veille/sommeil est établi, la fonction des horloges dans les tissus non cérébraux reste largement inconnue. Une horloge a été mise en évidence dans l'antenne de la drosophile, qui abrite de nombreux récepteurs olfactifs. Il a été montré que cette horloge gouverne un rythme de sensibilité olfactive : les drosophiles sont plus sensibles à certaines odeurs à certains moments de la journée. En outre, cette horloge semble intervenir dans le contrôle circadien des interactions sociales entre les individus. Il est vraisemblable que de nombreuses fonctions physiologiques sont contrôlées par des horloges présentes dans les différents organes, comme cela a été montré chez les mammifères (détoxification dans le foie, production

d'urine dans le rein...). Ces horloges non cérébrales, encore appelées périphériques, sont, chez la drosophile, capables de percevoir la lumière *via* le photorécepteur CRY. Chez les mammifères, la connexion œil-cerveau assure la synchronisation des noyaux suprachiasmatiques, qui jouent le rôle de chef d'orchestre en synchronisant l'ensemble des oscillateurs périphériques. Le rôle photorécepteur de CRY chez la drosophile confère aux horloges périphériques la capacité à percevoir la lumière indépendamment du cerveau. Ainsi est-il possible de synchroniser les oscillateurs circadiens des cellules de pattes, d'œil ou d'antenne en exposant les organes en culture à des cycles jour/nuit. Les insectes ont donc adopté une organisation circadienne décentralisée, où la lumière synchronise les oscillateurs circadiens des différents organes *via* le photorécepteur CRY, sans intervention du cerveau.

Relation drosophile-mammifères

Les gènes gouvernant les rythmes circadiens de la drosophile sont très conservés et ont permis d'isoler de nombreux gènes d'horloge chez les mammifères. Chez ces derniers, des protéines homologues à PER, CLK et CYC composent une boucle de régulation transcriptionnelle, et leurs modifications post-traductionnelles

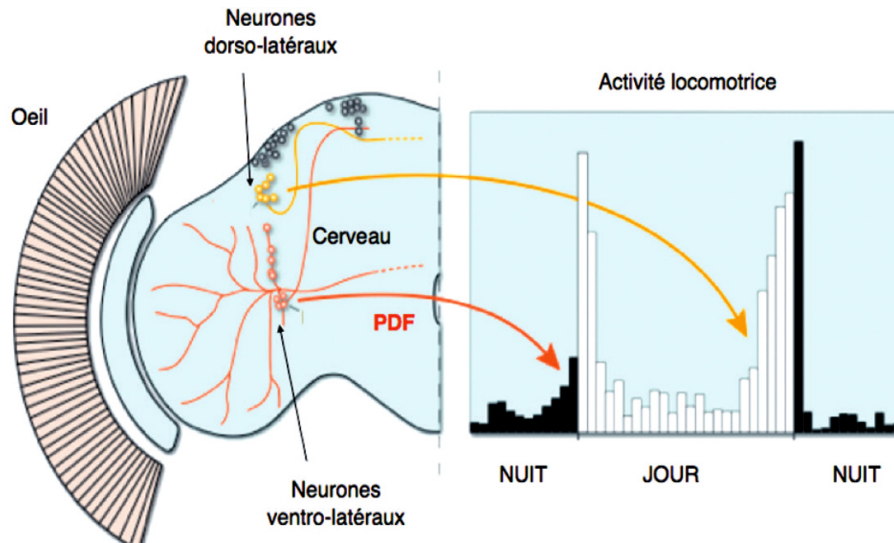


Fig. 3. L'horloge cérébrale de la drosophile contient au moins deux oscillateurs (neurones dorso-latéraux et neurones ventro-latéraux) aux fonctions distinctes en conditions jour/nuit.

semblent assurées en grande partie par les mêmes enzymes de phosphorylation et d'ubiquitination que chez la mouche. Une surprise est apparue lorsque des souris dépourvues de cryptochrome ont été générées. Contrairement aux mutants de drosophile, les souris *cry*⁻ ne présentent pas de défaut de synchronisation de leur horloge, puisqu'elles perdent tout simplement leur rythme veille/sommeil. Chez les mammifères, CRY semble avoir un rôle proche de celui de la protéine TIM de drosophile et s'associe à PER. L'analyse des gènes *cry* chez différents insectes indique que certains d'entre eux, telle l'abeille, possèdent un gène *cry* proche du gène de mammifère mais pas de gène *tim*, tandis que d'autres (moustique, ver à soie) possèdent à la fois un gène *cry* de type drosophile et un gène *cry* de type mammifère. Cette deuxième catégorie d'insectes pourrait donc refléter une situation ancestrale ayant évolué différemment chez la mouche et chez les mammifères (Yuan *et al.*, 2007).

Dans le cerveau, différents groupes de neurones du matin et du soir

De nombreux animaux ont des cycles d'activité/repos montrant une distribution journalière bimodale, avec un pic d'activité le matin et un autre le soir. Les drosophiles maintenues en laboratoire en conditions jour/nuit (12 h/12 h) émergent de leur sommeil nocturne ou de leur sieste quelques heures avant l'allumage ou l'extinction de la lumière. C'est donc la capacité d'anticipation à l'éclairement qui caractérise la rythmicité des mouches. L'horloge qui gouverne ce

rythme veille/sommeil repose sur environ 150 neurones – le cerveau d'une mouche en contiendrait environ 100 000 – répartis de façon symétrique en plusieurs groupes dorsaux et latéraux dans le cerveau (Dubruille & Emery, 2008). Un groupe de huit neurones ventro-latéraux exprime le neuropeptide PDF (*Pigment Dispersing Factor*), dont l'absence provoque la perte du rythme en obscurité constante, suggérant qu'il est un neurotransmetteur de l'horloge cérébrale. Lorsque les mouches mutantes pour le PDF sont placées en conditions jour/nuit, elles perdent leur activité du matin mais gardent une activité du soir. Ces données suggèrent que des groupes de neurones distincts contrôleraient différentes parties du comportement rythmique de l'animal. Une hypothèse qui a pu être testée directement, grâce à la relative facilité, chez la drosophile, à cibler l'expression de gènes dans un groupe de cellules particulier. Des mouches mutantes pour le gène *per* ne montrent ni activité matinale ni activité vespérale. L'expression dirigée d'un transgène *per* dans les neurones à PDF de ces mêmes mutants restaure l'activité du matin, mais pas celle du soir. En revanche, lorsque l'expression du transgène est ciblée dans un autre groupe, composé de quatre neurones dorso-latéraux, les mouches montrent une activité du soir mais pas d'activité du matin. L'horloge cérébrale de la mouche contient donc au moins deux oscillateurs aux fonctions distinctes dans la régulation du cycle veille/sommeil en conditions jour/nuit (Grima *et al.*, 2004; Stoleru *et al.*, 2004) (figure 3). De plus, ces oscillateurs neuronaux réagissent différemment à la lumière, l'oscillateur du matin étant inhibé par celle-ci, tandis que l'oscillateur du soir en a besoin pour générer de l'activité. La présence de plusieurs

oscillateurs permettrait de mieux adapter le comportement de l'animal aux variations saisonnières de la durée du jour (photopériode). En effet, la contribution de l'oscillateur du matin semble primer en conditions hivernales (jours courts), tandis que la contribution de l'oscillateur du soir domine en conditions estivales (jours longs) (Stoleru *et al.*, 2007).

Tout comme de nombreux aspects du fonctionnement de l'oscillateur moléculaire, l'architecture neuronale du système circadien reste encore mal comprise. La distribution des différentes entrées sensorielles (lumière, température) vers les multiples oscillateurs cérébraux, de même que la façon dont ces oscillateurs contrôlent les centres moteurs de l'insecte restent largement inconnues. Néanmoins, les outils génétiques et moléculaires de plus en plus performants et les avancées récentes des techniques d'imagerie cérébrale laissent entrevoir des perspectives prometteuses pour le décryptage moléculaire des horloges circadiennes.

Références

- Allada R., Chung B.Y., Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72, 605–624.
- Blanchardon E., Grima B., Klarsfeld A., Chélot E., Hardin P.E., Préat T., Rouyer F., Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian activity and eclosion rhythms by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *Eur J Neurosci*, 2001, 13, 871–888.
- Dubruille R., Emery P., A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. *Mol Neurobiol*, 2008, 38, 129–145.
- Dunlap Loros, DeCoursey, Chronobiology. Biological Timekeeping. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 2004
- Grima B., Chélot E., Xia R., Rouyer F., Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, 2004, 431, 869–873.
- Hardin P.E., Hall J.C., Rosbash M., Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 1990, 343, 536–540.
- Hogenesch J.B., Ueda H.R., Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. *Nat Rev Genet*, 2011, 12, 407–416.
- Klarsfeld A., Les Horloges du Vivant (Paris: O. Jacob), 2009.
- Konopka R.J., Benzer S., Clock mutants in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68, 2112–2116.
- Pittendrigh C.S., Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, 1993, 55, 16–54.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S.A., Rosbash M., Hall J.C., The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, 1998, 95, 681–692.
- Stoleru D., Peng P., Agosto J., Rosbash M., Coupled oscillators control morning and evening locomotor behavior of *Drosophila*. *Nature*, 2004, 431, 862–868.
- Stoleru D., Nawathean P., Fernandez M.P., Menet J.S., Ceriani M.F., Rosbash M., The *Drosophila* circadian network is a seasonal timer. *Cell*, 2007, 129, 207–219.
- Weber F., Zorn D., Rademacher C., Hung H.C., Post-translational timing mechanisms of the *Drosophila* circadian clock. *FEBS Lett*, 2011, 585, 1443–1449.
- Yang Z., Sehgal A., Role of Molecular Oscillations in Generating Behavioral Rhythms in *Drosophila*. *Neuron*, 2001, 29, 453–467.
- Yuan Q., Metterville D., Briscoe A.D., Reppert S.M., Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol*, 2007, 24, 948–955.